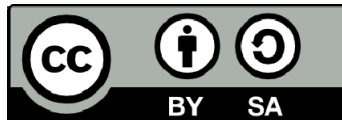




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Aislamiento y caracterización  
de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de distintos  
habitats: aspectos ecológicos y sanitarios**

Ana M<sup>a</sup> Marqués Villavecchia



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

R. 446.302

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE Pseudomonas  
aeruginosa PROCEDENTES DE DISTINTOS HABITATS :  
ASPECTOS ECOLOGICOS Y SANITARIOS

Memoria presentada para  
optar al grado de doctor  
en Farmacia

Ana Marques

Ana M<sup>a</sup> MARQUES VILLAVECCHIA  
Barcelona, Mayo 1982

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700083939

## PRESENTACION

Mi interés hacia la Microbiología surgió a partir de los estudios de licenciatura, al tomar contacto a nivel del tercer curso con la asignatura que, en régimen de carácter obligatorio, se cursa en la Facultad de Farmacia. Posteriormente conseguí incorporarme en situación de interno a la Cátedra dirigida por el profesor Dr. G. SUAREZ FERNANDEZ. En estas circunstancias pude iniciar mi formación experimental realizando la tesina, ayudada por la convivencia entre compañeros que vivían un ambiente de dedicación hacia esta ciencia.

Mi estancia en el departamento de Microbiología se estabilizó al conseguir en el curso académico de 1977-78 una plaza de profesor ayudante, en régimen de dedicación exclusiva. En el mismo año comencé la Tesis Doctoral, bajo la dirección de la Dra. M<sup>a</sup> D. SIMON PUJOL. El equipo de la Dra. SIMON contaba con una larga experiencia en estudios relacionados con el género Pseudomonas y las interacciones de esta bacteria con otros microorganismos en hábitats naturales.

El presente estudio está basado en la prospección de cepas de Pseudomonas aeruginosa, aisladas a partir de distintos hábitats : suelos, aguas superficiales terrestres, aguas marinas superficiales, fangos de depuradoras, productos patológicos, formas farmacéuticas no estériles y alimentos. Los microorganismos aislados se han identificado y tipado, realizándose a su vez un estudio sobre su capacidad de adaptación frente a diferentes agentes antimicrobianos.

Una vez determinado el potencial biológico de estas cepas de P. aeruginosa, se ha procedido al análisis de sus características relacionándolas con los hábitats de origen, a efectos de establecer un modelo ecológico que explicara presuntivamente una relación entre la máxima capacidad adaptativa a los agentes estudiados y el hábitat de procedencia.

Antes de proceder a la exposición de este trabajo quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. M<sup>ª</sup> D. SIMON PUJOL, profesor Agregado interino de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barce-

lona, por su dirección y valioso consejo, y por el interés demostrado a través de todo el desarrollo de la tesis doctoral.

Al profesor Dr. J. GUINEA SANCHEZ, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, por haber aceptado ser ponente de esta tesis, por el estímulo prestado para la finalización de la misma, así como por su revisión crítica del manuscrito.

Al Dr. G. SUAREZ FERNANDEZ, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, que me transmitió el interés por la Microbiología, permitiéndome iniciar los estudios del doctorado.

Asimismo debo expresar mi gratitud al profesor Dr. R. GOMEZ LUS, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina de Zaragoza, y a la profesora Dra. P. LASIERRA, quienes me cedieron las cepas indicadoras empleadas en el tipado por aeruginocinas.

A los Drs. R. BARGALLO y J. LOPEZ CAMPS, del servicio de microscopía electrónica, por su colaboración mediante las observaciones efectuadas al M.E. de transmisión.

Al Dr. R.G. EAGON, profesor de Microbiología de la Universidad de Athens (Georgia), por su consejo y ayuda.

A todos mis compañeros del laboratorio, que en todo momento me brindaron su estímulo y apoyo, muy especialmente al profesor Dr. F. CONGREGADO y a la profesora Dra. Ma J. ESPUNY TOMAS.

Debo agradecer también la asistencia prestada por Ma D. PASCAL CANALIAS, profesor ayudante de la Cátedra de Edafología de la Universidad de Barcelona y Ma L. MARTINEZ del C.S.I.C., en relación con las determinaciones analíticas de espectroscopía de absorción atómica, sin cuya ayuda hubiera sido mucho más difícil llevarlas a cabo.

Finalmente debo hacer constar que la realización de esta tesis ha sido facilitada por la concesión de una ayuda a la investigación concedida por el vicerrectorado de la Universidad de Barcelona en 1980, al equipo en el que me hallo trabajando.

## INDICE

I PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	1
II INTRODUCCION	5
2.1. CARACTERISTICAS DE <u>P. aeruginosa</u>	7
2.1.1. MORFOLOGIA	7
2.1.2. FISIOLOGIA	19
2.1.3. ORGANIZACION GENETICA	47
2.1.4. HABITAT	74
2.2. RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS	80
2.2.1. NATURALEZA DEL PROBLEMA	80
2.2.2. BASES MOLECULARES DE LA RESISTEN- CIA	89
2.3. IMPORTANCIA ECOLOGICA DE <u>P. aeruginosa</u>	127
2.3.1. ASPECTOS CLINICOS	127
2.3.2. ASPECTOS AMBIENTALES	182
2.4. CICLO AMBIENTAL DE <u>P. aeruginosa</u>	202
2.5. EVOLUCION Y PERSPECTIVAS FUTURAS	210
III PLAN DE TRABAJO	215
IV MATERIAL Y METODOS	217
4.1. TOMA DE MUESTRAS	218
4.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS	229
4.3. METODOS DE ENRIQUECIMIENTO	230
4.4. METODOS DE AISLAMIENTO	232

4.5. METODOS DE IDENTIFICACION	233
4.6. CONSERVACION DE LAS CEPAS	245
4.7. ANTIBIOGRAMA	245
4.8. METALOGRAMA	247
4.9. TIPADO	253
4.9.1. SEROTIPADO	253
4.9.2. AERUGINOCINOTIPADO	257
4.10. MICROSCOPIA ELECTRONICA	266
4.11. DETERMINACION DEL CROMO	268
4.12. METODOS ESTADISTICOS	273
V RESULTADOS	282
5.1. PORCENTAJES DE AISLAMIENTO DE <u>P. aerugi-</u> <u>nosa</u> EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS	283
5.2. IDENTIFICACION	285
5.3. ACTIVIDAD DE ANTIBIOTICOS Y QUIMIOTERA- PICOS FRENTE A LAS CEPAS ESTUDIADAS	288
5.4. TOLERANCIA A LOS METALES PESADOS	325
5.5. RESISTENCIA MULTIPLE COMBINADA	399
5.6. TIPADO SEROLOGICO	409
5.7. TIPADO POR PRODUCCION Y SENSIBILIDAD A LAS AERUGINOCINAS	427
VI DISCUSION	491
VII CONCLUSIONES	543
VIII BIBLIOGRAFIA	548



## I PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

## I PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Es un hecho conocido que la existencia de bacterias resistentes a los antibióticos y quimioterápicos es el resultado de un mecanismo de selección natural (COOKE, 1976<sup>a,b,c</sup>; DAVIES, 1981).

Es interesante conocer el nivel de resistencia a los antibióticos y especialmente a los metales pesados en bacterias aisladas de los medios naturales, ya que la resistencia está mediada en muchas ocasiones por el mismo plásmido (JOLY et al., 1976). La contaminación del medio ambiente por metales pesados puede ser uno de los factores selectivos de microorganismos resistentes (NAKAHARA et al., 1977<sup>b</sup>).

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo Gram-negativo, potencialmente patógeno, agente causal de serias infecciones en el hombre que cursan con gran variedad de síntomas (HOMMA, 1971). Entre sus principales características destacan su elevada resistencia a los agentes antimicrobianos y su potencial metabólico, siendo capaz de utilizar un número muy elevado de compuestos (LIU, 1976; STANIER et al., 1977).

Considerando las posibilidades de adaptación de P. aeruginosa en numerosos hábitats muy distintos entre sí, es fácil imaginar que, de acuerdo a los mecanismos de trasiego genético, esta bacteria puede trasladar información genética a otras menos dotadas, con el correspondiente riesgo epidemiológico (JOLY et al., 1976; VAN DIJCK y VAN DE VOORDE, 1976).

La existencia en el medio ambiente de bacterias patógenas multirresistentes, como P. aeruginosa, puede significar un insospechado peligro para el hombre. Las implicaciones de la presencia y origen de estos microorganismos son cuestiones importantes que deben ser contestadas (COLWELL y SIZEMORE, 1974). Para entender el comportamiento de un microorganismo patógeno oportunista como P. aeruginosa y poderlo combatir de forma efectiva, es necesario estudiar su ciclo y las relaciones que presenta en el medio ambiente, pudiendo llegar de esta forma a conocer sus vías de transmisión (HOADLEY, 1977; YOUNG, 1977).

El fin de esta tesis es eliminar algunas barreras existentes en el campo de la Microbiología, presentando una información conjunta esencial para el entendimiento de

un microorganismo concreto, P. aeruginosa. En esta memoria se estudian algunos aspectos de la biología de P. aeruginosa, sobre todo los que hacen referencia a su resistencia ante agentes antimicrobianos. Su incidencia y nivel de resistencia puede significar un reto para la salud pública.

## II INTRODUCCION

## II. INTRODUCCION

Desde la antigüedad se conocía la existencia del pus de color azul. Los médicos relacionaban su presencia con un signo de empeoramiento del curso de la infección. Luke en 1862 observó elementos con forma de bacilos en pus con estas características. P. aeruginosa fue aislada por primera vez por Gessar en 1882, como agente causal del color verde-azulado del pus depositado en vendas y heridas, denominándole "Bacillus pyocyaneus". El primero que logró extraer el pigmento fue Fordus en 1859 (DOGGETT,1979).

La patogenicidad de este microorganismo en animales de laboratorio se estableció pronto, siendo Charrin en 1890, el que demostró la toxicidad de filtrados libres de células (LIU, 1979). El reconocimiento de P. aeruginosa como patógeno humano ha sido lento, debido principalmente al desconocimiento de su mecanismo de acción (DOGGETT,1979). Aunque el poder patógeno de P. aeruginosa para el hombre lo describió Fraenkel en 1917, hasta 30 años después su presencia en infecciones humanas no era muy frecuente y difícilmente se asociaba con sepsis e infecciones adquiridas en hospitales. Durante las tres últimas décadas ha ido adquiriendo cada vez mayor importancia, desplazando

a otros microorganismos como Staphylococcus aureus. TRUETA en 1938 describió la existencia de antagonismo entre distintos grupos de bacterias. La presencia de P. aeruginosa en heridas provocaba una incompatibilidad de este germen con los microbios piógenos. Estos hechos han conducido a la realización de unos estudios más amplios sobre su fisiología y patología (BALTCH et al., 1979).

## 2.1. CARACTERISTICAS DE P. aeruginosa

### 2.1.1. MORFOLOGIA

#### - TAMAÑO Y FORMA

P. aeruginosa es un bacilo Gram-negativo, cuyas dimensiones generalmente se encuentran entre 0,5-0,8 x 1,5-3,0  $\mu\text{m}$ . Estas dimensiones pueden variar considerablemente debido a la presencia de material celular o glicocálix asociado con la membrana exterior de la cubierta celular. Este microorganismo se encuentra solo, en parejas o formando pequeñas cadenas. P. aeruginosa es móvil por flagelación monotrica polar, aunque el número y posición de los flagelos puede variar en determinadas cepas (DOUDOROFF y PALLERONI, 1974; DOGGETT, 1979; SUZUKI e IINO, 1980).

- CUBIERTA CELULAR

La cubierta celular es la estructura a través de la cual la bacteria se relaciona con el medio ambiente. En P. aeruginosa tiene una extrema importancia en la persistencia y crecimiento de este microorganismo en diversos hábitats (COSTERTON et al., 1979).

Está bien establecido que P. aeruginosa es resistente a una gran variedad de agentes tóxicos a niveles significativamente más altos que la mayoría de las bacterias entéricas. Según evidencia experimental, esta resistencia intrínseca es debida a la estructura externa de P. aeruginosa. La membrana citoplasmática es la principal barrera en esta resistencia intrínseca a la estreptomicina, tetraciclina y actinomicina D; la envuelta exterior también es una barrera efectiva frente a la entrada de muchos antibióticos (MILLS y HOLLOWAY, 1977).

En P. aeruginosa se han caracterizado varios tipos de fimbrias, incluyendo las más comunes (PSA), que son polares, y otras de las que no se conoce su función. Adicionalmente se han identificado las fimbrias RP4, R130 y W, en las que su presencia está determinada por plásmidos R.



La mayoría de las fimbrias de P. aeruginosa actúan como receptores de distintos virus bacterianos (GILLELAND et al., 1973; HOLLOWAY, 1975; BRADLEY, 1977).

La estructura de la cubierta celular de P. aeruginosa es la típica de las bacterias Gram-negativas. Observándola al microscopio electrónico se pueden diferenciar las siguientes zonas : glicocálix, membrana exterior, zona transparente a los electrones, peptidoglicano, zona transparente a los electrones y membrana citoplasmática (EAGON, 1974; EAGON et al., 1975).

La parte externa, denominada glicocálix, a menudo es referida como cubierta mucosa o cápsula. Se ha observado la presencia de glicocálix especialmente en cepas aisladas de pacientes con fibrosis cística (COSTERTON y CHENG, 1975). Este glicocálix está formado por moléculas lineales de polisacáridos, constituyendo una estructura organizada que rodea toda la célula. No existe evidencia de la presencia de una estructura membranosa asociada con las regiones exteriores del glicocálix, observándose a menudo variaciones y deformaciones. Estas se evidencian en las preparaciones observadas al microscopio electrónico (DOGGETT, 1979). La célula se pone en contacto con el

huésped a través de zonas específicas de enlace del glicocálix, siendo también responsable de la unión célula-célula, resistiendo mejor estos agregados a la fagocitosis (COSTERTON et al., 1979).

La literatura existente sobre la composición del glicocálix es aparentemente contradictoria, debido a las variaciones que se pueden producir según el método de extracción empleado. COSTERTON et al. (1979) consideran que el glicocálix está compuesto principalmente por moléculas lineales de polisacáridos, altamente organizadas, formadas por ácidos poliurónicos. Entre éstos describen el ácido D-manurónico y el ácido L-glucurónico como los más abundantes.

La envuelta exterior tiene una importancia especial en los mecanismos de resistencia de P. aeruginosa. En el modelo propuesto por COSTERTON (1977) (FIGURA 1) se observan unas protuberancias que forman una barrera de LPS en la zona más distante de la superficie externa. La base continúa de la envuelta está formada por fosfolípidos y proteínas con la misma estructura que la membrana típica de Robertson, sobre la cual se encuentran distribuidos de forma desigual los LPS. Las lipo-

- |     |  |    |   |
|-----|--|----|---|
| + - | Catión y anión libres  | ep | Enzimas localizados en la zona periplásmica                   |
| •   | Catión y anión de enlace   | es | Enzimas localizados en la superficie celular                  |
| ••  | Punto de adhesión producido por enlace iónico  | lp | Lipoproteína de Braun   |
| ••• | Zona hidrofóbica   | p  | Proteínas estructurales y enzimáticas de la membrana exterior |
| —   | Polipéptido de unión en el peptidoglicano  | ps | Permeasa  |
| —   | Porción de polisacárido del peptidoglicano   | s  | Proteína estructural de la membrana citoplasmática            |
| ~   | Proteína activa enzimáticamente  |    |   |
| ~   | Fosfolípido  |    |   |
| ~   | Lipopolisacárido   |    |   |
| bp  | Proteína de enlace   |    |   |
| cc  | Carbohidrato capsular  |    |   |
| cp  | Proteína capsular  |    |   |
| ec  | Enzimas asociados con la membrana citoplasmática, función dirigida al citoplasma                                 |    |   |
| em  | Enzimas asociados con la membrana citoplasmática que sintetizan componentes macromoleculares de la pared celular |    |   |

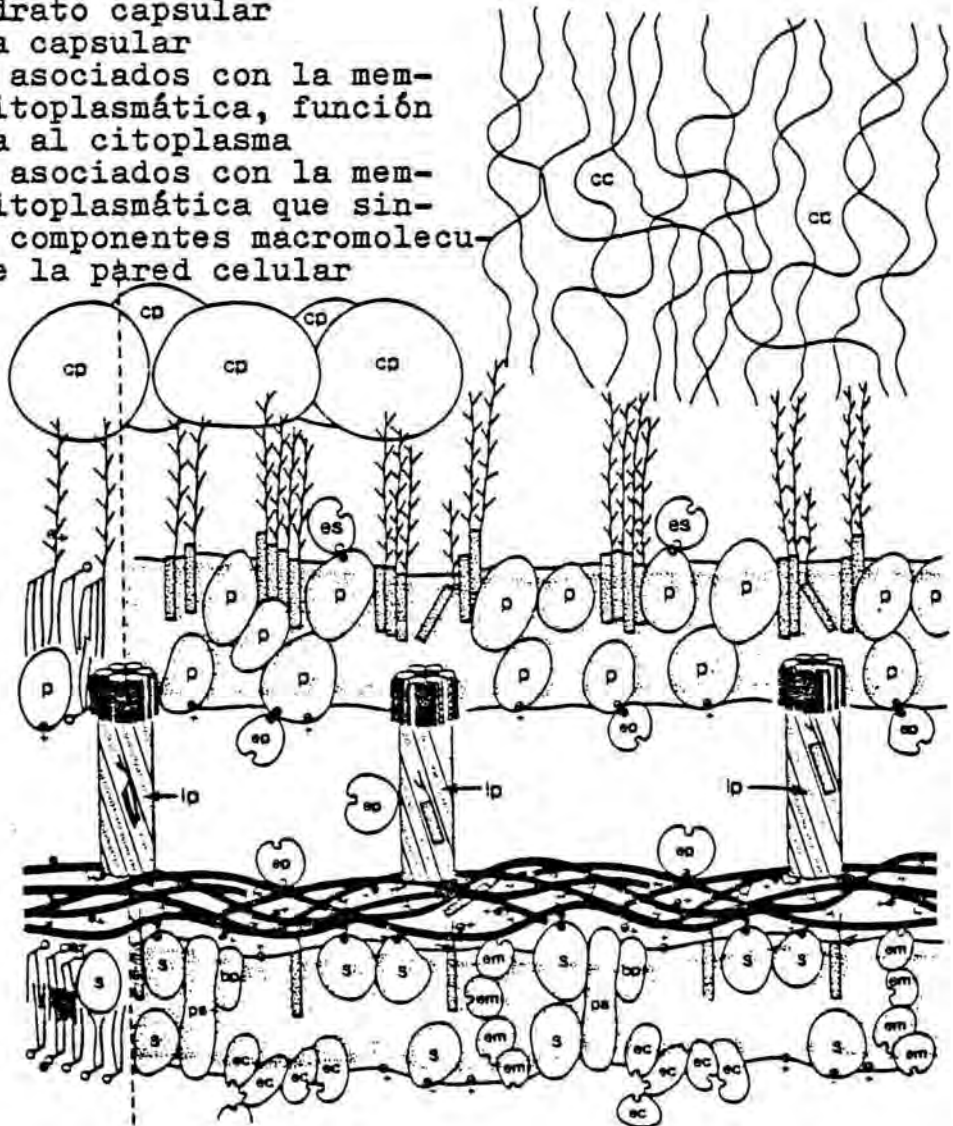


FIGURA 1 Estructura de la cubierta celular de P.aeruginosa.  
(COSTERTON, 1977)

proteínas unen la zona interior de esta envuelta con el peptidoglicano mediante interacción hidrofóbica con la envuelta exterior y enlaces covalentes con el peptidoglicano (BROWN, 1975).

Según EAGON et al. (1975), la cubierta de las cepas de P. aeruginosa, desarrolladas en un medio complejo, contiene 55-65% de LPS, siendo su composición parecida al de las Enterobacteriaceae. Se diferencian en su contenido más alto de fósforo (4,3%) y en el bajo contenido de azúcar (16-17%). Los azúcares característicos del LPS son heptosa, glucosa y ramnosa; también tiene manosa (JARREL y KROPINSKY, 1978). Se ha evidenciado a su vez presencia de galactosamina, alanina y ácido 2 ceto-3-desoxioctónico. La parte lipídica del LPS, lípido A, es la parte hidrofóbica, realizándose en esta zona la unión del LPS con la membrana exterior (MEADOW, 1975).

Los componentes hidrofóbicos de esta doble envuelta son los ácidos grasos de las moléculas de fosfolípidos en la parte interior de la envuelta y los ácidos grasos de las moléculas de los LPS en la parte exterior. Debido al pequeño tamaño de las partes polares de los fosfolípidos algunos ácidos grasos se hallan al descubierto y la cara

interior de la envuelta es hidrofóbica. Las partes polares distales de las moléculas de los LPS son extensas y complejas. La parte externa de la envuelta exterior se caracteriza por la presencia de un número elevado de fibras de polisacáridos que forman claramente una capa hidrofílica. Dentro de esta bicapa asimétrica están distribuidos un número elevado de cuatro tipos distintos de proteínas, agrupándose algunas de estas proteínas formando unos poros a través de los cuales las moléculas hidrofílicas menores de 600 daltons pueden pasar por difusión (BROWN, 1975; COSTERTON et al., 1979).

En consecuencia, la envuelta exterior forma una interesante barrera, excluye las moléculas hidrofóbicas pequeñas debido a su cara exterior hidrofílica y es atravesada por moléculas hidrofílicas de mayor tamaño debido a la presencia de poros formados por proteínas. En esta membrana no se ha observado ningún sistema de transporte, actuando como un cedazo para los antibióticos hidrofílicos y como una gran barrera para los antibióticos hidrofóbicos (COSTERTON et al., 1979).

A pesar de estar clara la estructura de la envuelta exterior de P. aeruginosa, se intenta buscar una explica-

ción a la elevada resistencia que presenta este microorganismo. Existen ciertas propiedades en la resistencia de P. aeruginosa, que a pesar de estar también descritas en algunas bacterias Gram-negativas, parecen ser altamente específicas para este microorganismo. Estas propiedades son la sensibilidad al EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético) y las polimixinas, que ejercen su efecto letal al actuar sobre la envuelta exterior más que directamente en la membrana citoplasmática (WILKINSON, 1967; COSTERTON et al., 1979).

El EDTA es particularmente activo frente a P. aeruginosa, provocando una lisis celular rápida (WILKINSON, 1967 y 1968; ROBERTS et al., 1970; GILLELAND et al., 1973; WILKINSON et al., 1973; BOGGIS et al., 1979; BRYAN, 1979; NICAS y HANCOCK, 1980). Los cationes metálicos juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural y las características de permeabilidad. El EDTA actúa extrayendo los cationes divalentes funcionales del envoltorio celular ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y un complejo formado por un 30% de LPS, 10% de lípido y 60% de proteína (ROBERTS et al., 1970; DREWRY et al., 1971; STINNETT et al., 1973), que forman unidades esféricas, produciendo

do su pérdida la aparición de osmoplastos (células frágiles osmóticamente). Las cepas de P. aeruginosa se vuelven resistentes a la acción del EDTA cuando crecen en un medio deficiente en  $Mg^{2+}$  (GILLELAND et al., 1974; NICAS y HANCOCK, 1980). El EDTA potencia la acción de la lisozima y de agentes bactericidas al desorganizar la envuelta exterior facilitando la penetración y la acción de agentes antimicrobianos (WILKINSON, 1967; BROWN, 1975).

Las polimixinas tienen una alta especificidad para P. aeruginosa. Probablemente el principal lugar de acción son los fosfolípidos de la membrana citoplasmática, reduciendo su función, así como otras funciones relacionadas como transporte y síntesis. Sin embargo, la membrana citoplasmática no tiene ninguna característica que le confiera a P. aeruginosa una sensibilidad o resistencia especial. Por lo tanto la marcada sensibilidad debe de ser a nivel de envuelta exterior, produciendo el antibiótico una desorganización al antagonizar los cationes divalentes, perdiéndose el equilibrio osmótico (BROWN, 1975; EAGON et al., 1975; STEVENS y OTTOLENGHI, 1977), teniendo el mismo lugar de acción que el EDTA (BOGGIS et al., 1979; KENWARD et al., 1979).

Entre las propiedades características de la envuelta exterior de P. aeruginosa podemos citar la labilidad relativa, posiblemente debido a una menor proporción de lipoproteína que actúa de anclaje al peptidoglicano, su sensibilidad a los cambios rápidos de pH, temperatura y presión osmótica (BROWN, 1975; COSTERTON et al., 1979).

El LPS aislado de P. aeruginosa es el responsable de los antígenos O específicos, estables al calor. La parte responsable de esta reacción está localizada en las fracciones del polisacárido de alto peso molecular, obtenido después de la hidrólisis con ácido acético. La membrana exterior actúa a su vez como receptor de bacteriófagos y aeruginocinas. Los resultados obtenidos hasta la actualidad sugieren que los receptores de las aeruginocinas R y de algunos bacteriófagos están localizados en los LPS de la membrana exterior (MEADOW, 1975).

El espacio periplasmático comprende la zona entre las dos envueltas, incluyendo el peptidoglicano y las moléculas liberadas por la membrana citoplasmática. Las lipoproteínas periplasmáticas unen la superficie interna de la membrana exterior con la estructura del peptidoglicano, teniendo P. aeruginosa menos enlaces que Esche-



richia coli, pudiendo ser ésta una de las razones de la gran sensibilidad y fragilidad al EDTA. La zona periplasmática no representa un gran impedimento en la penetración de las drogas, pero juega un papel importante en la inactivación enzimática habiéndose aislado  $\beta$ -lactamasas, fosforilasas y adenilasas (BROWN, 1975; MEADOW, 1975; COSTERTON et al., 1979).

El peptidoglicano forma una capa fina (1% peso seco), siendo una de sus principales funciones el dar rigidez a la bacteria (MEADOW, 1975). La lisozima ataca al peptidoglicano, pero no se produce lisis pues en P. aeruginosa hay otros factores que ayudan a mantener la rigidez, como los acciones divalentes. Esta zona también constituye una barrera de penetración, actuando como un tamiz para las moléculas (BROWN, 1975). Está formado por ácido glutámico, ácido 2,5-diaminopimélico (DAP), alanina, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. La estructura se forma con repeticiones de  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina,  $\beta$ -1,4 ácido N-acetilmurámico. En los grupos carboxilos del ácido murámico se unen las cadenas laterales peptídicas con la siguiente secuencia :  $\text{NH}_2$ -(L-Ala,D-glu)-DAP-D-Ala-COOH, apareciendo aproximadamente en cada uno de cuatro DAP un enlace cruzado, resultando una estruc-

tura en forma de red (CLARKE et al., 1967 ; HEILMANN, 1972; EAGON et al., 1975; MIRELMAN y NUHAMOWITZ, 1979).

La estructura de la membrana citoplasmática es igual en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, teniendo en el caso de P. aeruginosa una proporción más elevada de proteínas estructurales o enzimáticas. Esta característica está relacionada con su gran versatilidad metabólica (MEADOW, 1975; COSTERTON et al., 1974). La membrana citoplasmática es la principal barrera de permeabilidad, efectuándose transporte activo mediante la acción de permeasas codificadas por uno o varios genes, siendo la única forma de que las sustancias hidrofílicas se introduzcan en el interior de la célula. Esta estructura también está muy relacionada con la fosforilación oxidativa, la replicación del ADN y síntesis proteica (BROWN, 1975; COSTERTON et al., 1979).

La capacidad de P. aeruginosa de vivir bajo distintas condiciones está en función de la composición de la cubierta celular que le protege de moléculas tóxicas, anticuerpos y antibióticos. Las características que hacen de P. aeruginosa un patógeno efectivo radican en

parte en esta estructura (COSTERTON et al., 1979).

## 2.1.2. FISILOGIA

### - METABOLISMO

P. aeruginosa es un microorganismo ubicuo. Puede crecer en medios simples con sales de amonio como fuente de nitrógeno y un número elevado de compuestos orgánicos como fuente de carbono. Se ha descrito que este microorganismo es capaz de utilizar más de 100 compuestos de carbono distintos para su crecimiento. Es capaz de sintetizar aminoácidos, nucleótidos y todos los compuestos esenciales celulares. Esta versatilidad nutricional refleja la presencia de una cantidad sustancial de información genética especializada que tan sólo se expresa en ciertas ocasiones (STANIER et al., 1966; DOUDOROFF y PALLERONI, 1974; CLARKE y ORNSTON, 1975<sub>a</sub>; LUI, 1976; STANIER et al., 1977).

Es un microorganismo aerobio, obteniendo su energía a partir de reacciones oxidativas. Puede utilizar nitratos como única fuente de nitrógeno para crecer (reacción de asimilación); también puede crecer en condicio-

nes anaerobias utilizando el nitrato como aceptor final de electrones, suministrando una vía para la fosforilación oxidativa (nitrato respiración). Se han purificado dos enzimas responsables de esta reacción, una nitrato reductasa unida a la membrana que contenía molibdeno, FAD y citocromo c, la cual reducía el nitrato a nitrito en presencia de NADH. Esta nitrato reductasa (A) parece estar relacionada con la nitrato respiración y era reprimida por el oxígeno (CLARKE y ORNSTON, 1975<sub>a</sub>), mientras que la segunda nitrato reductasa (B) identificada por PICHINOTY et al. (1969), era constitutiva y parecía estar relacionada con la asimilación de nitrato; sin embargo, estas dos actividades no deben ser entes completamente aislados.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, desarrollándose rápidamente. Es capaz de crecer a 42°C y en algunas ocasiones incluso a 44°C, lo que le diferencia de otras Pseudomonas. No crece a temperaturas de 5°C o inferiores (PALLERONI, 1975).

Produce un olor característico a uva, tanto en medio de cultivo como en heridas. El compuesto responsable del olor es una 2-aminoacetofenona que aparece a las 20-24

horas de incubación. La producción máxima es a las 24 horas, descendiendo después rápidamente, aunque se acumula en el medio. La detección de este olor característico es una ayuda para la identificación de P. aeruginosa (COX y PARKER, 1979).

Los citocromos se encuentran organizados en la membrana bacteriana como parte de la estructura de la cadena de transporte de electrones, relacionándose con las reacciones de fosforilación oxidativa. En P. aeruginosa se han aislado dos tipos de citocromo oxidasas, tal como señalan CLARKE y ORNSTON (1975<sub>a</sub>) :

- Un tipo procedente de cultivos que crecen anaeró- bicamente en presencia de nitrato. Este citocromo oxidasa presentó actividad nitrato reductasa, esta- ba unido a la membrana y contenía citocromo c y d. Las actividades nitrato reductasa y citocromo oxi- dasa estaban ambas presentes en la preparación puri- ficada y se le denominó c-(551 P. aeruginosa): ní- trito O<sub>2</sub> oxidoreductasa.
  
- Existe evidencia de la presencia de otra actividad

citocromo oxidasa tanto en los cultivos aerobios como anaerobios. Esta actividad se localizó en su totalidad en una pequeña fracción obtenida por disrupción de la membrana bacteriana. Es de destacar que la citocromo oxidasa aerobia era fuertemente reprimida por la glucosa, mientras que la nitrito reductasa-citocromo oxidasa anaerobia no era afectada por la presencia de glucosa en el medio.

A pesar de que Pseudomonas es bioquímicamente muy versátil, pocas especies son capaces de metabolizar azúcares y compuestos relacionados. La ruta de EMBDEN-MEYERHOF está totalmente ausente en las Pseudomonas y la mayoría de las hexosas y sus derivados son metabolizados mediante reacciones de la ruta ENTNER-DOUDOROFF. D-manosa, D-fructosa y D-glucosa son fosforiladas y la glucosa-6-fosfato es oxidada vía la formación intermediaria del 6-fosfogluconato lactona a 6-fosfogluconato. Este compuesto puede seguir la vía de ENTNER-DOUDOROFF o convertirse mediante una oxidación y una descarboxilación en ribosa-5-fosfato y entrar en la ruta de ribulosa-5-fosfato. Las reacciones del ciclo pentosa fosfato pueden proporcionar pentosas para biosíntesis y proveer coenzimas nucleótidos reduci-

dos, particularmente NADPH, pero la asimilación completa de las hexosas implica las reacciones de la ruta de ENTNER-DOUDOROFF, la cual produce finalmente intermediarios que entran en el ciclo del ácido tricarboxílico (CLARKE y ORNSTON, 1975<sub>b</sub>; BROCK, 1976).

P. aeruginosa es capaz de metabolizar los ácidos grasos de dos a diez carbonos. Los hidrocarburos de cadena alifática lineal son metabolizados en el medio ambiente por muchas bacterias incluyendo el género Pseudomonas. P. aeruginosa crece en presencia de hexadecano y dodecano como fuentes de carbono, diferenciándose así de otras especies del grupo fluorescens (STANIER et al., 1966). Los hidrocarburos ramificados y alquilalcanos son degradados en menor proporción, no creciendo bien en presencia de di-propildodecano o 2,6,10,14 tetrametilpentadecano, pero sí en presencia de metilhexano. Los compuestos aromáticos utilizados por P. aeruginosa son metabolizados mediante la vía de  $\beta$ -cetodipato (CLARK y ORNSTON, 1975<sub>b</sub>).

Muchas especies de Pseudomonas son capaces de utilizar las amidas en su metabolismo. P. aeruginosa produce una reacción alcalina en medio con glucosa y acetamida, pudiéndose utilizar esta característica para diferenciarla

de otras Pseudomonas del grupo fluorescens. STANIER et al. (1966) observaron que todas las cepas identificadas como P. aeruginosa crecían en placas de medio mínimo con acetamida como fuente de carbono, siendo la acetamidasa una actividad representativa de P. aeruginosa.

Las Pseudomonas no son exigentes respecto a los aminoácidos, sus vías biosintéticas son comparables con las establecidas para otros grupos de bacterias. P. aeruginosa crece en presencia de 18 aminoácidos, aunque algunas cepas crecen poco o no crecen en presencia de lisina e histidina, a pesar de poseer la mayoría de los enzimas necesarios para su metabolismo. Metionina, treonina y cistina los emplea tan sólo como fuente de carbono (CLARKE y ORNSTON, 1975<sub>b</sub>).

En casi todos los casos en que se han estudiado las rutas catabólicas y su regulación, se ha observado que Pseudomonas posee un gran potencial metabólico. Esta aparente redundancia metabólica permite a la célula atacar un número elevado de compuestos. La agrupación de genes de rutas metabólicas, especialmente en plásmidos transmisibles, es una característica general de Pseudomonas.



Esto crea una ventaja, permitiendo a la población utilizar un amplio rango de sustratos (CLARKE y ORNSTON, 1975<sub>b</sub>; ANDERSON et al., 1980).

#### - PIGMENTOS

P. aeruginosa pertenece al grupo de las Pseudomonas fluorescentes. Estos microorganismos producen unos pigmentos solubles en agua (pioverdinas) que presentan fluorescencia cuando se exponen a la luz de Wood (254 nm) (COWAN, 1974; HUGH y GULARDI, 1980). Los pigmentos fluorescentes pueden ser de color amarillo-verde, amarillo-marrón o sin color; son difusibles en el medio de cultivo; no son solubles en cloroformo. La producción de pioverdinas está influenciada por la concentración de hierro del medio. Agar *Pseudomonas* F favorece la síntesis de pigmentos fluorescentes, tendiendo a suprimir la producción de piocianina y otros pigmentos fenacínicos (DOUDOROFF y PALLERONI, 1974; PALLERONI, 1975; DOGGETT, 1979; LUI, 1979).

La mayoría de las cepas producen piocianina, pigmento fenacínico, soluble en agua y cloroformo, no fluorescente, de color azul en medio alcalino o neutro y rojo en

medio ácido (DOUDOROFF y PALLERONI, 1974). La piocianina es sensible a la fotoinactivación por la luz de longitud de onda inferior a 371 nm, región del u.v. y violeta del espectro, produciéndose una pérdida de color (PROPST y LUBIN, 1979).

P. aeruginosa es la única especie del género Pseudomonas o bacilo Gram-negativo conocido que excreta piocianina. Por lo tanto, se puede afirmar que cualquier bacilo Gram-negativo que excrete piocianina es una P. aeruginosa. El agar Pseudomonas P y el agar Cetrimide favorecen la formación de piocianina y otros pigmentos fenacínicos. Las cepas que producen piocianina y pioverdinas amarillentas a menudo imparten al medio color verde (CLANCY, 1973; COWAN, 1974; LIU, 1976; DOGGETT, 1979; RAMOS CORMENZANA, 1979; HUGH y GILARDI, 1980).

Las cepas de P. aeruginosa pueden sintetizar varias combinaciones de piocianina, pioverdina, piorrubina (pigmento rojo, soluble en agua) y piomelanina (pigmento de color marrón a negro, soluble en agua, lo producen menos del 3% de las cepas aisladas en clínica), pudiéndose enmascarar la piocianina por la presencia de los demás pigmen-

tos. En la TABLA 1 se encuentran descritos los pigmentos producidos por P. aeruginosa. Algunas cepas no producen piocianina; esto puede ser debido a la presencia de una mutación, creando problemas en su identificación (DOU-DOROFF y PALLERONI, 1974; HUGH y GILARDI, 1980).

#### - TOXINAS

La emergencia de P. aeruginosa como un importante patógeno durante los últimos 20 años ha sido debida principalmente a su resistencia a los antibióticos. La escasa eficacia de las drogas en controlar esta infección conduce a intentar usar métodos inmunológicos, siendo necesario para su estudio el entender la patogénesis del microorganismo (LIU, 1979).

Uno de los primeros autores que profundizó en este campo fue Wasserman, al observar en 1896 que los componentes celulares de P. aeruginosa eran poco tóxicos y que la toxicidad aparecía extracelularmente. Realmente no se concluyó que la patogénesis de P. aeruginosa era en gran parte debida a toxinas extracelulares termolábiles, hasta que LIU en 1961 describió que su presencia junto con el deterioro local de los tejidos por dichos factores provoca

TABLA 1

Pigmentos producidos por P. aeruginosa (HUGH y GILARDI, 1980).

<u>Pigmento</u>	<u>Estructura fenacínica</u>	<u>Color</u>	<u>Fluorescencia</u>
Piocianina	+	azul	-
Piorrubina (aeruginosina A)	+	rojo	-
Piorrubina (aeruginosina B)	+	rojo	-
Pioverdina (fluoresceína)	-	amarillo-verde	+
Pioverdina (fluoresceína)	-	incoloro	+
Piomelanina	-	marrón-negro	-
Pioverdina (fluoresceína sustancia C)	-	amarillo-marrón	+

la aceleración de la infección por P. aeruginosa. De esta forma se desechó la teoría de que la patogenicidad de P. aeruginosa como Gram-negativo era debida tan sólo a la presencia de endotoxinas (BALCH et al., 1979).

El significado de los pigmentos de P. aeruginosa, particularmente de los pigmentos fenacínicos, en la patogénesis de estos microorganismos, probablemente está relacionado con su efecto inhibitorio frente a otras bacterias. Este efecto es conocido desde la antigüedad, habiéndose empleado un extracto llamado piocianasa para tratar infecciones bacterianas, pudiéndose considerar como el primer antibiótico empleado (KURYLOWICZ et al., 1976; HAMOND y LAMBERT, 1978). Los efectos tóxicos de la piocianina frente a animales vivos son tan escasos que no se conoce la dosis letal mínima, teniendo por lo tanto escasa importancia como factor tóxico (LIU, 1979).

#### - Enzimas proteolíticos

Una de las características más conocidas de P. aeruginosa es su actividad proteolítica. Se ha observado una relación entre las lesiones hemorrágicas y necróticas y las protea-

sas (LIU, 1979). MORIHARA en 1964 describió tres tipos distintos de proteasas :

- Fracción I proteasa, neutra, se encuentra en poca cantidad sin tener gran importancia.
- Fracción II, semialcalina, de peso molecular 39500 y actividad elastásica.
- Fracción III, alcalina, sin actividad elastásica y con peso molecular de 48400.

Considerando el papel de las proteasas en la patogénesis de P. aeruginosa, parece ser que tienen efecto localizado en los tejidos. No son los factores responsables del efecto tóxico de la infección, porque no hay correlación entre las actividades proteolíticas de las cepas de P. aeruginosa y su virulencia mediada por el número de células necesarias para matar animales. Aparece incluso una correlación inversa entre la producción de proteasas y virulencia, como resultado de la autodigestión por las proteasas de la toxina producida (LIU, 1979; SOKOL et al., 1979; HOMMA, 1980).

- Toxinas hemolíticas

La producción de sustancias hemolíticas por P. aeruginosa fue descrita en 1900 por Bullock y Hunter. Esta sustancia hemolítica era soluble en solventes de lípidos, a diferencia de otras hemolisinas bacteriana de naturaleza proteica. LIU en 1957 describe dos tipos de hemolisinas :

- Glicolípido, resistente al calor y soluble en alcohol.
- Fosfolipasa C, termolábil.

En muchos casos de infecciones por P. aeruginosa en piel y sangre, la fosfolipasa no es un factor importante en la letalidad de la infección, aunque puede contribuir en la formación de lesiones locales. La fosfolipasa se fija rápidamente en los tejidos celulares en los que ejerce su efecto, pero no es transportada a la circulación sanguínea para actuar como una toxina letal. Su producción varía según la cepa y las condiciones del medio (LIU, 1976 y 1979).

- Toxina letal, exotoxina A

El efecto letal de P. aeruginosa es la consecuencia más seria de la infección por este microorganismo. Se creyó durante mucho tiempo que este efecto era producido por una endotoxina. Sin embargo, la toxicidad de las células muertas de esta especie es muy baja. No hay una diferencia significativa en la toxicidad de las células muertas de una cepa a otra, a pesar de que la virulencia y la letalidad varía mucho en los cultivos vivos de P. aeruginosa (LIU, 1979).

Esta gran toxicidad es debida a la presencia de una exotoxina que puede ser fácilmente inactivada calentando a 60°C durante 10-20 minutos. La producción de la toxina requiere aerobiosis y presencia de glicerol como fuente de carbono. Los ácidos nucleicos ARN y ADN inhiben un poco la producción de toxinas, incrementándose esta inhibición al calentar los ácidos nucleicos por la aparición de cadenas sencillas de dichos ácidos. La exotoxina A se puede concentrar por precipitación con acetato de cinc y sulfato de amonio, purificándose mediante cromatografía.



El producto final es una proteína de peso molecular comprendido entre 6500-50000 con una  $DL_{50}$  en ratón de 8000/mg proteína (LIU, 1979).

Esta proteína tiene una gran cantidad de aminoácidos, que se caracterizan por su bajo punto isoeléctrico, teniendo una gran proporción de arginina y lisina. La composición de aminoácidos no muestra similaridad con la toxina diftérica, aunque actúan de forma parecida a nivel subcelular. La toxina se puede convertir fácilmente en un toxoide utilizando formol al 4%, manteniendo la mezcla a 4°C. Pierde su toxicidad dentro de las primeras 24 horas, conservando su poder antigénico durante 3-4 semanas (LIU, 1979).

La exotoxina A tiene actividad NADasa, idéntica que el fragmento A de la toxina diftérica, pero se diferencia de esta última en que no necesita realizar ninguna modificación para verificar su función. La exotoxina A interfiere con el factor 2 del enzima de elongación (EF-2) que normalmente une los nuevos aminoácidos a la cadena peptídica que se está formando en el ribosoma,

causando como consecuencia la muerte de la célula. Su mecanismo de acción se puede observar en la FIGURA 2 (CALLAHAN III, 1976; LIU, 1976; VASIL et al., 1976; MIDDELBROOK y DORLAND, 1977; BALTCH et al., 1979; LIU, 1979; HOMMA, 1980).

#### - El glicocálix

La función del glicocálix en la patogénesis de P. aeruginosa fue descrita por primera vez por LIU en 1961, observando la presencia de considerable toxicidad en el ratón. La función del glicocálix es parecida a la de la cápsula, protegiendo al microorganismo contra la fagocitosis del huésped. Debido a su propia toxicidad se puede considerar como un tipo de toxina, aunque no se sabe exactamente el papel que juega en la virulencia de P. aeruginosa puesto que una gran producción de glicocálix no parece ser suficiente para volver a este microorganismo virulento.

#### - Endotoxinas

La patogénesis de P. aeruginosa se debe principalmente a sus productos extracelulares, mientras que el papel de

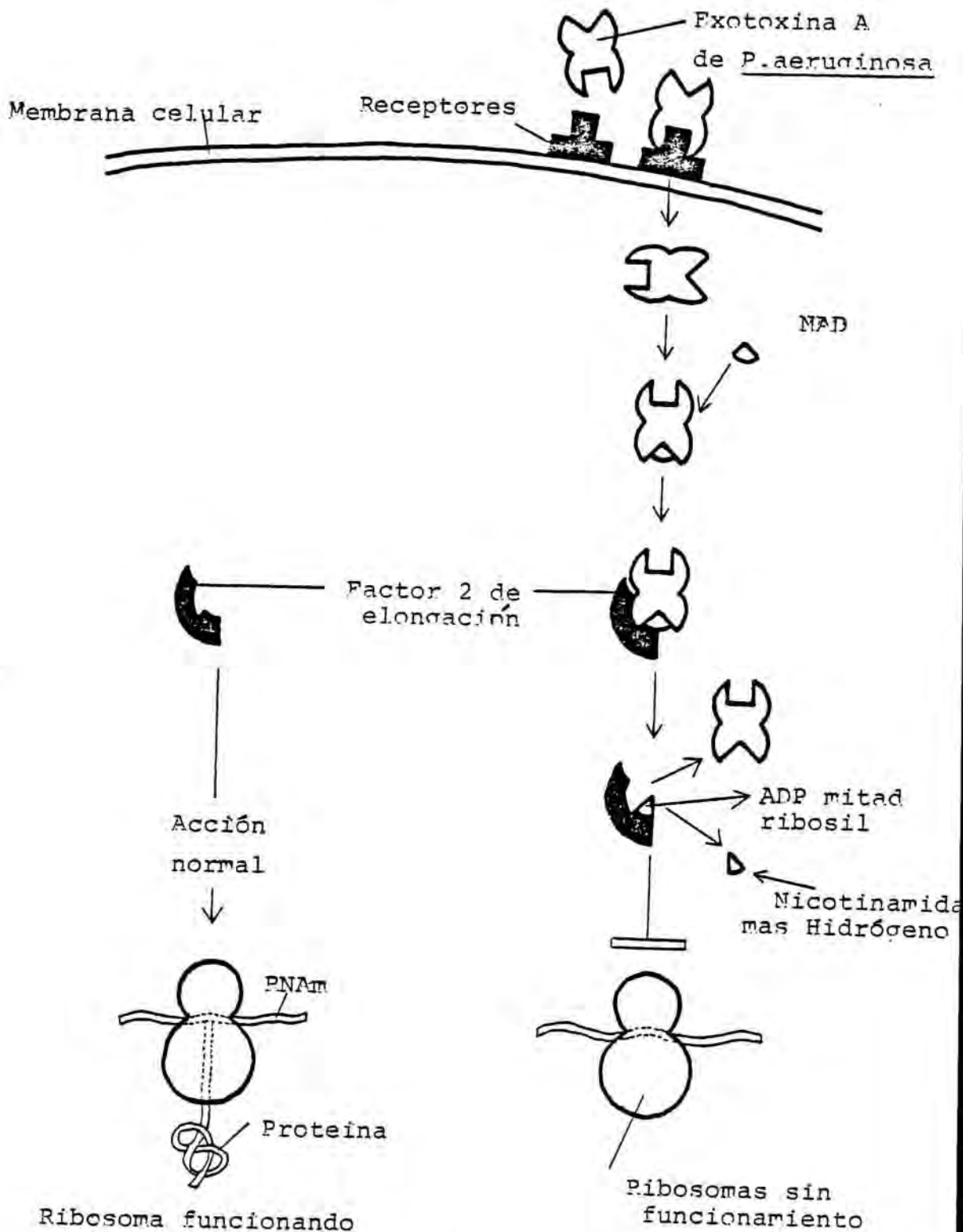


FIGURA 2 Mecanismo de acción de la exotoxina A de *P. aeruginosa*. (LIU, 1976)

los LPS es de escasa importancia. A pesar de esto, diversos autores han estudiado los LPS de la cubierta celular de P. aeruginosa, especialmente su toxicidad. Se han obtenido resultados muy diversos según el método empleado en la extracción. La extracción con fenol y agua ha dado una mayor toxicidad con una  $DL_{50}$  de 840  $\mu$ g peso seco (intraperitoneal) (EAGON et al., 1975; COSTERTON et al., 1974; COSTERTON, 1977).

Cuando las células vivas de P. aeruginosa se rompen aparecen en la solución unas sustancias tóxicas lábiles al calor, aparentemente de naturaleza proteica. No se conoce exactamente la localización de estas proteínas tóxicas; parece ser que no forman parte de la pared celular porque existen unas grandes variaciones entre cepas relacionadas. Actualmente se les denomina toxinas intracelulares, aunque todavía no hay evidencia que indique que este tipo de proteína juegue un papel importante en la patogénesis de este microorganismo (LIU, 1979).

Revisando la capacidad de las cepas de P. aeruginosa de producir varios tipos de toxinas, es remarcable la variedad de toxinas que pueden producir y la variación de las

características de éstas según las cepas. Esta variabilidad en la producción de toxinas seguramente está relacionada con las diferentes reacciones patológicas observadas en humanos producidas por distintas cepas de P. aeruginosa (LIU, 1979).

#### - AERUGINOCINAS

Las bacteriocinas son sustancias antibacterianas, de naturaleza proteica, producidas por un número elevado de especies bacterianas. Son activas principalmente frente a cepas de la misma especie o especies relacionadas (KAGEYAMA, 1964; REEVES, 1965; FARMER y HERMAN, 1974; HOLLOWAY y KRISHNAPILLAI, 1975; SIDBERRY y SADOFF, 1977; FAYDY y NABUT, 1978; GOVAN, 1978; KONISKY, 1978).

Sustancias de este tipo producidas por P. aeruginosa fueron identificadas por Jacob en 1954, recibiendo el nombre de piocinas, debido a la denominación que entonces recibía la cepa productora "P. pyocyanea". Con la posterior denominación de esta cepa como P. aeruginosa, el término de aeruginocina parece más correcto, aunque ambos términos están aceptados como sinónimos (HOLLOWAY y KRISHNAPILLAI, 1975).

- Determinantes genéticos de la producción de aeruginocinas

La producción de bacteriocinas por las Enterobacteriaceae se encuentra codificada por material genético extracromosómico (KONISKY, 1978).

A pesar de que la codificación de la producción de bacteriocinas mediante plásmidos es un hecho bien establecido para las Enterobacteriaceae, no está claro si esta generalidad se puede extender a todas las cepas productoras de bacteriocinas. En un número escaso de ocasiones se ha podido demostrar de forma directa la presencia de plásmidos que codifiquen la producción de bacteriocinas en bacterias Gram-positivas (KONISKY, 1978).

KAGEYAMA (1970) observó que en P. aeruginosa los determinantes genéticos de las aeruginocinas R1, R2, y R3 están unidos al cromosoma en posición trp. Este resultado es la única excepción en la codificación de bacteriocinas, pudiendo reflejar una evolución entre bacteriocinas derivadas de fagos y otros tipos.

- Producción de aeruginocinas y estructura

La producción de bacteriocinas es un fenómeno muy extendido. Las cepas que producen bacteriocinas, a pesar de que posean determinantes genéticos estables que codifican su producción, no las producen durante todo el tiempo, ni en cualquier condición (REEVES, 1965).

La producción de bacteriocinas es inducida por muchos agentes que producen inducción en bacterias lisogénicas. Es razonable que ambos procesos tengan características comunes a nivel molecular, aunque existe una diferencia fundamental: la inducción de los fagos requiere una replicación del genoma del fago y la replicación del plásmido Col no es un prerequisite para la inducción de la síntesis de la colicina (bacteriocina producida por E. coli). Los mecanismos de regulación que operan en la inducción de bacteriocinas están considerados a menudo dentro del sistema de control negativo que dirige la inducción del profago  $\lambda$ . Aunque ambos sistemas son análogos en bastantes características, aparecen diferencias importantes. La inducción de bacteriocinas con frecuencia es letal para la cepa productora, posiblemente debido a la inducción de profagos. La luz u.v. y la mitomicina C son los agentes más frecuentemente empleados en la inducción (KONISKY, 1978).

La mayoría de las bacteriocinas no se encuentran relacionadas estructuralmente respecto a la composición de los aminoácidos, mostrando una pequeña relación entre el modo de acción y la composición de los mismos, incluso en bacteriocinas producidas por la misma especie. El conocimiento del modo de acción de la mayoría de las bacteriocinas es a nivel superficial. Algunas parecen tener igual modo de acción, pero operan de forma diferente a nivel molecular. Es posible que bacteriocinas con modo de acción idéntico tengan una secuencia de homología limitada, no siendo por lo tanto aparente en la comparación de aminoácidos (KONISKY, 1978).

BRADLEY (1967) propuso la clasificación de las bacteriocinas en dos tipos : tipo R y tipo S. Las aeruginocinas de tipo R no son sensibles a los enzimas proteolíticos y tienen una estructura similar a los componentes de los bacteriófagos; no son dializables, difunden lentamente en agar y son sensibles a la tripsina (SIDBERRY y SADOFF, 1977).

Las aeruginocinas de tipo R, presentan una similitud con las colas de fagos. Están formadas por un único tipo de proteína con peso molecular de  $1 \times 10^7$  daltons, siendo comparables en su morfología, modo de acción y propie-



dades inmunológicas. Se mostró que las aeruginocinas R están formadas por un doble cilindro hueco con 1200 Å de largo y 150 Å de diámetro, con una zona central y una vaina contráctil (HOLLOWAY y KRISHNAPILLAI, 1975).

Las aeruginocinas tipo R se han clasificado en cinco grupos : R1, R2, R3, R4 y R5, en función de su actividad frente a diferentes cepas de P. aeruginosa pl4. La sensibilidad depende de la especificidad de los receptores en la superficie. Se ha propuesto un esquema mediante el cual los receptores para las aeruginocinas R2, R3, R4 y R5 se encuentran en disposición lineal, en proyección desde la superficie bacteriana. R1 se proyecta como una rama entre R2 y R5. Estos tipos están relacionados inmunológicamente entre si, así como con bacteriófagos atemperados encontrados en Pseudomonas (KONISKY, 1978).

Las aeruginocinas tipo S se caracterizan por su sensibilidad a los enzimas proteolíticos y la falta de estructura definida al microscopio electrónico. Tienen un bajo peso molecular de  $10^5$  daltons. Generalmente son sensibles a la tripsina, aunque se han observado algunas resistentes. Producen una amplia inhibición en medio sólido y no son neutralizadas con antisueros frente a aeruginocinas R

(OHKAWA et al., 1973; HOLLOWAY, 1975; MORSE et al., 1980).

GOVAN (1978) describió las aeruginocinas A2, A3 y tipo F, de bajo peso molecular. La aeruginocina A2 está asociada con la endotoxina de la pared celular y A3 deriva del protoplasma. El tipo F, de mayor peso molecular, parece la cola de un fago de Pseudomonas no contráctil. Cuando se produce en medio sólido casi no difunde. No se conoce su actividad ni sus receptores.

#### - Modo de acción

Una de las principales características descritas de las aeruginocinas es su estrecho campo de acción. A pesar de todo algunas de estas sustancias producidas por microorganismos Gram-positivos o Gram-negativos son activas frente a un número más amplio de bacterias. Esta característica se ha utilizado en algunas ocasiones con fines epidemiológicos. Como ejemplo, se puede citar la sensibilidad que presenta Neisseria gonorrhoeae a las aeruginocinas (SIDBERRY y SADOFF, 1977; MORSE et al., 1980).

Las aeruginocinas tienen acción bactericida. Las células son más sensibles en la fase logarítmica de crecimiento.

Con aeruginocinas de tipo R, una vez realizada la absorción y contracción de su vaina, se produce una reducción del metabolismo sin período de latencia. Las síntesis del ADN, ARN, proteínas y lípidos son completamente inhibidas; el transporte activo de aminoácidos se inhibe a su vez de forma marcada. El descenso de la captación de oxígeno se produce de forma más lenta (IKEDA y NISHI, 1973; BERGAN, 1975; OHKAWA et al., 1975; URATANI y KAGEYAMA, 1977).

Las aeruginocinas de tipo R aparentemente permanecen fuera de las células (BERGAN, 1975; HOLLOWAY, 1975; GOVAN, 1978; MORSE et al., 1980). Se puede producir también la liberación de material citoplasmático y en algunas ocasiones la lisis celular completa (BERGAN, 1975).

Las aeruginocinas S2 producen un cese inmediato en la incorporación de fosfato ( $P^{32}$ ), acetato ( $C^{14}$ ) o glicerol ( $H^3$ ) en los lípidos. También se produce la inhibición de la síntesis de las proteínas y ácidos nucleicos, pero con un retraso de 10 minutos respecto a la síntesis de lípidos. Se puede concluir que las aeruginocinas S2 tienen un efecto primario en la biosíntesis de los lípidos (OHKAWA et al., 1975; KONISKY, 1978; MORSE et al., 1980).

Según OHKAWA et al.(1973) una simple partícula de aeruginocina S2 es capaz de producir la muerte de una bacteria sensible.

El espectro de acción de las aeruginocinas está determinado por la presencia de receptores específicos en la superficie celular de las cepas sensibles (KAGEYAMA, 1964; OHKAWA et al., 1973). Los microorganismos sensibles absorben las aeruginocinas, pero no los resistentes. Es necesaria la contracción de las aeruginocinas tipo R para que se produzca la inhibición (MORSE et al., 1980). Los LPS están presentes en la absorción específica de las aeruginocinas con estructura similar a colas de fagos en cepas sensibles. La fracción del LPS aislado de cepas sensibles, pero no de las resistentes, es capaz de neutralizar la acción de varias aeruginocinas. En diferentes casos el estudio al microscopio electrónico ha permitido la visualización directa de partículas de bacteriocinas absorbidas al LPS aislado de cepas sensibles (KONISKY, 1978).

IKEDA y EGAMI (1973) y STEVEN y OTTOLENGHI (1977) opinan que las aeruginocinas al igual que las colicinas inician el proceso letal en bacterias susceptibles primero con absorción en receptores específicos de superficie, descri-

biendo estos receptores específicos en P. aeruginosa como LPS. Estos autores ponen en evidencia la naturaleza de los receptores de las aeruginocinas al realizar diversos tratamientos en la superficie celular, reduciéndose la absorción. Esto incluye la eliminación de lípidos celulares, el pretratamiento de cepas sensibles con concentraciones subinhibitorias de polimixina y el tratamiento con EDTA, lo cual produce la liberación de los LPS; otros agentes que alteran las proteínas y el mucopéptido como la tripsina, proteasa, lisozima y el calentamiento a 100°C, no afectan la absorción (IKEDA y NISHI, 1973; BERGAN, 1975).

- Poder antigénico

Las aeruginocinas son antigénicas en animales de experimentación y en el hombre mediante el curso de una infección natural, neutralizando de esta forma su actividad bactericida. La información de la estructura antigénica de las aeruginocinas puede ser de ayuda para conocer la relación entre la estructura y modelo de actividad de las aeruginocinas y las posibles implicaciones de la respuesta serológica humana a estas moléculas producidas por Pseudomonas (ALLEN y KELLY, 1975).

Los anticuerpos frente a una aeruginocina tienen la capacidad de neutralizar las aeruginocinas obtenidas a partir de una variedad de cepas de P. aeruginosa. Esto puede caracterizar a las aeruginocinas como un grupo de moléculas con igual función, pero que también tienen algunas características estructurales que son expresadas como determinantes antigénicos comunes. Existen por lo menos dos tipos antigénicamente distintos de aeruginocinas. Las aeruginocinas que pertenecen a un mismo tipo antigénico tienen una similitud funcional, pero no son idénticas. Esto puede ser debido a que los determinantes antigénicos estén colocados cerca del locus que determina su capacidad bactericida (ALLEN y KELLY, 1975).

Debido al gran número de microorganismos productores de bacteriocinas, esta característica parece significar una ventaja para estas bacterias. Es importante determinar cuál es la propiedad que les confiere esta característica, puesto que en muchos casos su producción viene codificada por plásmidos que a su vez codifican otras propiedades que pueden ser potencialmente ventajosas. Las bacteriocinas pueden tener importancia ecológica en establecimiento y mantenimiento de diferentes microbiotas, y en la sustitución de una cepa por otra durante el curso de una infección bacteriana. A pesar de que este papel parece ió-

gico, especialmente en el caso de P. aeruginosa, la literatura contiene escaso número de trabajos que aborden este tema (KONISKY, 1978).

### 2.1.3. ORGANIZACION GENETICA

La mejora de las condiciones sanitarias y de la medicina preventiva en países desarrollados ha protegido a los humanos de la amenaza de las enfermedades infecciosas causadas por bacterias patógenas. El rápido progreso de los agentes terapéuticos y su uso de forma indiscriminada ha provocado la aparición de cambios importantes en las bacterias patógenas. La selección de bacterias resistentes a las drogas debido al uso de agentes terapéuticos incrementa la posibilidad de infección principalmente en hospitales. La presencia de resistencia por plásmidos conjugativos (R) o no conjugativos (r) presenta un problema adicional en la medicina e industria debido a la transferencia de resistencia a las drogas, de bacteria a bacteria, sumada a la infectividad de las propias bacterias (DOWDING y DAVIES, 1975; MITSUHASHI, 1977<sub>a</sub>).

Los plásmidos en P. aeruginosa juegan un papel esencial en la resistencia a las drogas y en su versatilidad bio-

química. Estas características son muy importantes, siendo necesario el análisis genético para entender la biología de esta bacteria (HOLLOWAY, 1975).

Uno de los avances más importantes en el desarrollo de la genética bacteriana fue el descubrimiento de que las barreras para el intercambio genético entre especies de bacterias no relacionadas no son tan elevadas como se creía en principio. Los plásmidos se pueden transferir entre un amplio rango de bacterias no relacionadas. Se han identificado secuencias de ADN que tienen la capacidad de moverse entre moléculas no relacionadas de ADN y regiones de secuencias de inserción, creando un mecanismo para la transferencia de información genética entre organismos con poca o ninguna homología en la secuencia del ADN (HOLLOWAY, 1979).

#### - ANALISIS GENETICO

La mayoría del trabajo genético con P. aeruginosa se ha realizado en dos cepas, descritas originalmente por HOLLOWAY (1955). La cepa PAO aislada de un paciente en Australia en 1954 y la cepa PAT2 que fue aislada en Sudáfrica. Estas dos cepas presentan un amplio rango de propie-



dades genéticas diferentes y su estudio ha permitido obtener una amplia visión de la organización genética de las cepas de P. aeruginosa.

La comprensión total de la organización genética de P.aeruginosa implica la identificación y el estudio del cromosoma y de los plásmidos, su estructura genética y física, su transmisión, potencial fenotípico y relaciones con genomas de otras bacterias.

P. aeruginosa en cultivos artificiales produce un rango elevado de variantes, afectándose su morfología, producción de pigmentos, resistencia a diferentes agentes y propiedades antigénicas. La frecuencia de estos cambios sugiere la presencia de un mecanismo genético distinto a la mutación puntual. El hecho de que los variantes disociados tengan una variedad de características fenotípicas alteradas señala la existencia de una delección de una parte pequeña del cromosoma o la pérdida de un plásmido. Si el plásmido es pequeño y no transferible es difícil de obtener su evidencia. Si se puede demostrar, se observa la importancia del papel de los plásmidos en los ambientes naturales y la necesidad de desarrollar proce-

dimientos para mantener estos plásmidos en cultivos artificiales (HOLLOWAY, 1975). La obtención de mutantes de P. aeruginosa es necesaria para los estudios genéticos. Los agentes mutagénicos usuales son etil metano sulfonato (EMS), cloruro de magnesio o N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (HOLLOWAY, 1975).

Actualmente no se tiene mucha información sobre la morfogénesis y el mecanismo de enlace de las estructuras celulares. Un estudio genético para resolver estos mecanismos requiere el desarrollo de técnicas para el aislamiento de mutantes, los cuales tengan alterados los componentes estructurales o que hayan perdido la capacidad de enlazar dichos componentes (HOLLOWAY, 1975).

Una de las estructuras de la célula bacteriana que recibe considerable atención es la membrana celular, debido a su relación con el ADN de la célula, su actividad en la fosforilación oxidativa, sus funciones de permeabilidad y su relación estructural con la pared celular. Para estudiar la estructura de la pared celular se utilizan los mutantes que potencialmente le afectan, aislándose y estudiando colonias que presentan variaciones en su morfolo-

gía. El estudio y comprensión de la estructura de la pared y membrana celular puede ayudar en el entendimiento de las variaciones genéticas en determinados ambientes, tanto en la naturaleza como en ambiente hospitalario (HOLLOWAY, 1975; HOLLOWAY et al., 1979).

Diferentes estudios han demostrado que la proporción de aparición de resistencia a las drogas en microorganismos es mucho más elevada si la comparamos con el número de mutaciones que se observan en los organismos superiores. Esto es debido a los siguientes factores :

- Corto tiempo de generación
- Número muy elevado de microorganismos
- Diversidad en los mecanismos de transferencia de genes
- Uso abusivo de agentes antimicrobianos, incrementándose la selección de resistentes (MITSUHASHI, 1977<sub>b</sub>).

## - ESTRUCTURA DEL GENOMA BACTERIANO

El genoma, centro de la información genética, generalmente en la bacteria está dividido en dos estructuras principales :el cromosoma y los plásmidos. Los plásmidos se pueden considerar como cromosomas pequeños adicionales que tienen la extraña propiedad de no ser esenciales en la multiplicación de la bacteria (HOLLOWAY, 1979).

### - Cromosoma

El cromosoma de P. aeruginosa tiene una forma circular, formado por una doble cadena de ADN unida a la membrana de la bacteria. Su masa molecular es de  $2-3 \times 10^9$  daltons. En general estas moléculas son suficientemente largas para codificar aproximadamente de 2500 a 3000 proteínas (HOLLOWAY, 1979).

### - Plásmidos

Las bacterias contienen a menudo, además de un cromosoma circular de gran tamaño, diversas moléculas cíclicas de ADN, que replican de forma autónoma, son de pequeño ta-

maño y reciben el nombre de plásmidos (JACOB y WOLLMAN, 1958). La presencia de plásmidos en todos los géneros es más una constante que una excepción (NOVICK, 1980). Están formados por una doble cadena circular de ADN con una masa molecular de  $2 \times 10^6$  daltons a  $200 \times 10^6$  daltons, aunque la mayoría son de  $20-60 \times 10^6$  daltons (HOLLOWAY, 1979). Generalmente se mantienen de forma estable en la célula sin estar incluidos en el cromosoma

Los procesos de identificación de plásmidos no son simples, se basan en su capacidad de ser transmitidos, en su pérdida espontánea o mediante un curado sin producir la muerte de la célula, su contribución en el fenotipo de la bacteria y, si es posible, en su falta de unión al cromosoma (HOLLOWAY, 1975).

Los plásmidos pueden contribuir en las propiedades fenotípicas de la bacteria como resistencia a los antibióticos y virulencia, siendo por lo tanto unos componentes importantes del genoma (HELINSKI, 1979). Algunos pueden promocionar la transferencia del cromosoma, siendo importantes en la evolución de especies bacterianas. Se ha descrito también regiones IS (secuencias de inserción)

en plásmidos que provocan la transferencia de secuencias de ADN entre cromosomas de especies bacterianas no relacionadas, produciendo variación y regulación del material genético (HOLLOWAY, 1979).

#### - Bacteriófagos

El determinante genético del bacteriófago está generalmente integrado en continuidad en el cromosoma bacteriano de igual modo que el colifago  $\lambda$ . En algunos casos puede ser extracromosómico, mostrando similitudes con los plásmidos como P1 en E. coli y F116 en P. aeruginosa (HOLLOWAY, 1979).

Casi todas las cepas de P. aeruginosa son lisogénicas (integración del ADN del virus en el material cromosómico bacteriano), siendo también común la polilisogenia en esta especie (COWAN, 1974). En algunos casos la presencia de un fago puede producir variaciones de las características fenotípicas relacionadas con la envoltura celular. Morfológicamente el número de estructuras es tan amplio como los hallados en otros géneros (HOLLOWAY y KRISHNAPILLAI, 1975; HOLLOWAY, 1979).

## - PROCEDIMIENTOS PARA EL ANALISIS GENETICO

En P. aeruginosa existen tres mecanismos de recombinación genética que se pueden emplear en investigaciones genéticas de este microorganismo. Estos son transformación, transducción y conjugación (STANISCH y RICHMOND, 1975; HOLLOWAY, 1979).

### - Transformación

El método de transformación de plásmidos desarrollado en E. coli es una técnica útil para el estudio genético de los plásmidos. Se ha visto que también es efectivo en otras especies bacterianas incluyendo a P. putida y P. aeruginosa (HOLLOWAY, 1979). KAHN y SEN (1967) describieron la recombinación genética por transformación en varias especies de Pseudomonas incluyendo combinaciones intra e interespecíficas de P. aeruginosa. El mecanismo seguido no presenta diferencias con los descritos para otros microorganismos, pero no se ha empleado para el análisis genético en este género (HOLLOWAY, 1979).

- Transducción

La frecuencia de cepas lisogénicas de P. aeruginosa es casi de 100% (HOLLOWAY y KRISHNAPILLAI, 1975; HOLLOWAY et al., 1979), siendo también muy elevada la presencia de bacteriófagos transductores. El peso molecular del ADN de los fagos F116 y G101 es tal, que son capaces de transducir el 1-2% del cromosoma bacteriano y por lo tanto son útiles en estudios sobre localización de marcadores genéticos muy próximos, pudiéndose obtener una gran precisión (HOLLOWAY, 1975).

En P. aeruginosa el fago más empleado para el análisis por transducción es el F116; se absorbe en la fimbria de P. aeruginosa y el profago no se integra en el cromosoma bacteriano, de forma similar a un plásmido. Es muy frecuente en P. aeruginosa la presencia de fagos capaces de realizar una transducción, pudiéndose aislar de cualquier cepa de P. aeruginosa de la que se necesite realizar un análisis mediante transducción y que no sea susceptible a los fagos transductores ya caracterizados como F116, F116L, B3 y G101 (HOLLOWAY et al., 1975; HOLLOWAY, 1979).



## - Conjugación

La capacidad de transferir y recibir material genético por contacto directo entre células se denomina conjugación (LEDERBERG y TATUM, 1946). Este proceso está mediado en algunos casos por plásmidos que determinan el inicio de la conjugación celular, la movilización del ADN en el dador y su transferencia a la célula receptora. Para el mapado, la conjugación es el proceso de transferencia genética más útil. Se puede transferir una larga porción del cromosoma, demostrándose la recombinación entre genes situados a cierta distancia en el cromosoma.

Se ha visto que un número elevado de plásmidos provocan la conjugación en P. aeruginosa, algunos transfiriendo el cromosoma bacteriano (factores sexuales), mientras que otros plásmidos, algunos factores R, tan sólo provocan la transferencia de sus propios determinantes genéticos, sin promocionar la transferencia de ADN del cromosoma (HOLLOWAY, 1975).

La mayoría del mapa cromosómico existente de P. aeruginosa se ha establecido utilizando el plásmido FP2 que

tiene un punto de origen que se le ha denominado punto cero, donde se inicia la transferencia del cromosoma. A partir del minuto 40 desde el origen de FP2 la frecuencia de aislamiento de marcadores es demasiado baja para poder obtener precisión en el mapado, no pudiéndose demostrar la circularidad del cromosoma utilizando sólo a este plásmido (HOLLOWAY, 1975).

Estas diferencias en los resultados estimularon la investigación de otros plásmidos que pudieran resolver el mapado y demostrar la circularidad del cromosoma; la mayoría de los factores sexuales sólo pueden transferir el cromosoma por un punto. Es posible que existan otros puntos, pero la frecuencia es muy baja (HOLLOWAY, 1975 y 1979).

La frecuencia con que los plásmidos R se aislan de P.aeruginosa ha favorecido su uso como factores sexuales. En la cepa PAT los plásmidos FP2, R68 y R91-5 promueven la transferencia del cromosoma con diferentes orígenes. Con el uso combinado de estos plásmidos y el R68.45, conjuntamente con estudios de transducción se ha realizado el mapado del cromosoma de la cepa PAT, demostrándose su cir-

cularidad. El plásmido R68.45, que es derivado del plásmido R68, tiene la capacidad de promover la transferencia del cromosoma con alta frecuencia, a una variedad de cepas de P. aeruginosa. Ambos plásmidos pertenecen al grupo de incompatibilidad P-1 que se pueden transferir a un gran número de géneros bacterianos (HOLLOWAY, 1979; HOLLOWAY et al., 1979). ROYLE et al. (1981) han demostrado recientemente la circularidad del cromosoma de la cepa PAO con cruces de serie de 2 y 3 factores y experimentos de doble selección con plásmidos Cma, FP2, FP5, FP110 y R68.45.

Actualmente se han identificado un gran número de plásmidos siendo difícil evitar la conclusión de la gran importancia de estos elementos genéticos en la contribución al éxito biológico de este género en los distintos ambientes (HOLLOWAY, 1975).

#### - PLASMIDOS EN P. aeruginosa

Los plásmidos en Pseudomonas son importantes fuentes de variabilidad, confirmando la capacidad de adaptarse a diferentes medios, incluyendo hospitales donde la resistencia a antibióticos es un factor importante en el éxito de P.aeruginosa como un patógeno oportunista (JACOBY,1975).

- Propiedades de los plásmidos

Se han encontrado plásmidos en P. aeruginosa que determinan resistencia a todos los antibióticos cuya resistencia está determinada por plásmidos en Enterobacteriaceae, con mecanismos bioquímicos de resistencia generalmente similares. Los plásmidos metabólicos para las vías del alcanfor (CAM), naftaleno (NAH), octano (OCT), salicilato (SAL), tolueno (TOL) y xileno (XIL) son portadores de genes estructurales y reguladores de vías enzimáticas especiales, permitiendo obtener metabolitos intermediarios simples a partir de productos aromáticos, alifáticos o terpenoides (JACOBY, 1975 y 1979; CHAKRABARTY, 1976; BRODA et al., 1977).

En P. aeruginosa se han descrito tres plásmidos de fertilidad. El prototipo es FP2 que promueve la transferencia del cromosoma entre un dador  $FP2^+$  y un receptor  $FP^-$  con una frecuencia entre  $10^{-3}$  y  $10^{-7}$  por dador. FP39 también promueve la transferencia orientada del cromosoma, con una frecuencia comparable a FP2 pero con un retraso de 10 minutos respecto al inicio de la transferencia de FP2. El tercer factor, FP5, tiene frecuencias de transferencia similares a los plásmidos anteriores y de

forma similar a FP2 determina resistencia al mercurio. Los plásmidos R y los plásmidos metabólicos provocan a su vez la transferencia del cromosoma, pero a frecuencias demasiado bajas para ser aplicadas en el análisis genético (HELINSKI, 1973; CHAKRABARTY, 1976; HOLLOWAY et al., 1977; JACOBY, 1979).

Los plásmidos también determinan otras características adicionales con diferentes efectos protectores. La resistencia al mercurio es bastante frecuente habiéndose descrito en FP2 y FP5 y en aproximadamente la mitad de los factores R de P. aeruginosa. Algunos determinan adicionalmente resistencia a organomercuriales (SCHOTTEL et al., 1974<sub>a</sub>; CHAKRABARTY, 1976; SUMMERS y SILVER, 1978; WEISS et al., 1978; BRYAN, 1980). La resistencia al cromo, boro, y telurio viene determinada por algunos plásmidos de Pseudomonas (SUMMERS et al., 1978). Se han descrito plásmidos que confieren resistencia a agentes que destruyen el ADN como luz u.v., radiaciones  $\gamma$ , o agentes alquilantes (JACOBY, 1974). En la TABLA 2 se encuentran descritas las propiedades más características de los plásmidos de Pseudomonas.

Entre plásmidos y fagos pueden existir interacciones. Al-

## TABLA 2

Propiedades de los plásmidos de Pseudomonas (JACOBY, 1979 y 1981).

## - Resistencia a los antibióticos

Carbenicilina :  $\beta$ -lactamasas (TEM-1, TEM-2, OXA-3 y otras), impermeabilidad.

Cloranfenicol : acetiltransferasa, otros mecanismos

Gentamicina : AAC(6'), AAC(3), AAD(2')

Kanamicina : APH(3'), AAC(6'), AAD(2'') y otros mecanismos.

Estreptomina : APH(3''), AAD(3'') y otros mecanismos

Sulfamidas : nueva dihidropteorato sintetasa.

Tobramicina : bloqueo de la permeabilidad.

## - Capacidad de degradar compuestos orgánicos

alcanfor : camA, camB, camC, camD, camG, otros

naftaleno : nah

octano : alkA, alkB, alkC

salicilato : sal

tolueno : tol

xileno : xyl

## - Capacidad de ser dador del cromosoma

## - Resistencia a agentes químicos y físicos

## TABLA 2 cont.

borato : borcromato : crrión mercurio : merorganomercuriales : pmrtelurito : terirradiación ultravioleta : uv

## - Resistencia a los bacteriófagos

interferencia con la multiplicación del fago : phi  
(B3, B39, C5, D3, E79, G101, M6, PB1 y otros)restricción y modificación del DNA : Paer7

## - Dador específico de susceptibilidad a fagos

fagos : PRR1, PRD1, Pf3, PR3, PR4

## - Inhibición de la superinfección del profago B3

## - Resistencia a las bacteriocinas

bacteriocinas : AP41, AP108; otros rar

## - Inhibición de la producción de bacteriocinas

## - Inhibición de la fertilidad

Fi(RP1); Fi(FP2)

## - Incompatibilidad con otros plásmidos

IncP-1 hasta p-13

Los símbolos genotípicos siguen la propuesta de NOVICK et al., 1976.

gunos plásmidos interfieren con la propagación de los fagos. Los plásmidos conjugativos transforman a su huésped en una cepa sensible a otros fagos, los cuales consecuentemente son conocidos como fagos dadores específicos. Algunas cepas lisogénicas pueden ser a su vez malos recipientes de plásmidos. La susceptibilidad y producción de aeruginocinas se encuentra afectada a su vez por plásmidos (HOLLOWAY et al., 1977; JACOBY, 1979).

#### - Clasificación de los plásmidos por incompatibilidad

Cuando dos tipos de plásmidos R, originados a partir del mismo plásmido r, pero poseyendo diferentes marcadores de resistencia, coexisten en la misma célula, se produce una exclusión mútua, llamándose a este fenómeno incompatibilidad. Esta es una de las propiedades más útiles para su clasificación. Los plásmidos pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad (Inc), poseen sistemas de autoreplicación similares, a menudo tienen propiedades fenotípicas en común y ADN homólogo, tendiendo a tener los mismos pesos moleculares. Algunos tipos de plásmidos R son compatibles y pueden coexistir de forma estable en la misma célula, debido a que sus sistemas de replicación son suficientemente distintos para no interaccionar (NOVICK et al., 1976; DATTA, 1977; HOLLOWAY et al., 1977; IYOBE y MIT-



SUHASHI, 1977<sub>a</sub>; BRODA, 1979; HELINSKI, 1979).

El primer plásmido R encontrado en P. aeruginosa fue detectado al observar la transferencia de resistencia a una cepa de E. coli. Esta característica se utilizó para definir nuevos grupos de incompatibilidad, el grupo P, que determinaba resistencia a la carbenicilina, kanamicina y tetraciclina, y el grupo C con resistencia a carbenicilina, cloranfenicol, gentamicina, sulfamidas, tobramicina y mercurio. Posteriormente se aislaron plásmidos que determinaban resistencia a estreptomycinina en P. aeruginosa, que se transferían entre cepas de la misma especie, pero que prácticamente no se transferían a E. coli y a otras Enterobacteriaceae. Estos plásmidos de Pseudomonas son compatibles con los grupos IncP e IncC. Tras estos resultados diferentes autores iniciaron el esquema de clasificación por incompatibilidades en P. aeruginosa (BRYAN et al., 1973; HOLLOWAY et al., 1975; JACOBY, 1977). Actualmente se han establecido 13 grupos de incompatibilidad (JACOBY, 1981). La TABLA 3 presenta un resumen de las propiedades de compatibilidad realizadas en las cuales se basan estos grupos.

El grupo IncP-1 incluye los plásmidos RP1 y RP4 usados

TABLA 3

Propiedades de compatibilidad de los plásmidos de Pseudomonas (JACOBY, 1979).

<u>Interacciones con plásmidos del grupo</u>												
<u>Plásmido</u>	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7	P-8	P-9	P-10	N	W
P-1	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
P-2		I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
P-3			I	C	C	C	C	C	C	C	C	C
P-4					C	C	C	C	C	C		C
P-5						C	C	C	C	C	C	C
P-6							C	C		C		C
P-7								C	C	C		C
P-8									C	C	C	C
P-9									I	C	C	C
P-10										I	C	C
RP1-1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
R716	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

C : Plásmidos compatibles

I : Plásmidos incompatibles

frecuentemente en estudios genéticos. Este grupo de plásmidos tiene una amplia distribución geográfica pudiéndose aislar en un número elevado de huéspedes, siendo transmisibles por conjugación a E. coli. Son estables en la cepa PAO, pero no en la PAT. Estos plásmidos confieren susceptibilidad a los bacteriófagos PRR1, PRD1, Pf3, PR3 y PR4, interfieren con la propagación del fago G101 y determinan tolerancia a bacteriocinas específicas (IYOBE y MITSUHASHI, 1977<sub>b</sub>; JACOBY, 1977 y 1979).

Los plásmidos del grupo P-2 son los más comunes en P. aeruginosa, teniendo importancia en los brotes clínicos de infecciones resistentes a carbenicilina y gentamicina. Están ampliamente distribuidos y determinan además la resistencia al telurito potásico (SUMMERS y JACOBY, 1977; JACOBY, 1981). Algunos plásmidos P-2 confieren resistencia al borato, cromato, organomercuriales y luz u.v.. Principalmente son transmisibles entre especies de Pseudomonas; no son transmisibles a E. coli. Inhiben la transferencia de plásmidos P-5 coexistentes (IYOBE y MITSUHASHI, 1977<sub>b</sub>; JACOBY, 1977).

Los plásmidos del grupo IncP-3 son ubicuos. Este grupo corresponde al grupo C del sistema de incompatibilidades

de E. coli. El plásmido R64 típico de este grupo también confiere resistencia a carbenicilina a través de una  $\beta$ -lactamasa y a la gentamicina por formación de gentamicina adeniltransferasa, capaz de inactivar a la gentamicina y tobramicina. Inhibe la fertilidad de factores sexuales como FP2 (CHAKRABARTY, 1976). El plásmido R1161 es representativo del grupo P-4 con un peso molecular de  $5,5 \times 10^6$  daltons. Su ADN tiene una gran homología con otros plásmidos que confieren resistencia a la estreptomycinina y sulfamidas (IYOBE y MITSUHASHI, 1977<sub>b</sub>; JACOBY, 1977).

Los plásmidos pertenecientes a los grupos P-5, P-6 y P-7, no son transmisibles a E. coli, sólo son transmisibles entre el género Pseudomonas; son compatibles con los miembros de los grupos de incompatibilidad de Pseudomonas previamente establecidos (JACOBY, 1977 y 1979).

En adición a los factores R, las cepas de P. aeruginosa son portadoras de un número de plásmidos que pueden actuar como factores sexuales y promocionar la transferencia orientada del cromosoma de las Pseudomonas. Estos plásmidos se pueden distinguir por otras propiedades fenotípicas como resistencia al mercurio, organomercuriales y radiaciones u.v. El factor FP más estudiado, FP2, es compati-

ble con plásmidos de los grupos P-1 hasta P-7, asignándole el grupo P-9 (JACOBY, 1977).

Los plásmidos P-9 son muy poco frecuentes; sólo son transmisibles en el género Pseudomonas. Los plásmidos P-10 se han aislado en un número más elevado de ocasiones. Son transmisibles a baja frecuencia a E. coli (JACOBY, 1979). Recientemente se han descrito tres nuevos grupos de incompatibilidad P-11, P-12 y P-13 (JACOBY y MATTHEW, 1979; JACOBY, 1981).

#### - Propiedades moleculares de los plásmidos

Aunque se tiene evidencia de la presencia de plásmidos en Pseudomonas desde hace 20 años, sólo recientemente se ha estudiado y conocido de forma detallada su estructura molecular.

La mayoría de los plásmidos de Pseudomonas tienen un contenido de G+C del 58-60%, siendo superior a la mayoría de los plásmidos de Enterobacteriaceae, pero más bajo que el cromosoma de P. aeruginosa (67%). El número de copias de plásmidos por cromosoma de Pseudomonas se ha calculado como uno o dos por factor sexual FP2 y FP39 y unos 18

plásmidos R del grupo IncP-2 (JACOBY, 1979).

Las secuencias específicas de bases en el ADN bacteriano pueden ser reconocidas por endonucleasas de restricción. Si el ADN bacteriano o de un bacteriófago que posea dichas secuencias entra en una célula bacteriana que posea endonucleasas de restricción, se produce una escisión de la cadena del ADN, perdiendo su función biológica. Si con la secuencia de bases que se introduce actúa un enzima metilado, no puede actuar el enzima de restricción, denominándose a este proceso modificación (IYOBE y MITSUHASHI, 1977<sub>a</sub>).

En cruces heterólogos, el ADN procedente del donador tiene que cruzar la barrera de los enzimas de restricción, antes de tomar parte en la conjugación; si el donador es homólogo, el ADN del donante es modificado, pudiéndose producir la recombinación (HOLLOWAY, 1979).

Se ha observado que las recombinaciones llamadas "ilegítimas" son más comunes de lo que en principio se creía. Los elementos IS son un ejemplo de como el material genético puede intercambiarse entre ADN de origen heterólogo, diferenciándose en secuencia de bases. Los elementos IS y los transposones pueden actuar como las princi-

pales causas de evolución del ADN de los procariotas, intercambiando información genética entre diversas especies de microorganismos (HOLLOWAY, 1979; NUGENT y DATTA, 1980).

Si en la división celular el plásmido no se multiplica, no se produce reinfección y las células derivadas de esta segregación defectiva pierden el plásmido. Este proceso se denomina curado. El curado se puede potenciar con sustancias químicas que actúan de forma selectiva en la replicación del plásmido y no en la del cromosoma, como los colorantes de acridina. En el caso de Pseudomonas solamente pueden ser curados algunos plásmidos (CLOWES, 1972; JACOBY, 1979).

#### - EVOLUCION DE LOS PLASMIDOS

En los últimos años se ha evidenciado que los plásmidos no son unidades estáticas. Pueden contener secuencias de ADN que son transponibles a otra localización dentro del mismo plásmido, coexistiendo con el plásmido o fago, o con el cromosoma del hospedador (JACOBY, 1979).

Se han descrito dos clases de elementos transponibles :

- Secuencias de inserción o elementos IS, son secuencias de translocación que han sido identificadas basándose en las mutaciones polares que producen en el lugar de la inserción (NOVICK et al., 1976). Poseen una longitud de 800 a 1400 pares de bases formadas sólo por genes responsables de la función de inserción.
- Secuencias de ADN transponibles o transposones, son elementos genéticos capaces de integración en numerosas secuencias no homólogas de ADN (MITSUHASHI, 1977<sub>b</sub>; NOVICK, 1980). Han sido descritos en numerosos géneros; están formados por más de 200 pares de bases, portando genes responsables de la inserción y resistencia a los antibióticos (KRISHNAPILLAI, 1979; FOSTER y KLECNER, 1980). Ambos tipos de elementos terminan a menudo en una secuencia de ADN repetida en la misma o en orientación inversa del final opuesto (JACOBY, 1979).

Los transposones más característicos en plásmidos de Pseudomonas son los siguientes : Tn1, que determina una  $\beta$ -lactamasa tipo TEM-2, habiéndose encontrado en RP4, RP1 y el Tn501 que determina resistencia al mercurio, encontrado



en pVS1. Tn1 tiene un peso molecular de  $3,2 \times 10^6$  que corresponde a 4,8 kilobases de ADN. En ambos extremos del segmento se repite una secuencia complementaria de 140 pares de bases con orientación invertida. Tn501 tiene un peso molecular de  $6 \times 10^6$  y puede ser insertado por un proceso Rec-independiente en RPl y otros plásmidos, a veces con inactivación de un gen de resistencia (JACOBY, 1979).

En conclusión se puede resumir que existen tres posibilidades para la formación de plásmidos que codifiquen resistencia múltiple :

- Recombinación entre plásmidos.
- Translocación de un transposón que codifica resistencia a drogas en un plásmido R.
- Cointegración de un transposón que determina resistencia a las drogas o un plásmido de resistencia (MITSUHASHI, 1977<sub>a</sub>).

El estudio de la organización genética de P. aeruginosa

es necesario para la solución de los problemas bioquímicos, epidemiológicos y microbiológicos. La identificación y caracterización de plásmidos, el mapado de los genes del cromosoma y el desarrollo de técnicas de aislamiento de mutantes son las técnicas principales que se pueden emplear. Estas técnicas se pueden utilizar para solucionar otros problemas como morfogénesis y la organización funcional de la célula bacteriana y su relación con la versatilidad bioquímica y característica resistencia de esta especie.

#### 2.1.4. HABITAT

P. aeruginosa es un microorganismo ubicuo, encontrándose distribuido por todo el mundo. Su versatilidad metabólica es una de las características más importantes permitiéndole crecer en condiciones ambientales muy diversas (RINGEN y DRAKE, 1952; DOUDOROFF y PALLERONI, 1974; LIU, 1976).

Este microorganismo se aísla en el medio ambiente a partir de muestras de suelos de zonas industriales,

agrícolas o urbanas (DOUDOROFF y PALLERONI, 1974; GREEN et al., 1974; SCHROTH et al., 1977; MARQUES et al., 1979) y de fangos de depuradoras (GRABOW et al., 1973 y 1976).

El agua es también su hábitat natural aislándose de aguas de ríos y lagos (DOUDOROFF y PALLERONI, 1974; JÖLY et al., 1976; LIU, 1976; MARQUES et al., 1978; SIMON-PUJOL et al., 1978) de aguas residuales (RINGEN y DRAKE, 1952) y de aguas marinas, especialmente de zonas costeras que reciben influencia directa de la actividad del hombre, tanto de origen doméstico como industrial (AL DELAMI y DENIS, 1976; CHAN y KUEH, 1976; SIMON-PUJOL et al., 1980).

El agua juega un papel muy importante en la diseminación de P. aeruginosa en el medio ambiente transportando este microorganismo hasta el hombre, animales y plantas (HOADLEY, 1977).

El intestino humano no parece ser el principal hábitat de P. aeruginosa, aunque se aísla en una de cada diez heces normales. Las heces y la región anogenital pueden

actuar como focos de infecciones epidémicas y contaminación de la piel (HUGH y GILARDI, 1980).

Las enfermedades metabólicas, hemáticas y neoplásicas predisponen a los pacientes a adquirir infecciones por P. aeruginosa. Las infecciones adquiridas en hospitales se producen en pacientes a los que se les ha practicado previamente instrumentación o procesos tales como cateterización uretral, traqueotomías, punciones lumbares e infusiones intravenosas de medicamentos o fluidos. Los pacientes se hacen susceptibles a las infecciones por P. aeruginosa después de un prolongado tratamiento con agentes inmunodepresivos, corticoesteroides, antimetabólicos, antibióticos y radiaciones (DOGGETT, 1979; HUGH y GILARDI, 1980).

P. aeruginosa con frecuencia contamina a quemados, siendo el agente que produce un número más elevado de muertes (LIU, 1976; HOLDER, 1977; BRIDGES et al., 1979; PRUIT y LINDBERG, 1979). Se aísla frecuentemente en infecciones urinarias hospitalarias, especialmente cuando hay algún traumatismo, sin ser la causa inicial de la infección (BERCHE et al., 1979; KOHLER y WHITE, 1979). La colagenasa acumulada por P. aeruginosa en infecciones oculares

es responsable de la perforación corneal produciendo como resultado la pérdida del ojo (HUGH y GILARDI, 1980).

Una de los factores más importantes en la supervivencia de los enfermos con fibrosis cística es el control de las infecciones bacterianas secundarias del tracto respiratorio. El agente infeccioso aislado con mayor frecuencia es P. aeruginosa, causando serios problemas de tratamiento (HUANG y DOGGETT, 1979; SEALE et al., 1979; THOMASSEN et al., 1979; MARKOWITZ et al., 1980).

Las septicemias producidas por P. aeruginosa son la causa principal de infección en pacientes cancerosos. En enfermos leucémicos el factor principal que favorece la infección es la prolongada neutropenia (RODRIGUEZ y BODEY, 1979). P. aeruginosa es la causa de graves epidemias de diarreas en niños. En verano este microorganismo se aísla en numerosas ocasiones en piscinas y aguas recreacionales, siendo el agente causal de un número elevado de otitis externas (LEVIN y CABELLI, 1972; MORENO y DE MAGALHAES LOPES, 1974; SEYFRIED y FRASER, 1980).

P. aeruginosa es el agente causal de importantes infecciones nosocomiales. Mediante el tratamiento con antibióticos

se eliminan los agentes etiológicos primarios de las infecciones, apareciendo P. aeruginosa como el nuevo agente infeccioso. Su aparición tiene importancia clínica debido a su resistencia a la terapia antibiótica. Este microorganismo se puede transmitir entre los enfermos o indirectamente a través del personal sanitario u objetos contaminados (HOLDER, 1977; REBER et al., 1978; SCHABERG et al., 1980).

Las formas farmacéuticas no estériles pueden participar de forma activa en la transferencia de infecciones, actuando como vectores. P. aeruginosa se ha aislado de diversas formas farmacéuticas (WHITBY y RAMPLING, 1972; WARGO, 1973; HART y RATANSI, 1975) y de desinfectantes (PASH, 1974; HOLDER, 1977; RICHARDS, 1975). Cabe destacar su aislamiento en diversas ocasiones a partir de agua destilada, pudiendo sobrevivir en este medio largos períodos de tiempo (FAVERO et al., 1971; BAIRD et al., 1976<sub>b</sub>; LIU, 1976).

Su aislamiento en medio hospitalario inerte tiene como característica común la presencia de un grado elevado de humedad, lo que favorece su desarrollo. Diferentes autores han descrito como posibles focos de infección los frega-

deros, lavabos, material de limpieza, desagües, suelos, jarrones, material quirúrgico y aparatos de difícil esterilización (AYLIFFE et al., 1965; WHITBY y RAMPLING, 1972; AYLIFFE et al., 1974; HOLDER, 1977).

Los alimentos, especialmente verduras y frutas, y las plantas ornamentales son frecuentemente portadores de cepas de P. aeruginosa que no producen ningún tipo de alteración apreciable. Su aislamiento de productos alimenticios tiene importancia especialmente en medio hospitalario, donde estos microorganismos pueden provocar graves infecciones en huéspedes con las defensas naturales alteradas (KOMINOS et al., 1972<sub>a</sub>; WHITBY y RAMPLING, 1972; DOUDOROFF y PALLERONI, 1974; PASH, 1974).

P. aeruginosa, a diferencia de otros patógenos humanos, también infecta a otros vertebrados de sangre caliente y fría (LAUB-KUPERSZTEJN et al., 1974; SRIVINASAN et al., 1975 y 1977; AL DELAMI y DENIS, 1976; BLUE y WOOLEY, 1977), animales inferiores acuáticos y terrestres (KLYHN y GORILL, 1967; LIU, 1976; DOGGETT, 1979).

## 2.2. RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

### 2.2.1. NATURALEZA DEL PROBLEMA

La capacidad de adaptación de las bacterias en presencia de sustancias tóxicas es conocida desde el inicio de la microbiología. Cuando afecta a los antibióticos, este problema tiene una magnitud especial; la proporción de resistencia que se puede presentar es muy superior a la que se puede desarrollar con cualquier otro tipo de droga (GARROD et al., 1973).

El descubrimiento en el Japón en 1959 de que la resistencia a los antibióticos estaba mediada por plásmidos R y era transferible entre las células fue un avance muy significativo para entender el mecanismo de diseminación de las resistencias entre bacterias Gram-negativas, especialmente entre P. aeruginosa (STURTEVAN y FEARY, 1969). Las poblaciones bacterianas son a menudo seleccionadas en medios tóxicos debido a la rápida diseminación de factores R. Estos plásmidos confieren resistencia a un amplio espectro de antibióticos y otros antimicrobianos incluyendo metales pesados, radiaciones, bacteriocinas, fagos, teniendo el organismo huésped una ventaja en la superviven-



cia en medios hostiles (KODITSCHKEK y GUYRE, 1974; GRABOW et al., 1975; SILVER et al., 1976).

El problema es particularmente importante en hospitales donde el medio ambiente favorece la selección de microorganismos potencialmente patógenos, existiendo un grave peligro si han adquirido multirresistencia a los antibióticos (DEVLEESCHOUWER y DONY, 1979).

Los antibióticos al romper el equilibrio bacteriano intestinal en el hombre, favorecen la aparición de microorganismos resistentes, pudiéndose producir la transferencia de resistencias mediante plásmidos R y la implantación de bacterias exógenas (HUMMEL et al., 1977; MICHEL-BRIAND, 1977). Se ha observado que aproximadamente el 35% de los pacientes internados en un hospital reciben antibióticos y que en más de la mitad de los casos su uso es juzgado como inapropiado, siendo los antibióticos de amplio espectro los que contribuyen de forma más directa a la selección de bacterias resistentes (DAVIES, 1980<sub>u</sub>).

De este modo se ha considerado que el uso generalizado de antibióticos es la mayor fuerza selectiva en la aparición de cepas bacterianas resistentes, favoreciendo e incremen-

tando su resistencia en los diferentes hábitats (STURTEVAN y FEARY, 1969; COOKE, 1976<sub>a,b,c</sub>; DAVIES, 1979<sub>a</sub>). Una vez terminado el tratamiento antibiótico disminuye el porcentaje de resistencia al no existir la fuerza selectiva (RICHMOND, 1975<sub>a</sub>).

En el medio ambiente GRABOW et al. (1973) describen el mismo fenómeno. Observan en procesos de depuración de aguas una mayor supervivencia de bacterias con factores R, los que confieren a las células características que favorecen su persistencia en el medio respecto a las cepas sensibles. De esta forma el agua puede jugar un papel importante en la diseminación de bacterias portadoras de factores R. Es preciso revisar los procesos de depuración de aguas, puesto que puede ser una vía rápida de dispersión de bacterias resistentes, perjudicando al medio ambiente y por lo tanto al hombre (GRABOW et al., 1976). Las aguas de bebida contaminadas pueden jugar un papel directo en la distribución de bacterias con factores R en el hombre, siendo suficiente para poder producir una colonización continua del intestino humano (COOKE, 1976<sub>c</sub>; POHL et al., 1977).

Existe un nivel elevado de bacterias R<sup>+</sup> en aguas fecales no tratadas de países civilizados, donde hay un uso abun-

dante de agentes antibacterianos tanto en clínica como en veterinaria y agricultura (STURTEVAN et al., 1971). Las aguas de origen fecal, tratadas o no, especialmente las que provienen de hospitales, pueden actuar como reservorios de cepas resistentes a los antibióticos, existiendo además la posibilidad de intercambio de resistencias a este nivel (GRABOW et al., 1975; FONTAINE y HOADLEY, 1976; LECLERC et al., 1977).

Como se puede observar, la selección de bacterias resistentes a los antibióticos no está limitada al ambiente hospitalario. Los antibióticos también son añadidos de forma rutinaria a los alimentos de los animales con el fin de favorecer un crecimiento más rápido, produciendo como resultado la selección de bacterias resistentes en el intestino de los animales. Estas cepas resistentes de origen animal pueden ser transmitidas al hombre (MARE, 1968; SRINIVASAN et al., 1975; COOKE, 1976<sub>b</sub>; FONTAINE y HOADLEY, 1976; ELWELL y FALKOW, 1977; POHL y THOMAS, 1977; DAVIES, 1979<sub>b</sub>).

Se tienen que estudiar las características de las cepas potencialmente patógenas portadoras de plásmidos de resistencia en el medio ambiente (POHL et al., 1977). En

este medio se pueden presentar otros factores selectivos adicionales, como es la contaminación por metales pesados (COOKE, 1976<sub>a</sub>; SILVER et al., 1976; ALLEN et al., 1977; PINNEY, 1977; SUMMERS et al., 1978; TIMONEY et al., 1978). Debe tenerse en cuenta la posibilidad de que la contaminación del medio ambiente por metales pesados puede favorecer la selección de bacterias portadoras de plásmidos, que determinan no sólo la resistencia a metales pesados sino también la resistencia a antibióticos (COOKE, 1976<sub>c</sub>; LECLERC et al., 1977; POHL et al., 1977).

SMITH en 1967 describió que la resistencia a los metales pesados estaba codificada por plásmidos y éstos, a su vez, podían determinar resistencia a antibióticos. De esta forma se amplió de un modo significativo el número de factores que pueden influir en la selección de cepas multirresistentes.

Se denominan metales pesados aquellos elementos metálicos que en su forma elemental tienen pesos específicos mayores a cinco. La mayoría de estos metales pesados, biológicamente activos o potencialmente tóxicos, son miembros de los elementos de transición de la tabla periódica. Debido a su configuración electrónica son altamente reacti-

vos. El mercurio, cadmio y la plata son ajenos a los sistemas vivos y constituyen un peligro para el desarrollo normal de los organismos y un grave riesgo para la salud humana (MANDELI, 1978; BROWN y LESTER, 1979).

Al examinar las propiedades químicas y físicas de los elementos tóxicos, es posible realizar alguna predicción de cuál será su comportamiento en el medio ambiente. WOOD (1974) clasificó los elementos según su toxicidad y capacidad de transformación en el medio ambiente. De acuerdo con esta clasificación, los elementos se pueden considerar no críticos, tóxicos y relativamente accesibles, o tóxicos pero insolubles y poco frecuentes. Los elementos clasificados como muy tóxicos y relativamente accesibles requieren una mayor atención. La movilidad relativa de estos elementos en el medio ambiente, así como su toxicidad depende de su capacidad de metilación. Los elementos agrupados según estas categorías se muestran en la TABLA 4.

La acción inhibidora de los metales pesados y de sus derivados sobre las bacterias, especialmente la acción del plomo, plata, bismuto, arsénico y mercurio es conocida desde la antigüedad. Estos metales se utilizan en agricultura, industria o medicina (DAVIES et al., 1978).

TABLA 4

Clasificación de los elementos según su toxicidad y capacidad de transformación (WOOD, 1974).

		<u>Muy tóxicos y relativamente accesibles</u>					<u>Insolubles o raros</u>		
		<u>No críticos</u>							
Na	C	F	Be	As	Au	Ti	Ga		
K	P	Li	Co	Se	Hg	Hf	La <sup>‡</sup>		
Mg	Fe	Rb	Ni	Tl	Te	Zr	Os		
Ca	S	Sr	Cu	Pd	Pb	W	Rh		
H	Cl	Al	Zn	Ag	Sb	Nb	Ir		
O	Br	Si	Sn	Cd	Bi	Ta	Ru		
N				Pt		Re	Ba		

‡ Lantánidos

Existe una polución creciente del medio ambiente por estos productos que en muchas ocasiones son retenidos como en el caso del mercurio, siendo las concentraciones normales que se encuentran en la naturaleza más bajas que las necesarias para producir una selección bacteriana. En áreas de acumulación, especialmente en cadenas biológicas, los compuestos de mercurio pueden influir en la selección de bacterias Gram-negativas resistentes (JOLY y CLUZEL, 1975; BROWN y LESTER, 1979).

Los metales pesados se pueden acumular a su vez en el medio ambiente, como sucede en los fangos de depuradoras. El problema aparece al utilizar estos fangos en zonas agrícolas. Se ha visto que este proceso está asociado con la acumulación de metales pesados en los vegetales cultivados, provocando en ocasiones problemas en su crecimiento, actuando, a su vez, como una posible vía de llegada de la contaminación mediante los alimentos al hombre. Por otra parte, la eliminación de estos metales pesados de las aguas durante el proceso de depuración no es total (STOVELAND et al., 1979).

MANDELI (1975) describe las aguas residuales como una de las principales fuentes de ingreso de los elementos tra-

za en los ecosistemas marinos. Esto, en cierto modo, refleja los patrones sociales e industriales de las zonas costeras.

Por otra parte, las bacterias juegan un papel muy importante en la transformación y movilización de los metales pesados y otros productos producidos por el hombre, industrias y agricultura. Se ha encontrado una correlación entre el número de bacterias resistentes a los metales pesados y antibióticos y el nivel de contaminación en una zona determinada, siendo la presencia de metales pesados el factor selectivo en el medio (ALLEN et al., 1977; TIMONEY et al., 1978; AUSTIN et al., 1979; DRUCKER et al., 1979).

Según SUMMERS y SILVER (1978) las transformaciones microbianas de los minerales metálicos pueden ser de dos tipos:

- Conversiones redox de las sales inorgánicas
  
- Conversiones de las formas orgánicas a inorgánicas y al contrario, con metilaciones o dimetilaciones.

Es evidente que la descarga de desechos en el medio ambien-



te puede ser causa de efectos perjudiciales para la salud pública. La contaminación del medio ambiente por microorganismos potencialmente patógenos para los seres humanos puede significar un riesgo derivado de la polución (SEIDER et al., 1980). Si además estos microorganismos presentan altos índices de resistencia a los diversos agentes antimicrobianos de los que dispone la terapia actual, el riesgo sanitario derivado de su presencia se ve incrementado (OMS, 1978).

#### 2.2.2. BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA

La demostración de la resistencia a las drogas mediada por plásmidos y su amplia distribución en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas es de gran importancia en medicina y genética. Desde la demostración de la presencia de cepas bacterianas resistentes a las drogas, muchos investigadores han pretendido determinar los mecanismos bioquímicos de dichas resistencias (MITSUHASHI et al., 1977).

Una de las características más conocidas de P. aeruginosa es su resistencia a un número elevado de agentes antimicrobianos. Esta situación va cambiando gradualmente con la introducción de nuevos antibióticos selec-

cionados por su actividad anti-Pseudomonas. La resistencia de P. aeruginosa a los agentes antimicrobianos se puede producir de dos formas. Una de ellas es la resistencia a los agentes antiguos, generalmente denominada resistencia intrínseca, la cual es común en la mayoría de las cepas de P. aeruginosa. El segundo tipo, o resistencia adquirida, es la resistencia que va apareciendo frente a los nuevos productos que se utilizan en clínica. La mayoría de las cepas son sensibles a estos agentes, pero poco a poco, debido a su uso, van apareciendo cepas resistentes. La adquisición de estas resistencias por las bacterias refleja un cambio a nivel genético. Estos cambios genéticos pueden ser debidos a mutaciones espontáneas o a procesos de transferencia de información genética (FRANKLIN, 1977; BRYAN, 1979).

Las bacterias pueden ser resistentes a un agente antimicrobiano por diferentes mecanismos, tal como describen KONDO et al. (1974), BROWN (1975), FRANKLIN (1977) y DAVIES (1979), pudiendo ser los siguientes :

- Modificación del punto de acción de la droga
- Permeabilidad alterada a los agentes antibacterianos, modificándose el sistema de transporte o los receptores.

- Inactivación del agente antimicrobiano producida por enzimas codificados por plásmidos o no, produciendo la modificación de los antibióticos, obteniéndose un derivado inactivo.
  
- Mecanismo de "bypass". Se produce con la aparición de un enzima codificado por un plásmido que suple la acción del enzima alterado por el agente antimicrobiano.
  
- Reducción del requerimiento para un metabolito. Se verifica cuando se altera algún paso de la síntesis de un metabolito esencial para la célula, pero ésta adquiere la capacidad de crecer sin él.

La resistencia a los agentes antimicrobianos determinada por plásmidos es el mecanismo más extendido de resistencia bacteriana a los antibióticos. De todos modos se debe realizar una distinción entre mecanismos de resistencia mediados por plásmidos y por el cromosoma. La resistencia mediada por plásmidos está principalmente asociada con la adquisición de una propiedad adicional, generalmente en forma de enzima o enzimas. En términos generales estos

enzimas modifican los antibióticos o reducen su acumulación. La resistencia cromosómica generalmente sólo produce alteración en el lugar de acción, aunque en algunas excepciones también puede ser causada por plásmidos (BRYAN, 1980). En la TABLA 5 se pueden observar las resistencias a antibióticos que están generalmente asociadas con genes plasmídicos o del cromosoma.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son un grupo importante de drogas utilizadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas. En este grupo están incluidas las penicilinas naturales y semisintéticas y las cefalosporinas (KURYLOWICZ et al., 1976). Estos compuestos están formados por dos núcleos en forma de anillo, los cuales tienen en común un anillo  $\beta$ -lactámico, diferenciándose en que el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) tiene un anillo tiazolidina y el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) tiene un anillo delta-dihidrotiazina (KURYLOWICZ et al., 1976). El miembro de este grupo que se usa generalmente en la terapia de infecciones por P. aeruginosa es la carbenicilina.

La carbenicilina y los  $\beta$ -lactámicos en general actúan sobre la pared celular inhibiendo la síntesis del peptidoglicano. En P. aeruginosa produce alargamiento celular

TABLA 5

Resistencia a antibióticos mediada por plásmidos o por el cromosoma (BRYAN, 1980).

Resistencia mediada por plásmidos

Penicilinas	Sulfamidas	
Cefalosporinas	Macrólidos	
Aminoglicósidos	Lincomicinas	
Espectinomina	Metales pesados	Hg y organomercuriales
Tetraciclinas		Cd
Cloranfenicol		Ag
Acido Fusídico		Arsenato, -ito
Novobiocina		Bi
Trimetroprim		Co y otros .

Antibióticos en los que no se ha descrito resistencia mediada por plásmidos

Vancomicina	Polimixinas
Cicloserina	Acido Nalidíxico
Fosfomicina	Nitrofuranos
Bacitracina	Isoniacida
Gramicidina	

y fenómenos de filamentación (HAMMOND y LAMBERT, 1978; BRYAN, 1979).

P. aeruginosa frecuentemente es sensible a la carbenicilina. El éxito aparente del tratamiento de infecciones urinarias es debido a las altas concentraciones que se alcanzan en orina. En diferentes ocasiones se han descrito cepas altamente resistentes, provenientes principalmente de infecciones en quemados e infecciones en el tracto urinario (KURYLOWICZ, 1976; BRYAN, 1979).

Las cefalosporinas son también antibióticos de amplio espectro, a los cuales P. aeruginosa generalmente es resistente (WALLICK y HENALIN, 1974; RICHMOND, 1975<sub>b</sub>, LABIA et al., 1977). La resistencia a estos compuestos se produce por la biosíntesis de  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico, causando una inactivación irreversible (RICHMOND, 1975<sub>b</sub>; MITSUHASHI et al., 1977). Estas enzimas se encuentran localizados en el espacio periplasmático, teniendo una relación a su vez con la superficie exterior de la membrana citoplasmática (FURTH, 1979). Los microorganismos Gram-negativos los producen en menor cantidad

pero los utilizan con mayor efectividad debido a la presencia de otros factores de defensa (GIBBS y THORNSBERRY, 1979). Son enzimas asociados a la célula. La resistencia en estas condiciones está en función de :

- Proporción en la que un antibiótico  $\beta$ -lactámico específico puede penetrar a través de la pared celular para alcanzar los lugares de acción, lo que incluye transpeptidasas relacionadas con la formación del peptidoglicano así como otras proteínas unidas a la penicilina.
- La presencia de  $\beta$ -lactamasas y sus características.
- La efectividad con la cual un determinado antibiótico puede inhibir el lugar de acción en la síntesis del peptidoglicano (BRYAN, 1979).

Las  $\beta$ -lactamasas determinadas por plásmidos en bacterias Gram-negativas se pueden dividir por lo menos en once tipos según criterios biofísicos y bioquímicos. A cuatro de estos enzimas se les ha denominado específicos de Pseudomonas (PSE) debido a que hasta la actualidad no se han descrito en otros géneros (JACOBY y MATTHEW, 1979; JACO-

BY, 1981). Según JACOBY (1980) en P. aeruginosa se han identificado nueve de los once enzimas. Algunas de sus características se encuentran descritas en la TABLA 6.

Los enzimas OXA se denominan de esta forma debido a su actividad frente a la oxaciclina y otros sustratos isoxazoil  $\beta$ -lactámicos. SHV-1 debido a la variación de la inhibición con reactivos sulfhidrilo según el sustrato empleado. De igual forma que con los restantes microorganismos Gram-negativos, los enzimas tipo TEM son los más comunes en P. aeruginosa (JACOBY, 1980).

Los aminoglicósidos son un amplio grupo de agentes antibacterianos que contienen azúcares aminosustituidos. Estos agentes, de igual forma que muchos antibióticos, tienen múltiples efectos en la célula bacteriana, pero su acción principal se considera que es la inhibición de la síntesis proteica (KURYLOWICZ et al., 1976; BRYAN, 1979).

Entre los aminoglicósidos, los que se usan con más frecuencia frente a infecciones por P. aeruginosa son gentamicina, tobramicina y amikacina. Entre éstos, con gentamicina es con el que se tiene más experiencia aunque su dosis máxima está limitada a su potencial ototoxicidad



TABLA 6

Propiedades de las  $\beta$ -lactamasas determinadas por plásmidos aislados en P. aeruginosa (JACOBY, 1980).

<u><math>\beta</math>-lactamasa</u>	<u>Proporción relativa de hidrólisis</u>				<u>Pm</u> (x10 <sup>3</sup> )	<u>Punto</u> <u>isoeléctrico</u>
	<u>PG*</u>	<u>CB</u>	<u>OX</u>	<u>CF</u>		
TEM-1	100	10	5	76	22,0	5,4
TEM-2	100	10	5	74	23,5	5,6
SHV-1	100	8	0	56	17,0	7,6
OXA-2	100	15	646	37	44,6	7,4;7,7
OXA-3	100	10	336	44	41,2	7,1
PSE-1	100	97	<2	18	28,5	5,7
PSE-2	100	121	317	32	12,4	6,1
PSE-3	100	253		10	12,0	6,9
PSE-4	100	150	8	40	32,0	5,3

\* PG : Penicilina G; CB : Carbenicilina; OX : Oxaciclina; CF : Cefaloridina.

y alteraciones de la función renal. Diversos autores han observado que tobramicina es más activa que gentamicina, pudiéndose presentar entre ambos resistencias cruzadas. Farmacológicamente se comportan de igual forma. Amikacina tiene propiedades farmacológicas similares a kanamicina, aunque es mucho más activa, pudiéndose comparar a gentamicina. Los restantes aminoglicósidos se utilizan en raras ocasiones en la terapia de infecciones por P. aeruginosa. La mayoría de las cepas se consideran resistentes a estreptomicina y kanamicina. Neomicina presenta una toxicidad excesiva para el tratamiento sistémico (BRYAN, 1979).

Hablar de los diferentes tipos de enzimas que inactivan los aminoglicósidos y de sus actividades en microorganismos Gram-negativos es extremadamente complejo, en parte debido a los diferentes tipos de reacciones de inactivación catalizadas y en parte debido al gran número de diferentes enzimas que se han detectado (RICHMOND, 1975<sub>b</sub>).

La proporción en que la bacteria es resistente a los aminoglicósidos está en función de la cantidad de estas drogas que llega al lugar de acción, la subunidad ribosomal 30S. Esto está relacionado con el paso a través de la

pared celular y la membrana citoplasmática. Gentamicina y los aminoglicósidos difunden a través del glicocálix, uniéndose a las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana exterior; esta membrana es atravesada por los poros por difusión. Una vez sobrepasada esta membrana los aminoglicósidos pasan a través del peptidoglicano alcanzando el espacioperiplasmático. En esta zona realizan una unión con las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática, empleando energía para su transporte hasta el interior de la célula (BRYAN, 1979).

La resistencia mediada por plásmidos a los aminoglicósidos, está asociada con una modificación enzimática del antibiótico o con una aparente impermeabilidad a estas drogas en ausencia de modificación enzimática. Esta última forma de resistencia no está tan ampliamente distribuida; sin embargo ha sido descrita la impermeabilidad aparente no asociada con plásmidos, particularmente entre cepas de P. aeruginosa. Existe un número elevado de diferentes enzimas capaces de modificar los aminoglicósidos mediante N-acetilación, O-fosforilación o O-nucleotidilación (TABLA 7). Estos enzimas están clasificados según la naturaleza de la reacción de transferencia que producen y por el lugar en que realizan la modificación en el aminoglicósido

## TABLA 7

Modificación enzimática de los aminoglicósidos (BRYAN, 1980).

<u>Fosforilación</u>	<u>Actividad enzimática</u>
APH (6) <sup>‡</sup>	6-hidroxil del anillo estreptidina-estreptomina
APH (3'')	3''-hidroxil del anillo glicosamina III estreptomina
APH (3')-I	3'-hidroxil de amino hexosa I de algunos aminoglicósidos deoxiestreptomina
APH (3')-II	igual que APH (3')-I pero diferentes sustratos
APH (3')-III	igual que APH (3')-I pero diferentes sustratos
APH (5'')	5''-hidroxil de ribosa de ribostamicina
APH (2'')	2''-hidroxil de aminohexosa III de algún aminoglicósido deoxistreptamina
<u>Acetilación</u>	
AAC (6') <sup>‡</sup>	varios subtipos; 6'-amino de aminohexosa I de algún aminoglicósido deoxistreptamina

## TABLA 7 cont.

AAC (2')	2'-amino de aminohexosa I de algún aminoglicósido deoxistreptamina
AAC (3)-I	grupo 3-amino de anillo deoxistreptamina
AAC (3)-II	igual que AAC (3)-I pero diferentes sustratos
AAC (3)-III	igual que AAC (3)-I pero diferentes sustratos
AAC (3)-IV	igual que AAC (3)-I pero diferentes sustratos

Nucleotidilación

AAD (3'') <sup>‡</sup>	3''-hidroxil en aminohexosa III de estreptomycinina o 9-hidroxil de espectinomycinina
ANT (2'')	2''-hidroxil de aminohexosa III de algún aminoglicósido deoxistreptamina
ANT (4') o AAD (4')	4'-hidroxil de aminohexosa I de algún aminoglicósido deoxistreptamina
AAD (6)	6-hidroxil de anillo estreptidina de estreptomycinina

‡

APH : aminoglicósido fosfotransferasa

AAC : aminoglicósido acetiltransferasa

AAD : aminoglicósido adenililtransferasa

ANT : aminoglicósido nucleotidiltransferasa

(RICHMOND, 1975; FRANKLIN, 1977; MITSUHASHI et al., 1977; JACOBY, 1979; BRYAN, 1980). Los enzimas que modifican los aminoglicósidos se localizan en la superficie externa de la membrana citoplasmática. Una vez modificadas, las moléculas pierden su afinidad ribosómica y no son transferidas a la subunidad 30S. A pesar de la buena correlación entre resistencia y presencia de enzimas capaces de modificar los aminoglicósidos, la resistencia no es debida simplemente a la inactivación del antibiótico (DAVIES, 1971).

Gentamicina fue el primer antibiótico aminoglicósido empleado frente a P. aeruginosa. Las cepas resistentes emergen principalmente entre aislados de orina y ocasionalmente de quemaduras (BRYAN, 1979; YOUNG, 1979).

N-acetilación y O-adenililación son las actividades principales que modifican la gentamicina. Muchas cepas que modifican enzimáticamente a la gentamicina codifican esta actividad por plásmidos R. Los plásmidos que la codifican con más frecuencia pertenecen al grupo P-2, aunque también se han descrito en otros grupos. En algunos casos se ha descrito resistencia a la gentamicina sin modificación enzimática. Este tipo de resistencia la producen cepas con crecimiento lento y escasa virulencia. Probablemente

es debido a la presencia de mutaciones múltiples en el cromosoma (DAVIES y COURVALIN, 1977; BRYAN, 1979).

La tobramicina se emplea con éxito según el tipo de infección como es el caso de infecciones urinarias, dérmicas u óseas. Generalmente aparece un porcentaje de resistencia bajo puesto que es un antibiótico relativamente nuevo, siendo dos o tres veces más activa que la gentamicina (KURYLOWICZ et al., 1976; BALTCH et al., 1979; TORTORICI, 1980).

Varios enzimas son capaces de modificar a la tobramicina. El que se encuentra más ampliamente distribuido parece ser ANT (2''); frecuentemente está codificado por factores R del grupo P-3. Probablemente todos los enzimas que modifican a la tobramicina están codificados por genes extra-cromosomales, aunque no en todos se ha logrado su transferencia (JACOBY, 1979).

La estreptomycinina es el miembro mejor estudiado del grupo. Se une firmemente a la subunidad 30S del ribosoma produciendo la inhibición de la síntesis proteica. A su vez puede producir errores de lectura en el ARNm (DAVIES, 1971; KURYLOWICZ et al., 1976; HAMMOND y LAMBERT, 1978; LE GOFFIC et al., 1979).

La mayoría de las cepas de P. aeruginosa son resistentes a las concentraciones terapéuticas que se obtienen con estreptomocina. Esta resistencia intrínseca de P. aeruginosa parece ser debida a la baja permeabilidad a este antibiótico, tanto a nivel de la pared celular como de la membrana citoplasmática. Esta forma de resistencia no es transferible por conjugación a E. coli y P. aeruginosa como recipientes. En P. aeruginosa se han detectado enzimas capaces de modificar e inactivar a la estreptomocina en factores R del grupo P-2. También se han descrito factores R que producen resistencia debido a un descenso de acumulación de estreptomocina sin producir modificación del antibiótico (MITSUHASHI et al., 1977; JACOBY, 1979).

Kanamicina actúa inhibiendo la síntesis proteica (DAVIES, 1971; KURYLOWICZ et al., 1976). La mayoría de las cepas de P. aeruginosa son resistentes. Muchas de estas cepas deben contener enzimas del tipo fosfotransferasas y en ocasiones 6'-N-acetilantes que son los responsables de la resistencia natural a la kanamicina. En muchos casos se ha visto que esta resistencia está mediada por factores R.

La iniciación de la síntesis proteica es inhibida por la



neomicina. Este antibiótico también interfiere en la lectura de la información genética del código del trinucleótido registrado en el ADN, transferido por elARNm al sistema ribosomal. El uso clínico de la neomicina, como el de otros antibióticos aminoglicósidos, está limitado por la rápida aparición de cepas resistentes, la falta de absorción en el tracto digestivo y los efectos secundarios, especialmente en el VIII nervio craneal y en los riñones (KURYLOWICZ et al., 1976). Actualmente el empleo de la neomicina está restringido al uso tópico (JACOBY, 1979).

Las polimixinas son antibióticos polipéptidos cíclicos (KURYLOWICZ et al., 1976; HAMMOND y LAMBERT, 1978). Su principal lugar de acción es probablemente los fosfolípidos de la membrana citoplasmática. Esto provoca una reducción de su función como barrera osmótica y de los mecanismos de transporte y síntesis. Estos antibióticos también interaccionan con la parte exterior de la cubierta celular, influyendo esta estructura en la excepcional sensibilidad que caracteriza a P. aeruginosa frente a estos antibióticos (BRYAN, 1979).

La colistina (polimixina E) es muy activa "in vitro" frente a P. aeruginosa. Es muy poco frecuente la presencia de

resistencia en cepas de P. aeruginosa aisladas de hospitales según valores de CMI hallados. El desarrollo de resistencias en raras ocasiones ocurre durante el tratamiento. A pesar de estos resultados "in vitro", la susceptibilidad de P. aeruginosa no ha concordado con los resultados terapéuticos con este agente, especialmente en infecciones sistémicas. Una de las posibles razones puede ser su mala difusión a través de los tejidos y la presencia de cationes que antagonizan la unión de las polimixinas con la parte exterior de la membrana celular, impidiendo su acción (ADLER y FINLAND, 1971; BRYAN, 1979; DAVIES, 1979<sub>a</sub>).

Las tetraciclinas actúan a nivel de los ribosomas inhibiendo la síntesis proteica (KURYLOWICZ et al., 1976; HAMMOND y LAMBERT, 1978). Muchas cepas de P. aeruginosa son relativamente resistentes a niveles terapéuticos de tetraciclina. Sin embargo, un número elevado de estas cepas pueden ser sensibles a concentraciones urinarias, pudiéndose tratar con éxito estas infecciones con drogas de este grupo (BRYAN, 1979).

El mecanismo exacto de resistencia a la tetraciclina mediado por plásmidos R no está totalmente clarificado y probablemente no se definirá hasta que no se conozca con

mayor profundidad el mecanismo de entrada de la tetraciclina dentro de la célula bacteriana. Existen varios trabajos que describen la presencia de resistencia a la tetraciclina mediada por plásmidos R en P. aeruginosa. La mayoría de estos plásmidos tienen un rango de huéspedes restringido, encontrándose plásmidos de los grupos P-2 y P-5 y grupos de compatibilidad no definidos (BRYAN, 1979).

El cloranfenicol actúa inhibiendo la síntesis proteica a nivel de los ribosomas. Bloquea la transferencia peptídica induciendo la liberación prematura de los polipéptidos (KURYLOWICZ et al., 1976; SNOW, 1977; HAMMOND y LAMBERT, 1978). Resulta tóxico para la médula ósea y da lugar con frecuencia a cierto grado de trombocitopenia, leucopenia o anemia (KURYLOWICZ et al., 1976; DAVIS et al., 1978).

Un porcentaje muy elevado de cepas de P. aeruginosa son resistentes a concentraciones de cloranfenicol utilizadas en clínica. El enzima asociado con mayor frecuencia a la resistencia mediada por plásmidos en P. aeruginosa es una acetiltransferasa, formando principalmente el derivado 3-monoacetato (RICHMOND, 1975; SNOW, 1977; MITSUHASHI et al., 1977; BRYAN, 1980). Se ha descrito la presencia de otros factores R que también median resis-

tencia y no están asociados con la presencia de este enzima; parece ser que la resistencia es debida a un descenso de la permeabilidad mediante un mecanismo desconocido (MITSUHASHI et al., 1977). En conclusión, el mecanismo de resistencia no es tan sencillo puesto que se ha descrito la asociación entre ambos tipos de resistencia en una misma cepa (BRYAN, 1979).

Las sulfamidas actúan inhibiendo la reacción entre el intermedio pirofosfato pteridina y el p-aminobenzoato. El efecto inhibitor se puede observar en un sistema enzimático aislado y es reversible por un exceso de p-aminobenzoato. La acción antibacteriana de las sulfamidas es asimismo inhibida por el p-aminobenzoato. Experimentos con sulfamidas marcadas sugirieron que estos antibacterianos no son únicamente inhibidores competitivos del hidropteorato sintetasa, pues pueden de algún modo reemplazar el p-aminobenzoato como sustrato incorporándose de este modo como falso dihidropteorato o dihidrofolato. Esto se añade a su actividad antibacteriana pues el proceso no es reversible. Tanto como inhibidor competitivo o como sustrato, la acción de las sulfamidas depende de su parecido estructural con el p-aminobenzoato (SNOW, 1977; HAMMOND y LAMBERT, 1978; BRYAN, 1980).

Un número elevado de aislados clínicos de P. aeruginosa son resistentes a las sulfamidas, aunque no se conoce exactamente el mecanismo de resistencia. Se han descrito en P. aeruginosa factores R que determinan resistencia a las sulfamidas. Estos plásmidos pertenecen a varios grupos de incompatibilidad. Frecuentemente existe una asociación de la resistencia a las sulfamidas con la resistencia a la estreptomina (BRYAN, 1979).

Según KELLY et al.(1979) las interacciones entre los metales pesados y microorganismos se pueden agrupar en tres categorías :

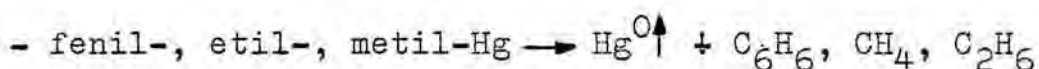
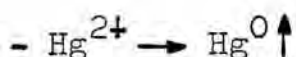
- Papel del metal en el metabolismo esencial o interrupción del metabolismo en el caso de metales tóxicos.
- Acumulación de metales por los organismos, incluyendo la unión a las superficies y absorción intracelular
- Transformaciones bioquímicas de los metales como solubilización y precipitación, cambios de valencia a través de procesos oxidativos o reducciones e interconversión de compuestos metálicos orgánicos e inorgánicos.

El hombre ha conocido las propiedades místicas, médicas, cosméticas y tóxicas del mercurio hace por lo menos 2500 años. El mercurio es un componente natural del medio ambiente como mercurio metálico o sulfuro de mercurio. Su diseminación en el medio ambiente está favorecida por su empleo en un gran número de industrias, calculándose que se elimina de esta forma el 50% de la producción mundial. A este hecho se adiciona la escasa presión de vapor del mercurio, siendo  $Hg^0$  y  $HgS$  extremadamente volátiles (HIGGINS y BURNS, 1975; EHRLICH, 1978).

El mercurio es un elemento metálico tóxico. Su toxicidad se debe a enlaces con los compuestos esenciales sulfhidri-  
lo de las proteínas (KOMURA e IZAKI, 1971; EHRLICH, 1978). Los efectos tóxicos del mercurio en el hombre y su movilidad a través de las cadenas alimenticias están dramáticamente ilustrados en las intoxicaciones de MINAMATA y NIIGATA (Japón) en 1953-1961, debido a una acumulación de metil mercurio en el medio ambiente, produciendo un número elevado de muertes al ingerir pescado de la zona (KOMURA e IZAKI, 1971; HIGGINS y BURNS, 1975; NAKAHARA et al., 1977<sub>a</sub>; MANDELI, 1978).

Las cepas resistentes producen una reducción de los com-

puestos inorgánicos y organomercuriales de  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$  que se volatiliza del medio, excepto con algunos compuestos organomercuriales, debido a su baja tensión de vapor. Los microorganismos pueden realizar las siguientes transformaciones :



Todas estas reacciones que se producen en el mar son debidas al mecanismo enzimático de resistencia al mercurio, teniendo además un significado especial en la movilización del mercurio en el medio acuático (NELSON et al., 1973; COLWELL y NELSON, 1974; SCHOTTEL et al., 1974<sub>b</sub>; HIGGINS y BURNS, 1975; SUMMERS y SILVER, 1978; WEIS et al., 1978).

La reacción de reducción del  $\text{Hg}^{2+}$  tiene las características de una reacción enzimática, es inducible por el  $\text{Hg}^{2+}$ , depende de la temperatura y tiene la característica de la saturación del sustrato (KOMURA et al., 1971; SUMMERS y LEWIS, 1973; COLWELL y NELSON, 1974; KONDO et al., 1974;

SUMMERS et al., 1975; SUMMERS y SILVER, 1978; BRYAN, 1979).

La Hg (II) reductasa, enzima necesario para realizar la vaporización del mercurio, tiene FAD en su grupo prostético. Requiere NADPH o NADH como donador de electrones en la reducción de los iones mercurio. La reducción enzimática de los iones y su consiguiente vaporización requiere un compuesto SH- como 2-mercaptoetanol. Es natural pensar que SH- forma un complejo con  $HgCl_2$  y que este complejo es el verdadero sustrato para la reacción enzimática (KOMURA et al., 1970; KOMURA et al., 1971; IZAKI et al., 1974; WOOD, 1974; MITSUHASHI et al., 1977).

La resistencia al mercurio en *P. aeruginosa* está ligada con la presencia de plásmidos R (SCHOTTEL et al., 1974<sub>a</sub>; SUMMERS et al., 1975; PINNEY, 1978; WEIS et al., 1978). Se han descrito dos tipos de plásmidos que determinan resistencia al mercurio :

- De pequeño espectro, sólo actúan con  $Hg^{2+}$ .
- De amplio espectro, actúan con  $Hg^{2+}$  y organomercuriales (CLARK et al., 1977; SUMMERS y SILVER, 1978; WEIS et al., 1978; BRYAN, 1979 y 1980).



La resistencia al mercurio se halla frecuentemente ligada a la resistencia a antibióticos en el mismo plásmido (LAUB-KUPERSZTEJN et al., 1974; POHL et al., 1974; SCHOTTEL et al., 1974<sub>b</sub>; ALLEN et al., 1977; PINNEY, 1977 y 1978; SUMMERS y SILVER, 1978; SUMMERS et al., 1978). JOLY y CLUZEL (1978) y SUMMERS y SILVER (1978) aislaron un determinante genético que tan sólo codificaba resistencia al mercurio, pudiéndose tratar de un transposón.

Esta resistencia se transmite por plásmidos junto con otros determinantes de resistencia (HIGGINS y BURNS 1975; JOLY y CLUZEL, 1975). En ocasiones esta resistencia se transmite conjuntamente con resistencia a otros metales pesados pero sin encontrarse una relación estable (COLWELL y NELSON, 1974; NELSON y COLWELL, 1975).

Los plásmidos de resistencia al mercurio pueden ser factores que colaboren con la selección de cepas resistentes a los antibióticos dificultando la lucha contra los factores R. En medios acuáticos la concentración de mercurio no es lo suficientemente elevada para favorecer su desarrollo; en animales y hábitats especiales, al elevarse la concentración, se crea el medio idóneo para la selección de estas cepas (POHL et al., 1974; SCHOTTEL et al., 1974<sub>a</sub>).

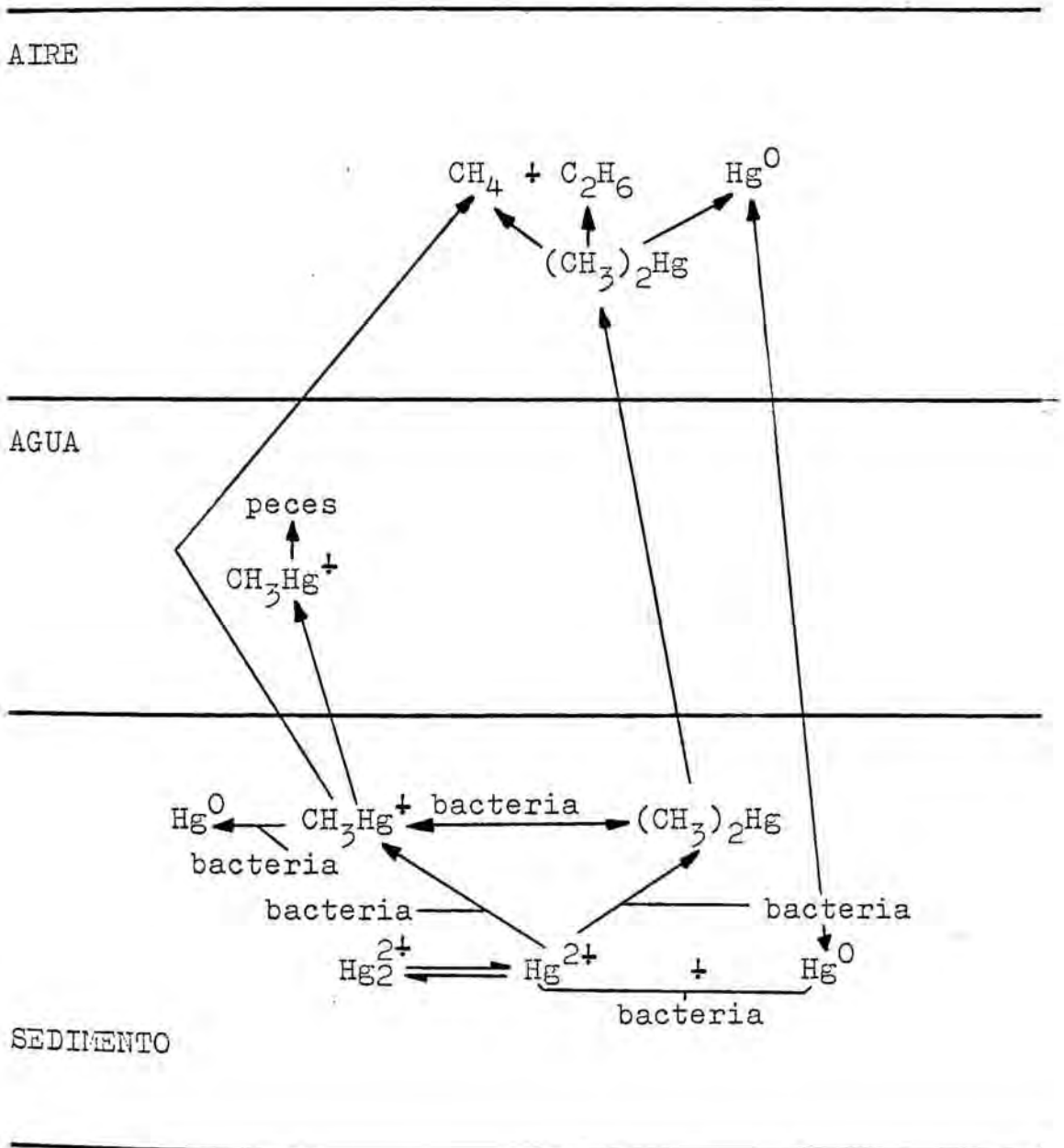
La frecuencia de la resistencia al mercurio es suficientemente alta para que sea un marcador epidemiológico. Estudios de resistencia al mercurio y mercuriales pueden ayudar en la elucidación de relaciones entre plásmidos (SCHOTTTEL et al., 1974<sub>b</sub>). El número total de bacterias resistentes al mercurio en un determinado lugar de muestreo da un índice de la transformación microbiana del mercurio (COLWELL y NELSON, 1974).

Las bacterias son responsables del ciclo del mercurio en el medio acuático, teniendo gran importancia en la movilización de metales pesados. La conversión de  $Hg^{2+}$  a mercurio metálico debe considerarse como un proceso de desintoxicación debido a la evaporación que sufre el mercurio pasando a la atmósfera. En este medio se producen un conjunto de transformaciones, formándose en algunos casos compuestos más tóxicos como el metil-mercurio dependiendo de las condiciones del medio (HIGGINS y BURNS, 1975; SAXENA y HOWARD, 1977). En la FIGURA 3 se describen las reacciones que ocurren en el medio ambiente.

El cromo se encuentra presente en la naturaleza, hallándose en zonas contaminadas por la industria y residuos domésticos en concentraciones superiores a las acepta-

FIGURA 3

Ciclo biológico del mercurio (WOOD, 1974).



das. Esto crea un problema debido a la dificultad de su eliminación de las aguas en su depuración (CANTO JANER et al., 1975). SHIMADA (1978) aísla bacterias resistentes al cromo para realizar la movilización y depuración de este metal del agua de bebida.

Los compuestos de cromo son mutagénicos para las bacterias. Las sales de cromatos inducen "in vitro" transformaciones celulares, teniendo poder carcinógeno y mutagénico (SHIMADA, 1978; NESTMAN et al., 1979; WHITING et al., 1979). Producen ulceraciones en la piel y acumulación en el hígado, tejido óseo y riñón (CANTO JANER et al., 1975), siendo tóxico a altas concentraciones para animales y plantas (HIGGINS y BURN, 1975).

El cromato y dicromato tienen una actividad mutagénica del tipo desplazamiento de la pauta de lectura, asociada a la sustitución de bases en el ADN bacteriano. El  $\text{Cr}^{3+}$  no tiene capacidad mutagénica (VENIT y LEVI, 1974; TAMARO et al., 1975; PETRILLI y DE FLORA, 1977; LOFRONT y AMES, 1978; NESTMAN et al., 1979). De todas formas NAKAMURO et al. (1978), afirmaron que aunque en menor grado, las sales de cromo trivalente son también mutagénicas. SUMMERS et al. (1978), encuentran resistencia al cromo codificada por

plásmidos del grupo IncP-2 y el plásmido pMG6. El ión cromo actúa a su vez como inhibidor competitivo de la absorción del ión sulfato (KELLY et al., 1979).

El descenso del  $\text{Cr}^{6+}$  en el medio es proporcional a la concentración celular a 40°C. No se detectó cromo reducido en la célula, pero sí en el medio de cultivo como  $\text{Cr}^{3+}$  debido a la presencia de enzimas celulares (SHIMADA, 1978). En presencia de cromo se producen cambios en el metabolismo de la glucosa; los metabolitos producidos son capaces de modificar la forma del cromo presente en el medio (DRUCKER et al., 1979).

El contenido de cadmio en los ríos y mares se ha ido incrementando con el tiempo. La capacidad de los microorganismos de acumular cantidades de cadmio parece posible con el consecuente reciclaje de este metal a través de la cadena alimenticia (DOYLE et al., 1975; HIGGINS y BURNS, 1975; SILVER et al., 1976). UCHIDA et al. (1971) encuentran concentraciones de cadmio en peces y moluscos, ENOMOTO y UCHIDA (1973) en alimentos enlatados y carne de pescado. Los compuestos de cadmio también se emplean como fertilizantes y pesticidas. Su acumulación en alimentos produjo la intoxicación denominada ITAI-ITAI en Japón (1955) con un número elevado de muertes (KONDO et al.,

1974; MANDELI, 1978). El cadmio es tóxico en estado catiónico, teniendo mayor toxicidad en estado metilado (SUMMERS y SILVER, 1978).

El cadmio solamente es captado por las células sensibles. KONDO et al. (1974) desarrollaron dos teorías para explicar el mecanismo por el cual el cadmio no entra en las células resistentes :

- Transformación a nivel de membrana citoplasmática, mediada por plásmidos que determinan además producción de penicilinas y provocan la impermeabilidad a los iones cadmio.
  
- Presencia de un mecanismo de reconocimiento diferencial de los iones cadmio y calcio por la presencia de un plásmido, permitiendo solamente la entrada de calcio.

DOYLE et al. (1975) y SILVER et al. (1976) apoyan con los resultados de sus experiencias la teoría del descenso de permeabilidad de las cepas como posible mecanismo de resistencia.

La resistencia al cadmio es constitutiva; la reducción de

la absorción no depende del crecimiento en presencia de cadmio. No se conocen los cambios bioquímicos que conducen a la aparición de la resistencia (SUMMERS y SILVER, 1978).

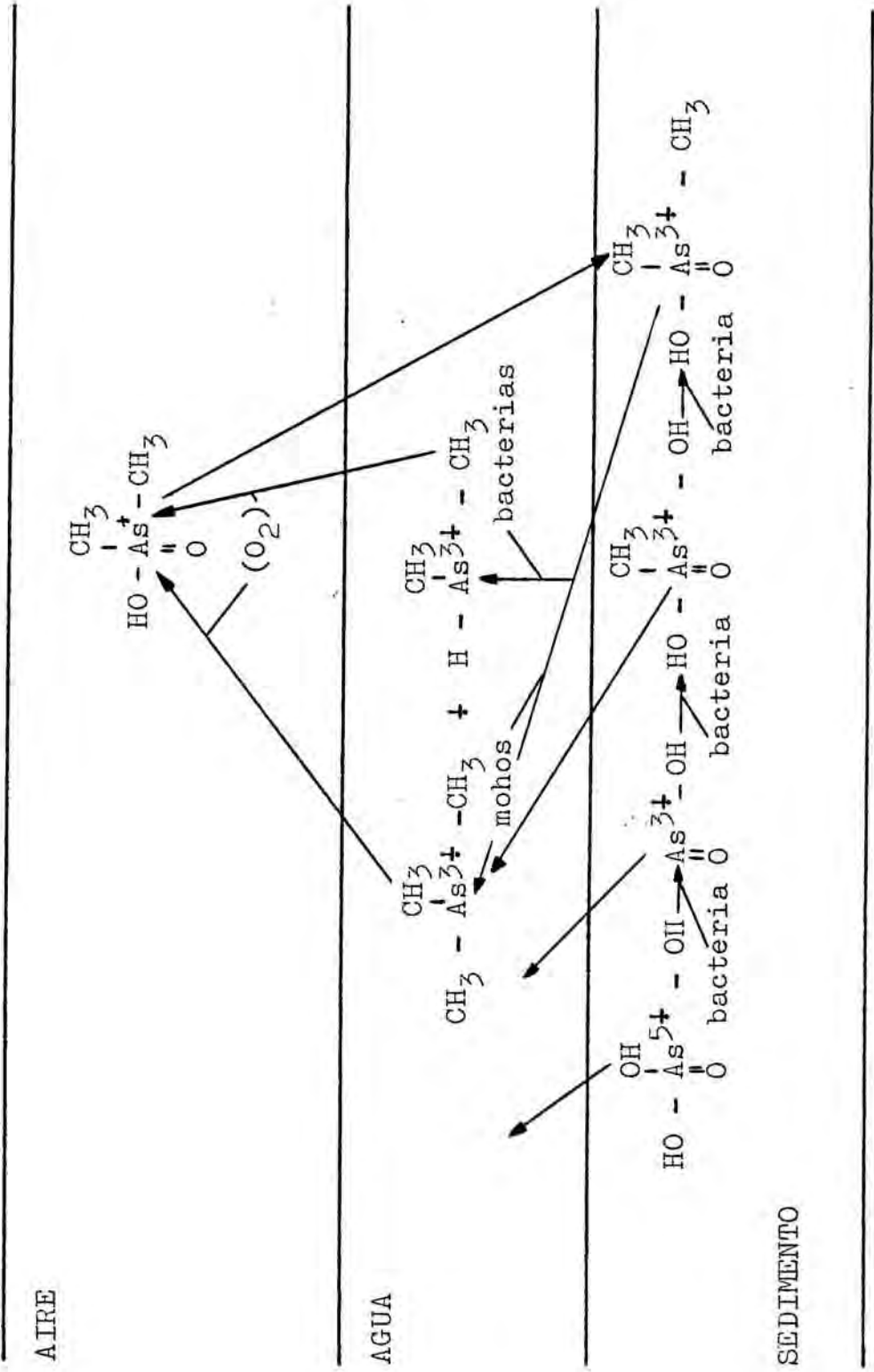
DOYLE et al.(1975) determinan la capacidad de acumular cadmio en seis microorganismos. Dos de ellos, E. coli y Bacillus cereus, son capaces de inmovilizar cantidades elevadas de cadmio a partir del medio de cultivo, pudiendo indicar esta característica la presencia de una resistencia específica a estos iones inorgánicos heredable. SUMMERS y SILVER (1978) y LESTER et al. (1979) sólo han observado altos niveles de resistencia al cadmio determinados por plásmidos en Staphylococcus aureus, los cuales son también responsables de la resistencia a otros metales pesados y antibióticos.

El arsénico aparece en el medio ambiente a través de procesos industriales, utilizándose también en agricultura como pesticida y herbicida, y en medicina. Al hombre le puede llegar por la alimentación y por el agua (EHRlich, 1978; LEONARD y LAUWERYS, 1980).

El arsénico en la naturaleza tiene un ciclo descrito por WOOD en 1974 (FIGURA 4), pudiendo ser movilizado por los

FIGURA 4

Ciclo biológico del arsénico (WOOD, 1974).





microorganismos en el medio acuático (MANDELI, 1978). Se producen dos tipos de transformaciones por bacterias con arsénico inorgánico, oxidación y metilación (SUMMERS y SILVER, 1978).

Se ha descrito su resistencia mediada por plásmidos (SILVER et al., 1976; SUMMERS y SILVER, 1978) y su transferencia en Enterobacteriaceae (HEDGES y BAUMBERG, 1973; SMITH, 1978). LOFROTH y AMES (1978) encontraron que los iones  $As^{3+}$  y  $As^{5+}$  no tenían poder mutagénico.

Los oxianiones de telurio, telurito y telurato son tóxicos para muchos microorganismos. Una excepción es el Corynebacterium diphtheriae que es resistente por naturaleza, utilizándose estos compuestos en medios selectivos. El Streptococcus faecalis y S. aureus también presentan una resistencia característica al telurito (COWAN, 1974; SUMMERS y SILVER, 1978). La toxicidad del telurito es debida a su capacidad de actuar como oxidante fuerte. A concentraciones elevadas y subinhibitorias da lugar a la formación de colonias negras, como resultado de la reducción del telurito y formación de gránulos intracelulares de telurio metálico (TUCKER et al., 1962; SUMMERS y JACOBY, 1977).

La resistencia al telurito es una característica determi-

nada por plásmidos y en P. aeruginosa está asociada específicamente con plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad P-2, desconociéndose el mecanismo de resistencia (SUMMERS et al., 1978). Tanto las cepas resistentes como las sensibles son capaces de reducir las sales hasta formar un precipitado negro de telurito metálico, diferenciándose únicamente en sus concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). No se ha encontrado una correlación entre la resistencia al telurito y cualquier otra resistencia descrita anteriormente a metales pesados y antibióticos, aunque frecuentemente se asocia con resistencia al arsénico, mercurio y plata (SUMMERS y JACOBY, 1977).

Todas las cepas de P. aeruginosa resistentes o no, desprenden olor a ajo cuando crecen a una concentración adecuada de telurio. Este olor es característico de las formas metiladas de los grupos V y VI de la tabla periódica. Los compuestos formados son metil o dimetil telurio, que son volátiles (SUMMERS y JACOBY, 1977; SUMMERS y SILVER, 1978).

Desde la antigüedad se conoce la actividad de los compuestos de plata, utilizándose ampliamente en clínica. En algunos casos se han descrito niveles elevados de resistencia como indican BRIDGES et al. (1979), aunque observaron

que este carácter no era estable, pues se perdía esta resistencia tras sucesivas resiembras. SILVER et al. (1976) y SUMMERS et al. (1978) observaron la presencia de resistencia a la plata pero no pudieron demostrar su transferencia mediante plásmidos.

Los compuestos de plomo se utilizan en los carburantes y en la industria, contaminando el medio ambiente, creando problemas debido a su gran toxicidad (HIGGINS y BURNS, 1975; GERBER et al., 1980). AICKIN y DEAN (1977 y 1978) aislan de zonas polucionadas por plomo cepas bacterianas capaces de acumular cantidades considerables del metal cuando crecen en presencia de sales solubles. Los microorganismos son capaces de movilizar el plomo del suelo, pero pudiéndose producir acumulación en la cadena alimenticia y llegar al hombre. El plomo es bastante tóxico para los microorganismos pudiendo actuar mediante formación de enlaces con los radicales -SH, -NH<sub>2</sub>, -NH de los enzimas o por exclusión de los elementos esenciales como Mn, Fe y Mg (HIGGINS y BURNS, 1975). En *P. aeruginosa* no se han aislado plásmidos que determinen resistencia al plomo (SUMMERS et al., 1978).

El cinc es un micronutriente esencial para el crecimiento

máximo de los microorganismos y otras células. Actúa como componente activador de diversas enzimas, mantiene la integridad de los ribosomas, de las membranas biológicas, de la doble hélice del ADN y de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Altas concentraciones de cinc pueden ser inhibitorias o tóxicas para las actividades celulares y el crecimiento. Se han encontrado concentraciones elevadas de cinc en aguas cercanas a minas, en sedimentos marinos próximos a la costa que reciben aguas residuales y en suelos de zonas industriales (HIGGINS y BURNS, 1975; BABICH y STOTZKY, 1978).

Comparando con otros metales divalentes, se necesitaron concentraciones más altas de  $Zn^{2+}$  para reducir la supervivencia de las bacterias. Esta tolerancia puede ser debida a dos factores :

- Absorción diferencial del  $Zn^{2+}$  en la superficie de la célula.
  
- Actividad como micronutriente.

Actualmente no se conoce el mecanismo responsable de la toxicidad; podría ser debido a una interferencia en el

metabolismo del  $Mg^{2+}$  (BABICH y STOTZKY, 1978).

El talio se encuentra con los sulfuros de los metales pesados, pudiendo contaminar el medio ambiente por residuos industriales. Se emplea en la fabricación de vidrios especiales y algunas de sus sales, por ser venenosas, sirven para exterminar parásitos (BABOR e IBARZ AZNARES, 1964). Se conoce la marcada toxicidad del talio en las especies superiores, pero existe menor información acerca de su acción sobre microorganismos. Los datos publicados muestran la existencia de una considerable variación en la tolerancia que presentan las bacterias a este metal. El  $Tl^+$  puede competir con el  $K^+$ . Al reducir la concentración de  $K^+$  en el medio, puede producirse un incremento de la toxicidad por el  $Tl^+$  (WILSON y DEAN, 1977).

En hábitats donde aparecen concentraciones superiores a las normales de uranio, se ha comprobado que Chlorella lo absorbe, sin verse afectado ningún proceso metabólico (SAKAGUCHI et al., 1978). STRANDBERG et al., (1981) han estudiado recientemente el comportamiento de P. aeruginosa en presencia de nitrato de uranilo. Observaron una acumulación intracelular extremadamente rápida, en menos de diez segundos. No se manifestó una relación con diferentes parámetros

ambientales como temperatura y pH. La presencia de aminoácidos e iones  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  tampoco afectaron su absorción, ni estuvo involucrado el metabolismo. El uranio unido a las células alcanzó una proporción del 10-15% del peso seco. Sólo el 44% de las células de P. aeruginosa mostraron depósitos visibles de uranio cuando se observaron al microscopio electrónico.

El uso de agentes antimicrobianos en medicina, agricultura y veterinaria es la mayor fuerza selectiva de bacterias portadoras de plásmidos que codifican resistencia a los antibióticos. En estudios realizados en el medio ambiente alterado por la presencia del hombre y la industria se observan cada vez concentraciones más elevadas de los elementos denominados metales pesados. Estos elementos ejercen una fuerza selectiva adicional sobre las bacterias. Los mecanismos de resistencia a los metales pesados, en la mayoría de las ocasiones, están codificados por plásmidos R. Para encontrar la posible solución al problema de la resistencia bacteriana, es necesario conocer todos los factores que condicionan el desarrollo de una población microbiana resistente, tanto a nivel hospitalario como a nivel ambiental (SUMMERS y SILVER, 1978).

### 2.3. IMPORTANCIA ECOLOGICA DE P. aeruginosa

#### 2.3.1. ASPECTOS CLINICOS

##### - AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE P. aeruginosa A PARTIR DE MUESTRAS CLINICAS

Se debe adoptar un sistema para el aislamiento y la identificación progresiva de las Pseudomonas a partir de muestras clínicas.

El agar sangre es uno de los medios utilizados para el aislamiento primario y detección de Pseudomonas en los laboratorios bacteriológicos clínicos. Sin embargo, el enriquecimiento con sangre no es esencial para su aislamiento. En agar con peptona se puede observar su crecimiento. Otros medios como agar Desoxicolato según Leifson, agar Mac Conkey o agar Eosina azul de metileno -EMB- también se pueden utilizar. Las Pseudomonas a su vez se pueden aislar, aunque con menos frecuencia, a partir de medios más selectivos como agar Desoxicolato citrato según Leifson, agar Salmonella-Shigella y agar Xilosa lisina desoxicolato. Los medios como agar Cetrimide (Difco, Detroit, Mich.), Pseudosel agar (BBL Microbiology Systems, Cokeysville, Md) y agar para aislamiento de Pseudomonas (Difco) conteniendo

cetrimida, irgasan o compuestos similares se utilizan para el aislamiento selectivo de P. aeruginosa. 35-37°C es la temperatura de incubación recomendable en el aislamiento primario (HUGH y GILARDI, 1980).

Para realizar la identificación de P. aeruginosa, cocobacilo Gram-negativo, se debe estudiar inicialmente si cumple las características bioquímicas de la familia, como presencia de flagelos polares monotricos o en grupo, ausencia de esporas, presencia de metabolismo aerobio obligado sin obtener energía mediante fermentaciones. El oxígeno molecular es el aceptor universal de electrones, pero algunas especies, como P. aeruginosa, son capaces de utilizar los nitratos como un aceptor de electrones alternativo y crecer anaeróbicamente. Este microorganismo produce indofenol oxidasa y catalasa. Presenta ausencia de pigmentos fotosintéticos. No produce indol y acetil-metilcarbinol. La prueba del rojo de metilo es negativa. Las Pseudomonas generalmente no crecen en caldo de Infusión de cerebro y corazón -BHI- a pH 4,5. La mayoría de las especies crecen en un medio mineral base, sin factores de crecimiento, conteniendo el ión amonio como única fuente de nitrógeno y glucosa como única fuente de carbono y energía (RAMOS CORMENZANA, 1979; HUGH y GILARDI, 1980).



Muchas cepas de P. aeruginosa producen piocianina, siendo este microorganismo el único de la familia Pseudomonada-ceae o bacilo Gram-negativo conocido que excreta este pigmento. La mayoría de las cepas de P. aeruginosa oxidan los carbohidratos, pero las cepas que producen piorrubina o piomelanina y las cepas altamente mucosas no realizan esta reacción. Las cepas que no producen piocianina deben tener algún carácter bioquímico aberrante y su identificación puede crear problemas. Tanto en cepas productoras de piocianina o formas no pigmentadas aparece una morfología inestable de las colonias (rugosa, lisa, mucosa). Las cepas altamente mucosas pierden su movilidad (HUGH y GILARDI, 1980).

Las características mínimas para la identificación de la mayoría de las cepas de P. aeruginosa se citan a continuación :

<u>Carácter</u>	<u>Signo</u>	<u>%Positivos</u>
Flagelo polar monotrico, menos de tres por polo	+	96%
Movilidad	+	96%
OF glucosa abierto, ácido	+	97%
Indofenol oxidasa	+	100%

L-Lisina descarboxilasa	-	0%
L-Arginina dihidrolasa	+	99%
Formación de SH <sub>2</sub>	-	0%
Crecimiento a 42°C	+	100%

(GILARDI, 1971; COWAN, 1974; HUGH y GILARDI, 1980).

Otros métodos potencialmente útiles para la identificación de P. aeruginosa son las cantidades relativas de ácidos grasos celulares y reacciones con ácidos nucleicos de células intactas (HUGH y GILARDI, 1980).

#### - TIPADO

Para obtener una diferenciación entre cepas es necesario realizar un tipado. Según la técnica que se emplee podemos obtener diferentes biotipos, antibiotipos, serotipos, aeruginocinotipos y bacteriofagotipos (BROKOPP y FARMER, 1979).

Anteriormente no existía justificación para la realización del tipado de las cepas de P. aeruginosa. Este microorganismo se encontraba asociado tan sólo ocasionalmente con el ambiente hospitalario, sin ser uno de los principales agentes causales de infección y mortalidad.

En la actualidad esta situación ha cambiado totalmente, siendo necesaria la realización del tipado en un número elevado de ocasiones para solucionar problemas epidemiológicos. A este problema se le adiciona la característica ubicuidad de P. aeruginosa que se puede aislar tanto de suelos como de aguas, animales y el hombre. Una de las vías para entender la relación que existe entre estas posibles fuentes y las infecciones en el hombre y animales es la realización del tipado. De esta forma se puede llegar a tener un conocimiento muy profundo de las cepas responsables de la infección, lo que será una ayuda muy significativa al intentar solucionar el problema (BERGAN, 1975; BROKOPF y FARMER, 1979).

#### - BIOTIPADO

El estudio de las reacciones bioquímicas realizadas rutinariamente en el laboratorio se denomina biotipado. Para el biotipado se utilizan las variaciones en marcadores bioquímicos poco frecuentes para poder diferenciar las cepas. La dificultad aparece debido al escaso conocimiento que se tiene sobre la estabilidad genética de dichos marcadores, teniendo un mayor significado el que dos aislados tengan características iguales que distintas. Debi-

do a la presencia de variaciones fenotípicas en P. aeruginosa, las variaciones leves no se deben interpretar muy estrictamente (BOBO et al., 1973).

Dentro de estas reacciones se incluyen tipo de colonia, producción de pigmentos, crecimiento en diferentes medios **selectivos**, producción de olor, hemólisis de la sangre de diferentes animales y resultados de las pruebas bioquímicas. Para poder diferenciar las cepas utilizando este método es necesario que exista una cierta variación de los caracteres fenotípicos, como es el caso de P. aeruginosa. El primer paso en el biotipado es encontrar uno o varios marcadores bioquímicos que normalmente son positivos, pero que son negativos para la cepa a estudiar. Posteriormente se pasa al estudio de las reacciones bioquímicas que son en un 15-85% positivas para dicha especie. La estabilidad genética de los caracteres estudiados en el biotipado se debe profundizar más. Sin embargo, si diferencias muy leves en los modelos bioquímicos no se interpretan de forma demasiado estricta, el biotipado puede ser útil en la identificación de marcadores epidemiológicos (BROKOFF y FARMER, 1979).

### - Antibiotipado

A diferencia de otros métodos de tipado, el antibiograma se realiza de forma rutinaria con la mayoría de las cepas aisladas de P. aeruginosa en laboratorios de hospital. Debido a esta razón, se puede utilizar como un indicador inicial de los problemas debidos a la infección por P. aeruginosa, orientando cuando se deben realizar métodos de tipado adicionales. El antibiotipo es más útil cuando los microorganismos poseen una sensibilidad o resistencia poco frecuente a uno o más agentes antimicrobianos (AYLIFEE, 1978; BROKOPP y FARMER, 1979).

P. aeruginosa es generalmente sensible a colistina, gentamicina, carbenicilina, amikacina y tobramicina; alguna resistencia a estos antibióticos se puede utilizar como marcador epidemiológico. Contrariamente, sensibilidad a sulfadiazina, estreptomycin, kanamicina, tetraciclina o cloranfenicol también se puede emplear como marcador epidemiológico debido a su excepcional presencia (GILARDI, 1971; HOADLEY, 1977; BROKOPP y FARMER, 1979).

BOBO et al. (1973) señalaron que mediante la realización del antibiotipo no se alcanzaba una elevada sensibilidad

debido a su falta de especificidad en ciertas ocasiones. Por esta razón, se puede utilizar como un indicador inicial de los problemas debidos a infección por P. aeruginosa y puede indicar cuándo es necesario realizar otros métodos de tipado adicionales. Estas variaciones en el resultado del antibiograma son a menudo atribuidas a la adquisición o pérdida de factores R. Tiene mucha más importancia el describir dos aislados con idénticos antibiogramas que el que aparezcan distintos. Sabiendo las limitaciones que puede tener este método de tipado, tiene importancia por su uso tan extendido y su sencilla realización. En ocasiones este dato nos puede dar una orientación que puede tener importancia, aplicándose las medidas necesarias (BROKOPP y FARMER, 1979).

#### - Tipado por aeruginocinas

Tal como señala GOVAN (1978), fue Holloway (1960) el primero que remarcó que la capacidad de producir aeruginocinas era una característica común en las cepas de P. aeruginosa y sugirió la posibilidad de utilizar esta característica como marcador epidemiológico de estas cepas. Los modelos de producción y sensibilidad varían de forma considerable entre cepas de P. aeruginosa, siendo esto la base del tipado por aeruginocinas (BERGAN, 1975).

DARRELL y WAHBA en 1964 describieron la técnica del "rayado cruzado" basada en uno de los primeros métodos de tipado por colicinas para E. coli. Se realiza una siembra con una línea en el centro de una placa con agar sangre y se incuba 24 horas a 37°C. Durante este tiempo se producen las aeruginocinas que difunden en el medio. Posteriormente se elimina el crecimiento bacteriano y se siembran perpendicularmente 12 cepas indicadoras, incubándose 18-24 horas a 37°C. Según el tipo de inhibición obtenida se identifican las cepas. El problema es la aparición de inhibiciones parciales que pueden provocar errores de lectura.

Este método fue modificado por ZABRANSKY y DAY (1969) que cultivaron las cepas problema y las indicadoras en Trypticase Soy broth y el tipado lo realizaron en Trypticase Soy agar adicionándole ácido yodoacético, citrato sódico y fosfato dipotásico. De esta forma tiparon el 93% de las cepas.

GILLIES y GOVAN (1966) describieron un nuevo método que se halla actualmente bastante extendido. Utilizan ocho cepas indicadoras escogidas entre más de trescientas.

Estudiaron las condiciones óptimas de incubación de las cepas para la obtención de aeruginocinas en medio sólido. Sembraron las cepas problema (productoras) en agar Tryptona Soja (Oxoid) con un 5% de sangre desfibrinada de caballo e incubándolas 14-18 horas a 32°C. Determinaron la estabilidad del método repitiéndolo en diferentes ocasiones con las mismas cepas, obteniendo una precisión aceptable. Describieron un total de 36 tipos distintos, tipando el 88% de las cepas .

FARMER y HERMAN (1969) utilizaron 27 cepas indicadoras para obtener una mayor subdivisión de los grupos, obteniendo lo que denominan "Fingerprinting" (huella dactilar) de las cepas. De este modo se llega a una diferenciación mucho más fina entre las cepas, eliminándose las agrupaciones poco específicas. La obtención de las aeruginocinas la realizan en medio líquido, Trypticase Soy broth, adicionando mitomicina C y agitación. De esta forma las zonas de inhibición producidas por las gotas de lisados añadidas mecánicamente con un aplicador sobre las cepas indicadoras son más claras y reproducibles. Las zonas de lisis debidas a los fagos se diferencian fácilmente por la presencia de restos celulares. Encon-



traron que 98% de las inhibiciones eran producidas por las aeruginocinas. La principal ventaja de este método es el incremento de sensibilidad alcanzado.

JONES et al. (1974) realizaron unas simplificaciones en el método descrito por FARMER y HERMAN (1969). Seleccionaron 18 cepas indicadoras ALA (Alabama) que presentan las siguientes características :

- Tienen reacciones positivas y negativas claras, eliminándose las reacciones difíciles de leer.
- Aparecen pocas zonas debidas a la lisis de los bacteriófagos, sólo un 1,8%.
- Son las más sensibles para diferenciar aislados clínicos de P. aeruginosa.

La obtención de aeruginocinas la realizan en medio líquido, basándose en que casi todas las cepas de P. aeruginosa pueden usar los nitratos como aceptor final de electrones (JONES et al., 1973). Utilizan el medio 81 que está formado por Trypticase Soy broth sin glucosa (BBL),

adicionándole un 1% de nitrato potásico, obteniéndose de esta forma un crecimiento uniforme en el medio. Con la utilización de este medio de cultivo e incubando las cepas durante 18 horas a 32°C no es necesario añadir mitomicina C y realizar una agitación para obtener una concentración adecuada de aeruginocinas, simplificándose de este modo el desarrollo de la técnica.

La reproducibilidad del método también fue estudiada, encontrando tan sólo ligeras diferencias en las reacciones débiles. Las reacciones claras no variaron nunca (JONES et al., 1974).

Se han descrito modelos de tipado con aeruginocinas por sensibilidad, aunque su uso no esté extendido. OSMAN (1965) describió un método en el que usaba cuatro lisados de aeruginocinas diferentes para tipar 100 cepas, obteniendo 10 modelos distintos.

FARMER y HERMAN (1969) describen otra técnica para el tipado por sensibilidad, utilizando 24 lisados de aeruginocinas de cepas patrón realizando la técnica del "Fingerprinting". Combinan los resultados con el tipado por producción que también realizan.

GOMEZ LUS y RUBIO CALVO (1977) en el tipado por sensibilidad utilizan los lisados de aeruginocinas de las 18 cepas ALA. Consideran este método de valor como complemento del tipado por producción, especialmente con cepas no productoras de aeruginocinas. Combinando ambos métodos tiparon el 100% de las cepas.

- Validez y aplicaciones de la técnica

El control de las infecciones de un hospital está en función del desarrollo de los métodos de tipado (STICHT-GROH, 1979). Debido al número elevado de cepas de P. aeruginosa que existen, se necesita una técnica sencilla de tipado por huella dactilar para determinar la ecología de las infecciones debidas a P. aeruginosa (FARMER y HERMAN, 1974). El valor epidemiológico de los métodos de tipado depende de la frecuencia relativa de los tipos que se encuentran, teniendo menor significado los más comunes (TAGG y MUSHIN, 1973).

FARMER y HERMAN (1974) observaron que con el tipado por aeruginocinas se producían unas ligeras variaciones con el tiempo. La cantidad de aeruginocina producida está en

función de las condiciones de crecimiento, pudiendo ser afectada por cualquier cambio. Generalmente estos cambios no afectan a las reacciones fuertes. Es conveniente de todas formas tipar juntas las cepas a comparar.

Según FAYDI y NABBUT (1978) y GOVAN (1978) la inestabilidad en la producción de aeruginocinas sucede en la minoría de las cepas, produciéndose una pérdida de inhibición frente a alguna cepa indicadora. Como el 50% de las cepas producen más de un tipo de aeruginocinas simultáneamente, la falta de inhibición frente a ciertas cepas indicadoras puede ser debida a la pérdida de un determinante genético para una sola aeruginocina.

Otros autores como JONES et al. (1974), THOMAS et al. (1975) y SCHROTH et al. (1977) observan que el tipado por producción de aeruginocinas es uno de los marcadores más estables y precisos cuando la técnica es controlada correctamente.

En diversas ocasiones se ha tratado de relacionar los resultados obtenidos mediante el tipado por aeruginocinas y la resistencia a los antibióticos o tipado por otro

método. BERGAN (1975) observó que existía una relación entre algunos grupos obtenidos por tipado con aeruginocinas y las reacciones de aglutinación; sin embargo, no encuentra relación entre el tipado con aeruginocinas y con fagos. STICH-GROH (1979), basándose en la prueba del  $X^2$ , encuentra también una relación entre los serogrupos y los aeruginocinotipos. De todas formas, no todos los autores llegan a las mismas conclusiones, como es el caso de EDMONDS et al. (1972) que encuentran una diferencia significativa entre tres métodos de tipado : serológico, con aeruginocinas y con fagos.

GOMEZ LUS y RUBIO CALVO (1977) y SIMON-PUJOL et al. (1980) encuentran una relación entre producción y sensibilidad a las aeruginocinas. También concluyen sobre la presencia de una homogenidad entre algunos serotipos en su aeruginogénesis y su sensibilidad a las aeruginocinas.

El tipado por aeruginocinas, como se ha descrito anteriormente, estudia la capacidad que tienen las cepas de producir una sustancia, mientras que el serotipado viene determinado por la presencia de antígenos en la superficie celular. De hecho las dos técnicas están basadas en dife-

rentes sistemas biológicos y sin embargo, demostrar un grado de correlación no presenta problema en función de su valor, para estudios epidemiológicos. Si todas las cepas causantes de una epidemia tienen un origen común y los dos métodos de tipado se consideran fidedignos, la correlación debe ser absoluta. La falta de correlación completa entre un serotipo y un aeruginotipo sugiere la capacidad de una de las técnicas de subdividir la otra, aunque también podría deberse a una inestabilidad ocasional en los determinantes biológicos en una de las técnicas (GOVAN, 1978).

#### - Serotipado

La serología de P. aeruginosa ha sido discutida por diversos autores, pero en vez de trabajar a partir de resultados previos, se han ido desarrollando sistemas de serotipado independientes, lo que ha provocado una gran dificultad en la comparación de resultados (BROKOPP y FARMER, 1979).

Entre los estudios serológicos iniciales uno de los que ha tenido mayor significado posterior ha sido el realiza-

do por HABS en 1957, que preparó sueros para realizar el tipado de P. aeruginosa a partir de bacterias muertas por el calor y diseñó un esquema antigénico adecuado para la diferenciación práctica de este microorganismo. Con este procedimiento de aglutinación en tubo, agrupó 70 aislados en 12 grupos somáticos.

VERON (1961) realizó el tipado de 142 cepas de origen hospitalario, según el método descrito por HABS, agrupando el 28% en los tipos 0:2 y 0:5, proponiendo una subdivisión para conseguir resultados con mayor valor epidemiológico. Este esquema serológico propuesto es uno de los más extendidos, habiéndose empleado en un número elevado de estudios.

Los esquemas serológicos descritos por VERDER y EVANS (1961) y LANYI (1966/67) son más completos, teniendo en cuenta las reacciones cruzadas y los antígenos estables y lábiles al calor, pero estos esquemas no han alcanzado un amplio reconocimiento. FISHER et al. (1969) describieron un esquema con siete subgrupos que está bastante extendido.

El profesor P.V. LIU bajo los auspicios del subcomité de Pseudomonadaceae y organismos relacionados de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, está encabezando un estudio internacional de colaboración de serología de P. aeruginosa (ICSPS), intentando establecer un esquema internacional de tipado antigénico (IATS) (LANYI y BERGAN, 1978).

Este esquema se ha basado en los 12 grupos O de HABS (1957), primer esquema descrito, cuyo uso está muy extendido y reconocido. A este esquema se ha añadido el O:II de SANDVICK (1960), denominándole en el esquema internacional O:13.

También se han adicionado otros antígenos que derivaban de otros esquemas ya descritos. El número O:14 del sistema de numeración continua es el O:V representado por la cepa tipo 1M-1 en el sistema de VERDER y EVANS (1961).

El número 15 es el O:12 representado por la cepa tipo 170022 de LANYI (1966/67). El O:16 es el antígeno O presente en el O:13 del esquema de HOMMA cuya cepa tipo es YS-74, la cual tiene reacción cruzada con la cepa 170003



de LANYI (1966/67). O:17 es el único antígeno encontrado en O:X de MEITERT (1964). Con este intento de unificar los sistemas serológicos, encabezado por el profesor P.V. LIU, se ha creado el sistema internacional o de numeración continúa.

BROKOPP et al. (1977) realizan un estudio del sistema internacional utilizando antígenos vivos y antígenos muertos al calor, efectuando la aglutinación en porta. A través de sus resultados, observaron que era un sistema de tipado estable y recomendable como paso inicial en estudios epidemiológicos, debido a su sencillez y rápida realización. Para obtener mayor diferenciación entre las cepas recomiendan el empleo del tipado por aeruginocinas o por fagos.

Se han realizado diversos trabajos sobre la correspondencia de los grupos O en los distintos esquemas de tipado serológico de P. aeruginosa. En la TABLA 8 resumimos según LANYI y BERGAN (1978) y BROKOPP y FARMER III (1979) las equivalencias entre los sistemas de tipado más extendidos. Es inevitable que algunos autores relacionen algunas reacciones de forma distinta. Esto depende de la res-

TABLA 8

Comparación de los antígenos O de los principales esquemas de tipado serológico de *P. aeruginosa* (LANYI y BERGAN, 1978; BROKOPP y FARMER III, 1979).

IATS	HABS	SANDVICK	VERDER y EVANS	LANYI	HOMMA et al.	MEITERT	FISHER et al.
	(1957)	(1960)	(1961)	(1966/67)	(1971)	(1964)	(1969)
1	1*	VII	IV	6	10	9	4
2	2*		I	3	7	2	3
3	3*	III	VI	1	1	5	
4	4*	IV		11	6		
5	5*		X	3	2	6	7
6	6*	I	II	4	8	1 6 4	1
7	7*						
8	8*	VIII	VIII	5	3	3	6
9	9*	V	IX	10	4		
10	10*			2	9	8	5
11	11*	VI	III	7	5		2
12	12*	II*	VII	13	14	7	
13			V*		12		
14							
15				12*	11		
16					13*		
17						10*	

146

\*Indica los antígenos propuestos para el sistema IATS

puesta particular del conejo a los antígenos menores y quizás a cambios secundarios de antígenos parciales de cada tipo de cepas (LANYI y BERGAN, 1978).

KODAMA e ISHIMOTO (1976) en el Japón hicieron un estudio comparando los sueros del sistema internacional (Difco) y los del Instituto Toshiba de Ciencias Biológicas (TIBS), con aglutinación en porta, y los sueros del Instituto de Ciencias Médicas de la Universidad de Tokio (IMSUT), con aglutinación en tubo. Comparando la concentración de anticuerpos de Difco y TIBS, el último posee una concentración 4 ó 8 veces superior que Difco, explicando la rapidez de las reacciones que se producen en porta con los sueros TIBS.

Usando cepas control o problema se observaron reacciones cruzadas entre los tipos Difco 7 y 8 y entre 5 y 16. Entre los tipos 13 y 14 sólo aparecieron en una dirección. No se encontraron reacciones cruzadas entre sueros TIBS con las cepas control, pero con las cepas problema sí que se encontraron algunas reacciones cruzadas entre los tipos 2, 7, 13 y 16 y entre 15 y 17.

TERADA et al. (1977) realizaron un trabajo con absorción cruzada y difusión en gel de agar con las cepas patrón de HOMMA y LIU y sus antisueros para estudiar las relaciones antigénicas entre las cepas, mostrando una fuerte aglutinación cruzada. Establecieron equivalencias entre los sueros Homma 0:3 y Liu 0:7 y 0:8; Liu 0:13 y Homma 0:12. En los antisueros Liu 0:13 y 0:14 existen concentraciones elevadas de anticuerpos comunes a ambos antígenos así como un anticuerpo específico a cada antígeno.

HOMMA et al. (1977) compararon varios esquemas antigénicos. Estudiaron las reacciones de los antisueros frente a los distintos grupos de cepas, comprobando si existían equivalencias y reacciones cruzadas. Respecto al sistema internacional (Difco), observaron reacciones cruzadas entre 0:7 y 0:8; 0:13 y 0:14; y 0:5 y 0:16, teniendo 0:2 y 0:5 reacciones cruzadas con los demás sueros.

Basándose en los resultados obtenidos en reacciones de aglutinación, el comité de serotipado de la Sociedad Japonesa de P. aeruginosa propuso los siguientes puntos para la estandarización de los serotipos de P. aeruginosa en el subcomité de Pseudomonas desarrollado bajo los aus-

picios de la Asociación Internacional de Sociedades Microbiológicas en Munich el 5 de septiembre de 1978.

- 1- Clasificación basada en los principales grupos O de antígenos (TABLA 9).
- 2- Técnica recomendable para aglutinación en porta con antígenos vivos.
- 3- Selección de las cepas patrón.
- 4- Método a seguir en la preparación de los sueros de grupo. (HOMMA et al., 1979).

De esta forma aparecen dos tendencias definidas. KUSAMA en 1978 no está de acuerdo con el esquema descrito por HOMMA opinando que no hacen falta nuevos cambios en el esquema propuesto por el equipo internacional encabezado por LIU.

- Propiedades biológicas de los tipos epidemiológicos

En general no aparecen propiedades biológicas distintas en función de los serogrupos. Una predilección por un de-



terminado tipo epidemiológico entre pacientes con similar cuadro clínico, en igual medio ambiente, puede tener una explicación nosocomial (LANYI y BERGAN, 1978).

Diversos autores han revelado que no existe asociación entre serogrupos y susceptibilidad a los antibióticos, patogenicidad, lugar de infección o características bioquímicas (YOUNG y MOODY, 1974; MICHEL-BRIAND et al., 1975<sub>a</sub>; TURGEON, 1977). Sin embargo, algunos autores como DENIS y GODEAU (1972) encontraron con carbenicilina y gentamicina diferencias notables de sensibilidad según el serotipo de la cepa aislada, observando que si un serotipo es más resistente a un antibiótico no tiene porque ser a su vez resistente a los demás antibióticos. Sin embargo, el serotipo que se aísla con más frecuencia, no es el más resistente. Observan que los factores de resistencia transferibles no son más frecuentes en ciertos serotipos; esto podría significar que las diferencias antigénicas y por lo tanto las bioquímicas existen entre los serotipos, pudiendo condicionar parcialmente la sensibilidad o la resistencia a los antibióticos para P. aeruginosa.

- Problemas de reproducibilidad del tipado serológico

DUNCAN et al. (1976) observan que la aglutinación con sue-

ros no absorbidas de P. aeruginosa puede ser atribuida no sólo a los antígenos O, sino también por anticuerpos contra otros componentes termoestables no caracterizados. La poliaglutinación se presenta al existir dos o más factores O que correspondan al suero; esto está favorecido a su vez por la presencia de componentes celulares, sumándose a los factores específicos O.

El problema de la reproducibilidad aparece y, aunque se utilicen esquemas antigénicos bien elaborados, se presentan dificultades. Con frecuencia dentro de un mismo enfermo se presentan varios serogrupos a la vez. En algunos casos aislados se ha descrito que parece ser el mismo microorganismo en el que se producen cambios de un grupo O a otro, o que aparece una estructura antigénica más complicada (LANYI y BERGAN, 1978).

Las conclusiones obtenidas "in vitro" son conflictivas. Parece ser que el serotipo es una característica estable en condiciones normales de mantenimiento de laboratorio, pero se producen cambios antigénicos por las resiembras o por conservación de los cultivos durante largo tiempo (HOMMA, 1971 y 1974). Esto también puede ser producido por un cambio genético en la célula. La especificidad de



los antígenos O está determinada por lo menos en parte por un gen (o genes) localizado cerca del locus LEU del cromosoma de P. aeruginosa (LANYI y BERGAN, 1978).

No hay ninguna técnica para realizar el tipado de P. aeruginosa que dé resultados totalmente satisfactorios. En muchos estudios epidemiológicos las cepas se deben examinar utilizando más de un método de tipado. El biotipado y el antibiograma son los esquemas más simples. Estos métodos de tipado, en centros pequeños, son generalmente las únicas técnicas realizadas, aunque en escasas ocasiones son suficientemente específicas para diferenciar las cepas, excepto cuando se presenta alguna propiedad poco común (BROKOPP y FARMER III, 1979).

El tipado por fagos requiere preparación, mantenimiento y valoración de los bacteriófagos, siendo probablemente la técnica más laboriosa de realizar. Este método es menos reproducible que el tipado por aeruginocinas o el serológico. Una ventaja de este método es que divide las cepas en un número muy elevado de tipos. El serotipado tiene una buena reproducibilidad y la realización de la técnica es de gran sencillez; sin embargo, en algunas ocasiones no se obtiene un número suficiente de subdivisiones (GOVAN, 1978).

El tipado por aeruginocinas es un marcador muy sensible, especialmente en cepas con diferencias mínimas. La desventaja de este método es que las características metabólicas pueden afectar la producción de aeruginocinas (BROKOPP y FARMER III, 1979). De todas formas, actualmente el tipado por aeruginocinas cumple las propiedades necesarias para recomendarlo como único sistema de tipado para P. aeruginosa. Sin embargo, es conveniente que los centros hospitalarios importantes realicen de forma combinada el tipado por aeruginocinas y otra técnica de tipado. Con la realización del tipado por fagos se pueden obtener muchos datos adicionales, pero si se elige el serotipado permitirá realizar un estudio de la correlación entre algunos serotipos y aeruginocinotipos (GOVAN, 1978).

#### - INFECCIONES POR P. aeruginosa

Aunque las infecciones por Gram-negativos son muy frecuentes y graves en huéspedes debilitados, ninguna ha creado tantas dificultades como las producidas por P. aeruginosa. Los microorganismos del grupo de las Pseudomonas no estaban considerados como patógenos en la década de 1940 puesto que raramente ocasionaban enfermedades en humanos. El desarrollo de la terapia antimicrobiana logró

el control de las infecciones por S. aureus permitiendo el desarrollo del patógeno oportunista P. aeruginosa (RODRIGUEZ y BODEY, 1979).

Este microorganismo produce problemas en pacientes bajo instrumentación quirúrgica, pudiéndose introducir las bacterias en tejidos susceptibles, en lesiones con tejidos necróticos o fluidos donde los microorganismos pueden crecer rápidamente a partir de un inóculo pequeño, hasta concentraciones potencialmente invasivas, sin interferencia con las defensas naturales. P. aeruginosa produce una gran cantidad de toxinas y enzimas que le convierten en un invasor potencialmente patógeno si las defensas naturales están alteradas o disminuidas. Su capacidad de crecer como saprófito en el agua con mínimas sustancias nutritivas le convierte en un potencial contaminante en fluidos y soluciones estériles (LOWBURY, 1975).

La emergencia de P. aeruginosa como miembro predominante de la flora microbiana en quemados está asociada con la aparición de sepsis y una elevada mortalidad. En una herida provocada por una quemadura aparecen primero microorganismos Gram-positivos, pero poco a poco se va incrementando la presencia de Gram-negativos, pudiendo incluso

sobrepasar la concentración de  $10^4$ - $10^5$  microorganismos/gramo de tejido. P. aeruginosa se aísla con más frecuencia conforme se incrementa el tiempo desde que se produjo la quemadura, aislándose en un 20% de los pacientes a las 30 horas, pudiéndose incrementar hasta un 60% en el 5º día (PENNINGTON, 1979; PRUITT y LINBERG, 1979).

En pacientes con quemaduras extensas los mecanismos de defensa están marcadamente reducidos, no solamente por la destrucción de la barrera mecánica cutánea, sino también por la alteración del sistema inmunológico. La principal fuente de colonización en las heridas producidas por quemaduras parece ser que es la flora de los pacientes anteriores. El propio tracto gastrointestinal también puede ser una fuente importante de colonización. La presencia de infecciones por Pseudomonas se incrementa con el tamaño de la quemadura, siendo poco frecuente en quemaduras inferiores al 30% del total de la superficie del cuerpo. La sepsis se presenta con más frecuencia en niños menores de 15 años, de forma contraria a las infecciones por P. aeruginosa en otras localizaciones, que se presentan con más facilidad a partir de los 40 años (LOWBURY, 1975). La rápida proliferación de P. aeruginosa inicia el proceso de invasión, produciéndose a continuación infiltración perivascular

provocando trombos en los capilares, empeoramiento de las defensas del tejido permitiendo el inexorable progreso de la invasión seguido por la muerte (PRUIT y LINDBERG, 1979).

El factor más importante para la supervivencia de pacientes con fibrosis cística es la existencia de antibióticos potentes que permitan el control de infecciones bacterianas secundarias del tracto respiratorio. La evolución de la flora bacteriana respiratoria de S. aureus hasta el posterior aislamiento de P. aeruginosa, es consecuencia de la eficacia de los agentes anti-Staphylococcus. Debido a la actividad de los agentes actuales existe la posibilidad de aparición de cepas más resistentes como P. cepacia u otras Pseudomonas (HUANG y DOGGETT, 1979).

Los pacientes con fibrosis cística son particularmente susceptibles a las infecciones pulmonares por P. aeruginosa, en contraste con las otras infecciones crónicas de pulmón (PENNINGTON, 1979; THOMASSEN et al., 1979; MOSS y LEWISTON, 1980). A partir de los esputos de los enfermos con fibrosis cística, se aisló en un 84% de los casos P. aeruginosa, siendo el microorganismo más frecuente. En un 20% de las ocasiones se encontró asociado con S. aureus (SEALE et al., 1979).

Los esputos generalmente contienen P. aeruginosa en forma mucosa, los primeros aislados son normales, incrementándose poco a poco las formas mucosas que son muy poco estables "in vitro" (BERCHE et al., 1979; THOMASSEN et al., 1979). En general las cepas mucosas son más sensibles a los antibióticos que las cepas normales, produciendo resultados diversos en el antibiograma. Se recomienda repetir la técnica para poder concluir cuál es el tratamiento adecuado (BERCHE et al., 1979; SEALE et al., 1979; DEMKO y THOMASSEN, 1980). Algunas cepas mucosas de P. aeruginosa adquieren plásmidos "in vivo" especialmente en presencia de los agentes antimicrobianos más frecuentemente utilizados (MARKOWITZ et al., 1980).

P. aeruginosa generalmente no es el agente causal de neumonías adquiridas en un hospital (nosocomiales), variando su frecuencia según épocas. La colonización nasofaríngea, que se incrementa con el tiempo de hospitalización, podría tener una relación con la aparición de la infección (LOWBURY, 1975; KOHLER y WHITE, 1979).

El tratamiento con antibióticos de las infecciones pulmonares por P. aeruginosa no da resultados satisfactorios, siendo prácticamente imposible la erradicación de este microorganismo por la difícil penetración de los medica-

mentos en el pulmón y la gran producción de secreciones bronquiales (HOOGKAMP-KORSTANJE y WESTERDAAL, 1979).

La septicemia por P. aeruginosa es la principal infección en pacientes con cáncer, aislándose en un 25% de los enfermos hospitalizados con leucemia aguda, frente a un 5% de los pacientes con linfoma y un 3% con tumores sólidos (RODRIGUEZ y BODEY, 1979).

P. aeruginosa causa frecuentemente infecciones en el tracto urinario en pacientes. Sin embargo, P. aeruginosa raramente es el patógeno inicial en infecciones adquiridas fuera del hospital, pero el 11,5% de las adquiridas dentro del hospital son debidas a P. aeruginosa. No se puede diferenciar de otras infecciones urinarias, siendo en muchos casos asintomática, produciendo ocasionalmente fiebre. Se aísla frecuentemente en pacientes que están cateterizados y bajo tratamiento antibiótico para microorganismos más sensibles. Se puede disminuir el número de infecciones mediante el empleo de sistemas de sondaje totalmente estériles y cerrados (LOMBURY, 1975; KOHLER y WHITE, 1979).

Las otitis externas, infecciones óseas y de tejidos blandos adyacentes al canal auditivo son casi siempre debidas a

la presencia de P. aeruginosa (MORENO y DE MAGALAES LOPES, 1974). Este microorganismo crece bien en el canal auditivo externo en condiciones anormales, especialmente en ancianos diabéticos, pero no es frecuente en individuos sanos. El número de infecciones en personas sanas se incrementa especialmente en verano, debido a la contaminación de aguas recreacionales, piscinas o el mar (LEVIN y CABELLI, 1972; SEYFRIED y FRASER, 1980).

Sólo en determinadas ocasiones es el agente causal de meningitis (2%). Su aislamiento se suele asociar con la presencia de leucemia, neurocirugía, punciones lumbares infectadas u otitis mal curadas. Produce graves infecciones oculares como úlceras corneales y endoftalmitis después de traumatismos o intervenciones quirúrgicas, favoreciendo la infección la presencia de la herida. Parte de la virulencia de P. aeruginosa es debida a la producción de colagenasa, proteasas y exotoxinas, provocando una ruptura rápida de la estructura corneal (GRAY y KREGER, 1975; LOLBURY, 1975; KOHLER y WHITE, 1979).

P. aeruginosa merece una seria consideración como agente etiológico en endocarditis infecciosas, sospechadas sólo en ciertas circunstancias, produciendo endocarditis típi-



cas. Podemos resaltar como factores que han predispuesto su aparición la terapia antibiótica, la heroína, la arteriografía y la cateterización cardíaca (KOHLEK y WHITE, 1979). Es un agente bastante común en bacteremias, aislándose en el 8,8% de las de origen nosocomial. Los lugares de entrada pueden ser infecciones urinarias, del aparato respiratorio, aparato digestivo, piel u otros focos desconocidos. Su diagnóstico puede realizarse con hemocultivos o por presencia de antígenos en suero (LOWBURY, 1975; KOHLER y WHITE, 1979).

El papel de P. aeruginosa como patógeno oportunista tiene gran importancia en las infecciones nosocomiales (HIGHSMITH y ABSHIRE, 1975). Podemos citar los siguientes factores específicos que predisponen a la infección como tratamiento con corticoesteroides, antibióticos de amplio espectro, anticancerosos, inmunodepresivos y manipulación quirúrgica (MOODY, 1977). En ambiente hospitalario encontramos todas estas características adicionándose la posible contaminación de utensilios, alimentos y personal que favorecerían la dispersión. Se ha observado que P. aeruginosa puede actuar de forma epidémica, predominando poblaciones de un solo tipo, aislándose sucesivamente en diferentes enfermos (PRUITT y LINDBERG, 1979).

## - INMUNIDAD

Las infecciones por P. aeruginosa se suelen presentar en personas que tienen los mecanismos de defensa alterados; por lo tanto se puede pensar que los mecanismos de defensa específicos y no específicos, locales o sistémicos son eficientes frente a P. aeruginosa. Sin embargo, las infecciones por P. aeruginosa se presentan con gran frecuencia cuando los mecanismos de defensa no específicos están deteriorados (presencia de cateteres intravenosos, urinarios, quemaduras u otro tipo de traumatología) o si los mecanismos inmunológicos específicos son deficientes a pesar de una terapia antibiótica correcta (YOUNG y ARMSTRONG, 1972).

La principal defensa del huésped frente a P. aeruginosa está producida por las células fagocitarias, especialmente neutrófilos. La inmunidad humoral (anticuerpos) aparece como la segunda línea de defensa frente a P. aeruginosa. En pacientes con infecciones serias por P. aeruginosa como fibrosis cística, leucemia y quemados, se han evidenciado unas anormalidades cuantitativas y cualitativas en la función de los neutrófilos, como el factor del huésped más importante asociado con la susceptibilidad a P. aeruginosa (ADUAN y REYNOLDS, 1979).

En pacientes con fibrosis cística, las infecciones respiratorias son las responsables aproximadamente del 90% de las muertes, siendo muy poco frecuente la sepsis extrapulmonar por P. aeruginosa. Esto sugiere un problema a nivel de los mecanismos de defensa locales. En enfermos leucémicos existe una correlación inversa entre el nivel absoluto de granulocitos circulantes y la incidencia de infección. En algunos casos aparecen granulocitos con defecto cualitativo en su función o un descenso de granulocitos maduros circulantes, provocando un deterioro de la fagocitosis. Las variables que están relacionadas con el desarrollo de infección y muerte por P. aeruginosa en quemados son el número de bacterias viables en la herida, nivel y clase de anticuerpos anti-Pseudomonas específicos circulando; número de neutrófilos y calidad de su función (HØIBY, 1979).

Los pacientes colonizados superficialmente por P. aeruginosa no presentan respuesta por anticuerpos, o sino una respuesta muy débil frente a antígenos de P. aeruginosa. En infecciones agudas o graves, aparece una respuesta complicada de anticuerpos, siendo especialmente marcada en pacientes con fibrosis cística. Durante infecciones severas se detectan anticuerpos frente a esta bacteria a

los 5-6 días, siendo más frecuente al cabo de 2-3 semanas. La primera respuesta frente a los LPS (antígenos específicos O y antígenos comunes) de P. aeruginosa consiste principalmente en los anticuerpos IgM, encontrándose más tarde en suero IgG, IgM e IgA. Se ha asociado un buen pronóstico en infecciones agudas por P. aeruginosa con una respuesta de anticuerpos pronunciada. El mecanismo protector de la respuesta por anticuerpos frente a P. aeruginosa está probablemente mediado por la opsonofagocitosis, en gran parte porque se desarrollan opsoninas de tipo específico estables al calor durante el curso de la infección, mientras que la actividad bactericida del suero no se incrementa (HØIBY, 1979).

La inmunidad mediada por células T como respuesta a infecciones por P. aeruginosa, puede tener importancia cuando los otros sistemas de defensa del huésped están deteriorados. No hay evidencia de un incremento en la incidencia de infecciones por P. aeruginosa en pacientes con deficiencias genéticas o adquiridas en las células T (ADUAN y REYNOLDS, 1979).

Se ha demostrado "in vitro" que la presencia de leucocitos polimorfonucleares es crítica en la muerte de P. aeru-

ginosa, la óptima fagocitosis se produce tan sólo en presencia de anticuerpos opsonizantes específicos de Pseudomonas y complemento. Los esfuerzos por incrementar los títulos de anticuerpos en pacientes susceptibles a infecciones por P. aeruginosa pueden ser efectivos para intentar descender la incidencia de estas infecciones y su mortalidad (PENNINGTON, 1979).

Aunque un caso de septicemia por P. aeruginosa fue tratado con éxito por Groves en 1909 con una vacuna de Pseudomonas, la mayoría de la inmunoterapia para las infecciones por Pseudomonas se realizaba mediante la administración de antisueros hiperinmunes específicos, o simplemente por administración de plasma o  $\gamma$ -globulina, con el fin de que los anticuerpos adquiridos naturalmente por el donante pudiesen ejercer una protección frente a la infección (PENNINGTON, 1979).

La búsqueda de una vacuna con capacidad protectora para la mayoría de los serotipos de Pseudomonas se inició con estudios de preparaciones polivalentes de células muertas, basándose en el esquema antigénico de VERDER y EVANS (1961). Se puso en evidencia que los antígenos definidos serológicamente por técnicas "in vitro" no eran necesariamente

antígenos productores de anticuerpos protectores. En 1969 FISHER et al., desarrollaron un nuevo esquema antigénico. Prepararon vacunas monovalentes y estudiaron en ratones la protección cruzada que se obtenía, seleccionando siete antígenos protectores con los que abarcaron el 94% de las cepas. Estos siete antígenos protectores o inmunotipos fueron purificados y caracterizados como LPS estables derivados de la pared celular. A partir de estos siete antígenos purificados se ha preparado una vacuna heptavalente denominada Pseudogen. Uno de los problemas más serios que presenta esta vacuna son los efectos secundarios como dolor y fiebre, siendo la endotoxina la causa de esta reacción (LOWBURY y JONES, 1975; PENNINGTON, 1979).

En quemados el Pseudogen y la inmunoterapia pasiva reducen la posibilidad de sepsis; en enfermos en cuidados intensivos produce una protección débil. Los pacientes con fibrosis cística suelen tener altos títulos de anticuerpos de P. aeruginosa, pero la producción de anticuerpos en las secreciones bronquiales es impredecible; en estos pacientes no se ha podido demostrar una mejora clínica de la infección (PENNINGTON, 1979).

PEV-01 es una vacuna polivalente obtenida a partir de ce-

pas más virulentas entre un número elevado de aislados clínicos de Pseudomonas. En la preparación de esta vacuna se ha intentado obtener la máxima acción protectora con mínimos efectos secundarios. Se serotiparon los aislados, escogiéndose 16 serotipos para su inclusión en la vacuna. Debido a que las paredes celulares contienen antígenos que producen la respuesta por anticuerpos con mayor protección, se desarrolló un sistema para su extracción eliminando los elementos tóxicos de la pared, productores de los efectos secundarios de la vacunación con Pseudogen (FENNINGTON, 1979).

Se realizaron estudios de protección en ratón con PEV-01 obteniéndose excelentes resultados en infecciones intraperitoneales a partir de tres días de la administración de la vacuna. Es interesante destacar que preparaciones de vacuna monovalentes utilizando las mismas técnicas de extracción no fueron tan protectoras frente a serotipos homólogos como las preparaciones polivalentes (FENNINGTON, 1979).

JONES et al. (1978) realizaron un estudio en humanos, observándose una buena producción de anticuerpos (IgM), tolerándose bien la vacuna. Concluyeron que PEV-01 produce

una protección no específica y específica para P. aeruginosa.

La inmunoprofilaxis y la inmunoterapia de infecciones por Pseudomonas ha utilizado los LPS de la pared celular (endotoxina) como antígenos para producir una inmunización, pero la relativa alta incidencia de los efectos secundarios de estos productos ha provocado una continua investigación de productos menos tóxicos. El interés también ha estado dirigido hacia la búsqueda de antígenos comunes entre los aislados de Pseudomonas, lo que permitiría la producción de una vacuna monovalente. HOMMA (1971) aisló y caracterizó la mitad proteica que normalmente está asociada con el LPS de la pared celular de Pseudomonas. Inicialmente se le denominó "proteína A", aunque actualmente se le conoce como "proteína endotoxina original" (OEP). Parece ser que esta proteína es un componente antigénico común para la mayoría de los serotipos de Pseudomonas y puede producir protección cruzada frente a aislados homólogos y heterólogos de Pseudomonas, estando a su vez teóricamente libre de los efectos secundarios asociados con las vacunas con LPS.

Los polisacáridos que se encuentran en la cubierta exte-



rior de Pseudomonas parece ser que presentan propiedades antigénicas siendo necesaria su purificación, eliminándose los LPS asociados. LIEBERMAN (1978) describió un método para romper las células de Pseudomonas aislando y purificando antígenos ribosomales intracelulares. Esta preparación contiene pequeñas cantidades de LPS aunque principalmente está formada por un complejo proteína-ARN.

Debido al éxito discutible del uso de antibióticos en infecciones por P. aeruginosa, se han propuesto otros tipos de tratamientos y profilaxis. Los pacientes con quemaduras, enfermedades neoplásicas, fibrosis cística y dificultades respiratorias presentan un riesgo particular frente a la infección por P. aeruginosa, siendo los pacientes más indicados para la vacunación y/o inmunización pasiva con sueros hiperinmunes. Las vacunas más extendidas utilizan como antígenos los LPS de la pared celular de un número elevado de diferentes serotipos de Pseudomonas (Pseudogen, PARKE DAVIES and Co., Detroit, Mich; FEV-01, WELLCOME RESEARCH Labs., Beckenham, Kent) producen una respuesta primaria de anticuerpos IgM, están asociados con efectos secundarios y producen respuestas de anticuerpos de escasa duración. La vacuna ideal todavía no se ha desarrollado. Su futuro depende de los posibles

adelantos realizados con los agentes antimicrobianos. Los estudios que se efectúan con vacunas y antisueros garantizan el interés de la inmunoterapia de P. aeruginosa (HOMMA, 1980). En la TABLA 10 se resumen las características de la mayoría de las vacunas actualmente en estudio (PENNINGTON, 1979).

#### - TRATAMIENTO

La dificultad existente en el tratamiento de las infecciones producidas por P. aeruginosa es debida en gran parte a su asociación con enfermedades graves como leucemia, quemaduras de tercer grado y fibrosis cística, uniéndose de esta forma dos problemas difíciles de solucionar. A pesar de existir agentes antimicrobianos con considerable efecto "in vitro", permitiendo un control de la infección, existen pocas esperanzas de prolongar la supervivencia del individuo debido a que el estado de la enfermedad es irreversible (YOUNG, 1979).

Las pruebas de sensibilidad "in vitro" se realizan para conocer la actividad probable o la inactividad de los antibióticos en el tratamiento de pacientes con infecciones. En la práctica, se considera una ce<sub>2</sub>a sensible a un anti-

TABLE 10

Propiedades de las vacunas de Pseudomonas (PENNINGTON, 1979)

<u>Vacuna</u>	<u>Activa</u>	<u>Cruzada</u>	<u>Protección Pasiva</u>	<u>Toxicidad</u>
<u>Polivalente</u>				
Pseudogen	sí (A, H) ‡	sí	sí (A, H)	alta
LEV-01	sí (A)	sí	sí (A)	moderada
<u>Monovalente</u>				
OET	sí (A)	sí	sí (A)	baja
Polisacárido (pared celular)	sí (A)	parcial	sí (A)	baja
Polisacárido glicocálix (extracelular)	sí (A)	no	sí (A)	alta
Toxina A toxoide	sí	?	parcial (A)	?
Ribosomas	sí	no	?	?

‡ A = animal, H = hombre

biótico si la concentración mínima inhibitoria (CMI) es inferior a la concentración del antibiótico en el suero del paciente (LOWBURY y JONES, 1975). En infecciones por P. aeruginosa, más que con la mayoría de los restantes microorganismos, es importante conocer que la correlación entre el éxito clínico y los datos de susceptibilidad al antibiótico "in vitro" puede ser muy baja. Existen muchos factores "in vivo" que no se pueden valorar en las pruebas de susceptibilidad "in vitro". Esto incluye concentraciones alcanzadas en suero y tejidos, concentración de cationes, pH, nivel de oxigenación de los tejidos, efecto de unión a las proteínas o membranas celulares, defensas del huésped y cambios en el fenotipo bacteriano. BRYAN (1979) concluye que existe una tendencia a sobreestimar la susceptibilidad de P. aeruginosa a varios agentes antimicrobianos en pruebas de susceptibilidad "in vitro".

Los agentes antimicrobianos disponibles para el tratamiento de las infecciones sistémicas causadas por P. aeruginosa se pueden agrupar en tres categorías : polimixinas (sulfato de polimixina B y colistina); aminoglicósidos dentro de los cuales se encuentran gentamicina, tobramicina y amikacina, que se han empezado a utilizar en esta última década, y penicilinas de amplio espectro, carbeni-

cilina y posteriormente ticarcillín (LOWBURY y JONES, 1975). Actualmente existe una intensa actividad en el desarrollo de nuevos compuestos pertenecientes a los dos últimos grupos, obteniéndose similares propiedades farmacológicas o espectro de acción. Se ha observado que otras sustancias poseen acción anti-Pseudomonas cuando se emplean tópicamente o como desinfectantes, pero no están indicadas para el tratamiento de infecciones sistémicas (YOUNG, 1979).

A pesar del número elevado de resultados relacionados con el tratamiento antimicrobiano en infecciones por P. aeruginosa, los resultados clínicos de diferentes tratamientos son escasamente comparables y pocos autores han evaluado un tratamiento distribuido de una forma randomizada. Es obvio que consideraciones éticas no permiten la distribución o no de un tratamiento en personas con sepsis sospechadas (YOUNG, 1979).

Aunque diversos resultados indican que tetraciclina, estreptomycin y cloranfenicol ocasionalmente tienen actividad anti-Pseudomonas, hasta 1969 las polimixinas eran los únicos antibióticos con actividad "in vitro" frente a P. aeruginosa (RODRIGUEZ y BODEY, 1979). Virtualmente todas

las cepas aún son susceptibles, sin haberse descrito un plásmido que medie inactivación enzimática frente a estos antibióticos (YOUNG, 1979). Sin embargo, existe la duda de la eficacia de estos antibióticos en infecciones por P. aeruginosa, debido a que pierden aproximadamente el 50% de su actividad en presencia de suero y calcio, difunden poco en tejidos y son nefrotóxicos. De todas formas podrían tener importancia en el tratamiento de infecciones resistentes a los aminoglicósidos combinándose con penicilinas semisintéticas (LOWBURY y JONES, 1975).

El uso de polimixinas en infecciones sistémicas por Pseudomonas ha sido ampliamente sustituido por la terapia con aminoglicósidos y penicilinas de amplio espectro. Según datos clínicos sobre tratamiento con polimixina B y Colistina, se observa un porcentaje elevado de mortalidad, lo que pone a estos compuestos en una posición poco favorable. Estos compuestos se utilizan en preparaciones tópicas antimicrobianas en las cuales su efectividad ha sido puesta en duda. Para el tratamiento de meningitis por Gram-negativos algunos autores defienden la administración intratecal de polimixina B, aunque se ha utilizado con éxito esta vía con aminoglicósidos. Actualmente se tiene poca confianza en que otros agentes ejerzan una

acción importante sobre las infecciones sistémicas por Pseudomonas. En algunas instituciones aparecen microorganismos resistentes no sólo a gentamicina y tobramicina sino también a amikacina y a aminoglicósidos anti-Pseudomonas semisintéticos. Por lo tanto, la ausencia de documentación de resistencia transferible a las polimixinas puede tener una importancia en el tratamiento de las infecciones resistentes a los aminoglicósidos. La combinación de las polimixinas con las penicilinas semisintéticas como carbenicilina, podría tener una nueva actividad (YOUNG, 1979).

Debido al incremento de las infecciones graves por bacilos Gram-negativos, ha habido un considerable interés en los antimicrobianos del tipo de los aminoglicósidos en esta década. De todas formas se debe recordar que este tipo de antibióticos no son de reciente descubrimiento. Uno de los antibióticos más antiguos que actualmente todavía se emplea es la estreptomicina. Este antibiótico tiene poca actividad actualmente en infecciones nosocomiales por Gram-negativos y especialmente Pseudomonas. Las características asociadas a este compuesto son las de los aminoglicósidos :

- Acción bactericida rápida
- Actividad "in vitro" frente a Gram-negativos y micobacterias
- Acción sinérgica con agentes que posean anillo  $\beta$ -lactámico en su molécula
- Efectos secundarios tóxicos sobre la función renal; ototóxicos (YOUNG, 1979).

El agente más importante de este grupo y el primero con actividad sobre la mayoría de los bacilos Gram-negativos aislados en clínica, incluyendo a P. aeruginosa, fue la gentamicina (HUANG y DOGGETT, 1979; RODRIGUEZ y BODEY, 1979). Estudios posteriores pusieron en duda su actividad debido a su falta de acción en septicemias de pacientes neutropénicos, presencia de inactivación o nefrotoxicidad. La emergencia de resistencia a la gentamicina está relacionada con factores epidemiológicos locales, como su uso extendido en brotes infecciosos en quemados. A pesar de la aparición de P. aeruginosa resistentes a la gen-



tamicina por plásmidos, es útil especialmente en infecciones urinarias donde se alcanzan concentraciones elevadas (YOUNG, 1979).

Tobramicina es un aminoglicósido con propiedades comparables a la gentamicina como dosis, vía de administración, toxicidad y farmacocinética. La mayoría de los enzimas que le inactivan también actúan con la gentamicina (HUANG y DOGGETT, 1979; RODRIGUEZ y BODEY, 1979). La diferencia más remarcable se encuentra en su actividad anti-Pseudomonas. Estudios "in vitro" sugieren una mayor actividad de tobramicina respecto a gentamicina frente al mismo grupo de cepas de P. aeruginosa (AL DELAMI y DENIS, 1976; KELLY y MATSEN, 1976). Amikacina es farmacocinéticamente similar a kanamicina, pero tiene actividad frente a P. aeruginosa (HUANG y DOGGETT, 1979). Sus principales ventajas son el alto nivel que alcanza en sangre y su menor susceptibilidad a la inactivación enzimática, siendo especialmente indicado para microorganismos resistentes a gentamicina y tobramicina, sin olvidar su nefro y ototoxicidad (RODRIGUEZ y BODEY, 1979).

Entre los aminoglicósidos descritos más recientemente se encuentra la netilmicina, con una actividad "in vitro" frente a P. aeruginosa similar a la de gentamicina, aunque parece ser menos tóxico. La acción de la sisomicina frente a P. aeruginosa es intermedia entre tobramicina y gentamicina (RODRIGUEZ y BODEY, 1979).

Carbenicilina fue la primera penicilina semisintética con actividad significativa frente a P. aeruginosa (YU y WASHINGTON II, 1977; HUANG y DOGGETT, 1979). Su actividad anti-Pseudomonas no fue apreciada inicialmente debido a que se utilizaban concentraciones terapéuticas demasiado bajas. La mayoría de los aislados de P. aeruginosa son inhibidos "in vitro" por concentraciones de 50-200 µg/ml, niveles que generalmente son considerados inefectivos para uso clínico. Debido a su escasa toxicidad se pueden administrar altas dosis, si es necesario (RODRIGUEZ y BODEY, 1979; YOUNG, 1979).

Carbenicilina es un antibiótico inestable. Después de su administración parenteral se excreta por los riñones, reduciéndose el nivel en suero rápidamente. Por esta razón se administra generalmente con probenecid, lo que produce un ligero incremento de la concentración máxima en suero,

prolongando la existencia de una concentración moderada cuatro horas después de su administración (HUANG y DOGGETT, 1979).

La actividad de carbenicilina frente a P. aeruginosa está en función de su penetración dentro de la bacteria más que por la resistencia a la degradación mediante enzimas del tipo  $\beta$ -lactamasas. Muchas cepas de P. aeruginosa elaboran dichos enzimas, pero son susceptibles a la carbenicilina debido al transporte de estos agentes antimicrobianos dentro de la célula. Evaluando los resultados clínicos obtenidos con carbenicilina, se presentan problemas similares en la interpretación de los resultados a los hallados con los aminoglicósidos. En infecciones urinarias e infecciones moderadas localizadas, se ha utilizado carbenicilina con éxitos substanciales. En infecciones más graves, carbenicilina generalmente se emplea en combinación con un aminoglicósido. Con dosis relativamente bajas en infecciones urinarias, de 12 g/día de carbenicilina, han respondido el 80% de los pacientes. Sin embargo, aproximadamente el 15% de los mismos no han respondido, recayendo al finalizar la medicación. Otro problema a tener en cuenta es la aparición de resistencias en pacientes

gravemente enfermos al utilizar únicamente carbenicilina como tratamiento (YOUNG, 1979).

Ticarcillin tiene una actividad antibacteriana comparable a la carbenicilina, aunque es más efectivo frente a P. aeruginosa. Su acción es bactericida y su actividad no se reduce de forma marcada en suero. Es sinérgico con gentamicina y aminoglicósidos frente a P. aeruginosa. Se pueden obtener concentraciones más altas y prolongadas en suero con administración concomitante de probenecid (HUANG y DOGGETT, 1979; RODRIGUEZ y BODEY, 1979).

Debido al escaso pronóstico de una infección por Pseudomonas es lógico pensar en la posible combinación de un aminoglicósido y un  $\beta$ -lactámico. Con su asociación se puede reducir la toxicidad del aminoglicósido al no ser necesarias dosis tan elevadas. La necesidad de amplios intervalos entre las dosis de aminoglicósidos condiciona la presencia de niveles subinhibitorios. Con la administración de un  $\beta$ -lactámico se pueden obtener niveles más constantes de actividad antimicrobiana. Adicionalmente el uso de ambos agentes puede tener un efecto antimicrobiano sinérgico (YOUNG, 1979).

A pesar de las probables ventajas de utilizar aminoglicósidos combinados con penicilinas de amplio espectro, paradójicamente, bajo ciertas circunstancias, agentes como carbenicilina pueden inactivar a gentamicina. Esto es debido a la formación de una amida biológicamente inactiva entre los grupos amino del aminoglicósido y el grupo carboxilo de la penicilina. Clínicamente este hecho no tiene importancia en pacientes con funcionamiento renal normal. Sin embargo, se han observado niveles más bajos de gentamicina a los esperados asociados con problemas renales, al existir un contacto más largo de los dos antibióticos, siendo posible su inactivación (YOUNG, 1979).

La vigilancia del uso de los antibióticos es esencial para evitar la emergencia y la diseminación de bacterias resistentes. Esto se puede realizar controlando su empleo, especialmente en hospitales, utilizando determinados antibióticos tan sólo en casos especiales. Se ha de procurar evitar la infección cruzada entre pacientes, pues es una de las principales formas de transferencia de bacterias resistentes. El uso de dos antibióticos de forma simultánea ofrece una mayor seguridad en la terapéutica, tanto por el posible efecto sinérgico como por la mayor dificultad en la aparición de resistencias múltiples (LOWBURY y JONES, 1975).

### 2.3.2. ASPECTOS AMBIENTALES

#### - MEDIO AMBIENTE HOSPITALARIO

Las infecciones producidas durante el período de hospitalización de los pacientes crean serios problemas. Son muchos los microorganismos capaces de causar infecciones nosocomiales (THOMAS et al., 1975).

Se denomina infección nosocomial, a la infección que se produce durante la hospitalización, pero que no estaba presente o en incubación antes de la admisión del paciente en el hospital (SCHABERG et al., 1980). Las infecciones que se producen después del alta del enfermo se consideran también nosocomiales si se juzga que el agente causal ha sido adquirido durante la hospitalización (ISENBERG, 1974; REBER et al., 1978). Es importante conocer la envergadura del problema de las infecciones nosocomiales. El estudio del desarrollo de estas infecciones en hospitales indica que de un 4% a un 8% del total de las admisiones desarrollan este tipo de infección (DASCHNER et al., 1978; EICKHOFF, 1978).

Las infecciones del tracto urinario son las infecciones

más típicas de origen nosocomial presentándose en un 40% de las totales observadas. Las infecciones producidas en heridas quirúrgicas son en un 24% de origen nosocomial, mientras que las del tracto respiratorio bajo comprenden un 16%. Las bacteremias, que tan sólo representan un 5% del total de las infecciones nosocomiales, son las más graves debido a que están asociadas con los niveles más altos de mortalidad. La posibilidad de infección se incrementa con la duración de la estancia en el hospital (DASCHNER et al., 1978; EICKHOFF, 1978; REBER et al., 1978; SCHABERG et al., 1980).

Entre los microorganismos que con más frecuencia son los agentes causales de las infecciones nosocomiales se encuentran E. coli (20,9%), S. aureus (9,6%), P. aeruginosa (8,9%), y Klebsiella pneumoniae (8,5%) (SCHABERG et al., 1980).

Existen varias razones por las que los microorganismos Gram-negativos han emergido como patógenos predominantes en infecciones hospitalarias. Con el desarrollo de nuevas técnicas médicas se han visto distorsionados los mecanismos de defensa naturales del huésped. De esta forma los pacientes son susceptibles a microorganismos que en otras circunstancias se consideran de escasa virulencia. Estos

microorganismos patógenos pueden provenir de su propia flora, adquiriendo su poder patógeno mediante la selección producida por la terapia antibiótica. El problema adquiere mayor gravedad cuando un microorganismo Gram-negativo multirresistente se vuelve residente dentro del medio ambiente hospitalario. Bajo estas circunstancias los pacientes que reciben antibióticos casi exclusivamente son colonizados primero en la piel, posteriormente en la faringe, pasando a ser portadores intestinales de algunas especies. Estos pacientes parecen ser los más adecuados para desarrollar una infección nosocomial (PASH, 1974; SCHABERG et al., 1980).

Las cepas productoras de infecciones nosocomiales pueden tener diferentes orígenes. Entre éstos puede ser el propio paciente, que es portador de P. aeruginosa en el intestino con mayor frecuencia que los individuos sanos. Los alimentos y los medicamentos pueden actuar también como vehículos de posibles cepas patógenas, junto con el medio ambiente inanimado contaminado (PARKER, 1978).

- Formas farmacéuticas no estériles

Los primeros trabajos que demostraron la contaminación



de los productos farmacéuticos por P. aeruginosa fueron realizados por Garretson y Cosgrove en 1927, que sospecharon de una solución de ácido bórico al 4% como origen de infecciones oculares (RICHARDS, 1975).

Según BAIRD et al. (1976<sub>a</sub>) el "Public Health Laboratory Service" en 1971 examinó 1220 muestras de medicamentos, tanto de vía oral como de uso tópico, encontrando un 32% contaminados, de los cuales un 2,7% contenían P. aeruginosa.

La farmacia del hospital tiene gran importancia debido a su relación directa con el enfermo a través del medicamento. Es importante el mantenimiento de las entidades farmacéuticas libres de contaminación bacteriana, habiéndose relacionado un número elevado de infecciones con presencia de contaminación en los medicamentos (WARGO, 1973).

Los microorganismos pueden pasar del medio ambiente de la farmacia a los pacientes, actuando como vectores los medicamentos (BAIRD et al., 1977). Esto concuerda con los resultados obtenidos en los estudios realizados por WHITBY y RAMPLING en 1972 comparando el medio ambiente doméstico y hospitalario respecto a la contaminación por P. ae-

ruginosa. Observaron que los suelos y material de limpieza estaban contaminados con mucha más frecuencia en hospitales. A estos datos se adicionan las características metabólicas que tiene P. aeruginosa, pudiendo permanecer viable durante períodos prolongados de tiempo en los productos farmacéuticos elaborados (BAIRD y SHOOTER, 1976).

BAIRD et al. (1976<sub>a</sub>) aislaron P. aeruginosa en un 9% de los productos preparados en la farmacia del hospital. En 11 muestras encontraron una relación con las cepas aisladas de los enfermos. P. aeruginosa se ha aislado en todo tipo de preparados, en cremas y productos de uso tópico (NOBLE y SAVIN, 1966; HART y RATANSI, 1975), en alimentación parenteral (GELBART et al., 1973; MELLY et al., 1975; HOLMES y ALLWOOD, 1979), jarabes, elixires, suspensiones (HIRSCH et al., 1969), colirios (DONY, 1976) y desinfectantes (CLANCY, 1973; PASH, 1974; HOLDER, 1977; HUGH y GILARDI, 1980).

La contaminación puede producirse durante su utilización, especialmente en productos de uso tópico, actuando el medicamento como vector, transmitiendo el microorganismo entre los enfermos (DONY, 1977; BAIRD, 1979). WARGO (1973) observó una contaminación por cocos Gram-negativos y algún

bacilo Gram-negativo en el 20% de los medicamentos analizados, elevándose esta cifra al 93% después de su uso.

En estudios epidemiológicos se ha observado, en algunos casos, la presencia de las mismas cepas en medicamentos y pacientes, colaborando a resaltar la importancia de las formas farmacéuticas no estériles como posibles vectores de transferencia de microorganismos, especialmente de P. aeruginosa, que sus escasos requerimientos nutritivos y su gran versatilidad metabólica, posibilitan su transferencia mediante estos vehículos (BAIRD y SHOOTER, 1976).

HIRISH et al. (1969) indican que se debe realizar un control del personal que trabaja en la farmacia. P. aeruginosa se puede aislar de diversas partes del cuerpo humano, pudiendo actuar por lo tanto como una fuente potencial de contaminación (RICHARDS, 1975). La materia prima, especialmente los productos naturales, deben ser analizados con atención antes de iniciar el proceso de fabricación de las formas farmacéuticas (RICHARDS, 1975; DONY, 1977). El agua se utiliza en un número elevado de ocasiones para suspender, disolver o emulsionar componentes activos de medicamentos manufacturados en farmacias de hospitales, siendo una posible fuente de contaminación por Gram-nega-

tivos de las formas farmacéuticas (RICHARDS, 1975). FAVERO et al. (1971) y BAIRD et al. (1976<sub>b</sub>) aislaron P. aeruginosa a partir de agua destilada. Debido a sus escasos requerimientos nutritivos puede permanecer viable en este medio durante prolongados períodos de tiempo.

BAIRD et al. (1977) recomiendan la realización de un examen microbiológico de todos los medicamentos antes de ser distribuidos en el hospital como medida preventiva, indicando la necesidad de establecer unos patrones en la manufacturación de las formas farmacéuticas no estériles, controlando la presencia de microorganismos.

Tanto la British Pharmacopœia -B.P.- (1980), como la United States Pharmacopeia -U.S.P.- (1980), indican la necesidad de efectuar exámenes para determinar el número de microorganismos aerobios vivos y la presencia de determinadas especies, como P. aeruginosa, en productos farmacéuticos no estériles. Algunos autores llegan a aconsejar la ausencia de P. aeruginosa en 0,1 g ó 0,1 ml, sin embargo otros exigen la ausencia de este microorganismo en 1 g ó 1 ml. La presencia de microorganismos en medicamentos, aparte de las posibles infecciones que puedan ocasionar, puede alterar

las características organolépticas, metabolizar sustancias con pérdida de actividad y/o variar las características galénicas del preparado, alterándose de tal forma el medicamento que impida su uso (DONY, 1972).

#### - Alimentos

Los alimentos que recibe el enfermo son una fuente potencial de infección. Según GREEN et al. (1974), PASCH (1974) y SCHROTH et al. (1977) la transferencia de microorganismos al paciente a través de la alimentación puede realizarse de tres maneras :

- El propio alimento. Son pocos los que llegan estériles al hospital, encontrándose microorganismos potencialmente patógenos en la superficie del alimento.
- Personal auxiliar. El cumplimiento poco estricto de las normas de higiene puede ser causa de la transferencia de los microorganismos a los pacientes.
- Mala conservación de los productos, tanto por una insuficiente cocción o refrigeración, como por condiciones incorrectas de almacenaje.

Es necesario una concentración de  $10^6$  P. aeruginosa o más en individuos sanos para poder aislar este microorganismo a partir de las heces (LEVISON, 1977). Aun así no se produce colonización siempre, aislándose P. aeruginosa en bajas concentraciones durante un número escaso de días. Por lo tanto debe existir un potente mecanismo de defensa en el huésped frente a la colonización por P. aeruginosa en el tracto gastrointestinal. La colonización por P. aeruginosa con mayor frecuencia se produce en personas que reciben tratamiento con antibióticos a los cuales dicho microorganismo es resistente. Esto favorece su implantación en el medio, debido a que se elimina la flora normal que interfiere con la colonización de una bacteria exógena. De esta forma el enfermo se vuelve portador de P. aeruginosa durante tiempo indefinido (LEVINSON, 1977; RODRIGUEZ y BODEY, 1979).

Diferentes autores han estudiado este problema, SHOOTER et al. (1971) encontraron niveles altos de contaminación por P. aeruginosa en comida de hospitales, pudiendo afectar de forma directa al enfermo. KOMINOS et al. (1977) evidenciaron que la comida servida a pacientes con o sin control influye de forma directa en el número de infecciones, coincidiendo sus resultados con los anteriormente descritos.

BLOOMFIELD (1978) observó que el número de personas portadoras de P. aeruginosa es mucho más elevado en ambiente hospitalario, habiéndose aislado este microorganismo de heces en un 38% de los casos. En su estudio tan sólo vió un 6% de individuos sanos como portadores durante un número escaso de días, existiendo una diferencia apreciable en ambos ambientes.

WRIGHT et al. (1976) realizaron un estudio con vegetales de un hospital, aislando P. aeruginosa en un 44% de las muestras estudiadas. KOMINOS et al. (1972<sub>a</sub>) aislaron P. aeruginosa en 82% de las muestras de tomate analizadas. Remarcaron la acción de los vegetales como vía de entrada de microorganismos potencialmente patógenos en ambiente hospitalario al encontrar las mismas cepas en pacientes hospitalizados, existiendo la posibilidad de desarrollar infecciones a partir de sus propias cepas (SHOOTER et al., 1969; RICHARDS, 1975).

El tratamiento conjuntamente con la ingestión de vegetales podría facilitar la colonización intestinal por P. aeruginosa. Es conveniente en individuos especialmente sensibles, eliminar de su dieta los productos crudos, como verduras y frutas, intentando disminuir de esta forma la posibilidad

de infección a través de estos productos (KOMINOS et al., 1972<sub>a</sub>; KOMINOS et al., 1977).

- Medio ambiente hospitalario inerte

Existen otras fuentes potenciales de infección por P. aeruginosa en medio hospitalario, caracterizándose en todos los casos por ser zonas de un porcentaje elevado de humedad. Este microorganismo se ha aislado principalmente de desagües de lavabos y fregaderos, grifos, material quirúrgico, utensilios de limpieza y suelos (AYLIFFE et al., 1965; AYLIFFE et al., 1967; AYLIFFE et al., 1974; SCHROTH et al., 1977).

A pesar de aparecer los fregaderos como focos importantes de infección, se debe establecer la unión de este reservorio con los pacientes. Para intentar establecer este enlace se realizaron estudios de la nasofaringe, pelo y manos del personal sanitario. Se aisló P. aeruginosa en diversas ocasiones, especialmente de manos húmedas de enfermeras que habían estado en contacto reciente con zonas contaminadas. Mediante el estudio serológico de dichas cepas se observó que las procedentes de los pacientes y las aisladas de posibles focos de contaminación inertes pertenecían



al mismo serotipo (KOMINOS et al., 1972<sub>b</sub>; HOLDER, 1977).

Según HOLDER (1977) un modo de diseminación de P. aeruginosa en ambiente hospitalario podría ser a través de las enfermeras y personal sanitario, que se encargarían del transporte de las cepas desde las zonas contaminadas hasta el paciente. Este proceso se puede realizar a su vez de forma inversa, contaminándose las zonas húmedas con las cepas procedentes de los enfermos. De esta forma se completa el ciclo pudiendo ser realizado por toda persona que tenga entrada en dicha área. Este ciclo podría también ser iniciado por el propio paciente, creando un foco de contaminación especialmente en áreas de elevado grado de humedad.

Se pueden adoptar diversas medidas para intentar romper el ciclo establecido. Se recomienda un control estricto de la higiene, tanto a nivel del personal sanitario como a nivel de las instalaciones. A estas normas se debe añadir un control microbiológico del medio ambiente para conocer exactamente sus características, pudiéndose aplicar de este modo las medidas necesarias en el caso de aparición de un nuevo foco de contaminación (HOLDER, 1977).

- AGUAS

P. aeruginosa es biológicamente activa en grado extremo. Puede vivir en sustratos simples, sobreviviendo durante largos períodos bajo un amplio rango de condiciones ambientales, menos con una severa deshidratación. Se adapta a la presencia de altas concentraciones de la mayoría de los antibióticos y sustancias antibacterianas. Se aísla fácilmente de aguas superficiales terrestres y aguas marinas (RICHARDS, 1975; HOADLEY, 1977; MARQUES et al., 1978; SIMON-PUJOL et al., 1980).

El agua juega el principal papel en la diseminación de P. aeruginosa en el medio ambiente, transportando microorganismos al hombre, animales y plantas. Se han descrito brotes epidémicos de infecciones por P. aeruginosa de origen hídrico en animales y en el hombre. Especialmente en verano, es frecuente el aislamiento de este microorganismo de piscinas, asociándose su presencia con la aparición de otitis externas (FITZGERALD y DER VARTANIAN, 1969; LEVIN y CABELLI, 1972; BRODSKY y NIXON, 1974; SCHINDLER et al., 1978; SEYFRIED y FRASER, 1980).

A pesar de que el agua es un medio natural para P. aerugi-

nosa, su presencia está relacionada en gran modo con el vertido directo de aguas residuales domésticas y de mataderos, pues tanto el hombre como los animales son portadores gastrointestinales de este microorganismo (RINGE y DRAKE, 1952; KOMINOS et al., 1972<sub>a</sub>; DOGGETT, 1979). Tienen especial interés las aguas residuales de hospitales que son vertidas sin tratamiento, debido a la posible presencia de cepas multirresistentes que pueden ser diseminadas de este modo en el medio ambiente (HOADLEY, 1977).

Al realizar el tipado de cepas de origen hídrico se ha observado una relación con cepas de origen hospitalario, apareciendo a su vez grupos que no presentaban ninguna similitud (HOADLEY, 1977).

Se ha aislado P. aeruginosa de aguas de bebida, relacionando su presencia con contaminación de origen fecal, dudándose en ciertas ocasiones de la efectividad de la cloración del agua (LEVIN y CABELLI, 1972; SEYFRIED y FRASER, 1980).

Actualmente se presentan un número elevado de infecciones de las vías respiratorias altas y cutáneas con origen hídrico, especialmente en zonas recreacionales (DUTKA y

KWAN, 1977). P. aeruginosa tiene un especial interés debido a su presencia en este medio (CARSON et al., 1975). HIGHSMITH y ABSHIRE (1975) y DUTKA y KWAN (1977) apuntan la posibilidad de utilizar este microorganismo como indicador de contaminación fecal, aislándose en diferentes tipos de aguas incluso en ausencia de coliformes.

La elevación rápida del índice demográfico registrado en todo el mundo implica un incremento de las causas de la polución de origen humano de las aguas en general y de las costeras o marinas en particular (DRAPEAU y JANKOVIC, 1977; COLWELL y KAPER, 1978).

En condiciones normales, un conjunto de factores físicos, químicos y biológicos aseguran la autodepuración del medio marino. Estos procesos naturales son distorsionados en el caso de contaminación masiva y la rotura del equilibrio necesita una intervención urgente para evitar la extensión de la polución amenazando a la salud pública (DRAPEAU y JANKOVIC, 1977; COLWELL y KAPER, 1978).

El problema tiene importancia debido a la utilización generalizada del medio marino como área de vertido de las aguas residuales (COLWELL y KAPER, 1978). Como ejemplo

significativo podemos citar Barcelona, que vertía las aguas residuales directamente al mar mediante cuatro colectores situados cerca de las payas utilizadas de forma intensiva de mayo a septiembre. Otras zonas con especial problemática son las costas dedicadas al cultivo de mariscos (DRAPEAU y JANKOVIC, 1977).

Los estudios realizados con bacterias antibiotico resistentes procedentes de mares se van incrementando. En estuarios y regiones costeras el aporte de aguas residuales es una fuente de bacterias portadoras de plásmidos R (COLWELL y SIZEMORE, 1974; MORGAN et al., 1976). Las bacterias multirresistentes potencialmente patógenas, como P. aeruginosa, que tanto se pueden encontrar en el medio ambiente como en el hombre, adquieren gran importancia, debido a la posible transferencia de resistencia a los antibióticos "in situ" entre Pseudomonas y otras bacterias de origen fecal (COLWELL y KAPER, 1978).

Las autoridades responsables de establecer los criterios de calidad de las aguas de bebida, recreacionales y residuales y de controlar su cumplimiento, deben tener en cuenta la gran importancia que tienen estos índices para la salud pública. La calidad microbiológica del agua,

especialmente la presencia de microorganismos patógenos o potencialmente patógenos portadores de multirresistencias, afecta de forma directa a la salud humana (COOKE, 1976<sub>a</sub>; MORRISON, 1978).

Desde el punto de vista epidemiológico, es interesante conocer el nivel de resistencia a los antibióticos de bacterias aisladas de los medios naturales, pudiendo tener un valor significativo como indicador del uso masivo de agentes antimicrobianos en la naturaleza (FONTAINE y HOADLEY, 1976).

Numerosos trabajos han señalado que una cantidad apreciable de microorganismos Gram-negativos aislados de aguas de distintas procedencias son resistentes a uno o más antibióticos. Esta resistencia es en algunos casos transferible a este nivel mediante procesos de recombinación genética (JOLY et al., 1976), existiendo la posibilidad de intercambio entre bacterias entéricas humanas y animales y bacterias del hábitat acuático (SMITH, 1970 y 1971).

Nuestro conocimiento de la ecología de P. aeruginosa en aguas superficiales es limitado, desconociendo las ca-

racterísticas y serotipos de los microorganismos que pueden sobrevivir bien en este medio ambiente, así como la ruta por la cual los microorganismos se pueden diseminar. Se debe profundizar más en estos problemas antes de intentar entender la importancia que tienen las aguas superficiales terrestres en la transmisión de cepas resistentes de P. aeruginosa (HOADLEY, 1977).

#### - SUELOS Y VEGETALES

La frecuencia con que se aísla P. aeruginosa del suelo indica que es un hábitat natural de este microorganismo, pudiendo actuar como reservorio de esta bacteria (GREEN et al., 1974; HOADLEY, 1977).

SCHROTH (1977) aísla porcentajes elevados de P. aeruginosa de suelos agrícolas y de plantas ornamentales; el porcentaje de aislamiento está en función de las condiciones ambientales, especialmente del grado de humedad. Estos resultados contrastan con el escaso número de aislamientos en suelos de granjas y en verduras, pudiéndose realizar la contaminación de los alimentos durante el traslado y conservación de los vegetales (GREEN et al., 1974).

Las plantas pueden actuar como reservorios y como vectores de P. aeruginosa. SHOOTER et al. (1969) y KOMINOS et al (1972<sub>a</sub>) aislaron en alimentos vegetales de origen hospitalario las mismas cepas que en los pacientes. Estos resultados sugieren que P. aeruginosa es un colonizador frecuente en vegetales, pudiendo persistir en ellos sin producir síntomas de colonización y/o infección.

El hecho de que microorganismos como P. aeruginosa puedan tener la capacidad de establecerse en tejidos vegetales y animales no está definitivamente aceptado debido a la gran diferencia en estructura, composición y otras características intrínsecas de las dos formas de vida (SCHROTH et al., 1977).

En diferentes ocasiones las plantas se encuentran colonizadas por P. aeruginosa, aunque pueden representar de alguna forma una localización transitoria para la bacteria. La población bacteriana disminuye cuando la humedad es escasa. Hay una considerable variación en la capacidad de P. aeruginosa de producir putrefacción en los vegetales. Esta variación no está relacionada con el origen de la cepa o con su aeruginocinotipo, existiendo una relación



con especificidad del huésped frente a las cepas. Una cepa virulenta frente a un vegetal generalmente se comporta de igual forma frente a otros. A pesar de estos datos P. aeruginosa no es un patógeno típico de plantas. No es un microorganismo productor de enzimas pécticos relacionados con la putrefacción, observándose su presencia en lesiones asociadas con otros microorganismos productores de estos enzimas (SCHROTH et al., 1977).

Asumiendo que las plantas y los suelos son los reservorios naturales de P. aeruginosa, es lógico obtener una gran diferenciación mediante el tipado de las cepas, obteniéndose una muestra más representativa de la diversidad de tipos, en contraste con los aislamientos en medios más cerrados (SCHROTH et al., 1977). Es frecuente la identificación de tipos comparables a los aislados en clínica (GREEN, 1974).

Los resultados obtenidos por los distintos autores sugieren que microorganismos potencialmente patógenos como P. aeruginosa pueden aislarse y desarrollarse en una gran variedad de medios. Esto resalta la importancia de realizar un estudio comparando las características bioquímicas y la virulencia tanto de las cepas del medio ambiente como

las de origen hospitalario. Estos resultados nos permitirían entender las diferencias y similitudes entre las cepas según su origen, determinando las características que les permiten desarrollarse en condiciones tan diferentes.

#### 2.4. CICLO AMBIENTAL DE P. aeruginosa

La ubicuidad de P. aeruginosa no siempre es reconocida, siendo capaz de desarrollarse en múltiples medios gracias a su habilidad de utilizar diferentes compuestos orgánicos como fuente de energía y sobrevivir durante largos períodos de tiempo en presencia de un cierto grado de humedad. El nicho ecológico de un microorganismo como P. aeruginosa es realmente complejo. Una comprensión clara de su ecología así como de su versatilidad puede implicar el conocimiento de diversas disciplinas, como microbiología, patología vegetal, sanidad, salud ambiental y otras. Es necesario cruzar estas barreras para reunir todos los conocimientos y efectuar de esta forma un control y prevención de la adquisición de P. aeruginosa por pacientes hospitalizados (YOUNG, 1977).

Es difícil precisar el papel que juega el agua como vehí-

culo de P. aeruginosa, permitiendo su llegada a plantas, animales y al hombre, así como hábitat normal de este microorganismo. Diversos autores han aislado este microorganismo de aguas superficiales y costeras (LEVIN y CABELLI, 1972; JOLY et al., 1976; MARQUES et al., 1978; SIMON-PUJOL et al., 1978; SIMON-PUJOL et al., 1980).

Es evidente que en climas cálidos esta bacteria puede proliferar en aguas con alto contenido orgánico, en ausencia de contaminación por aguas residuales humanas o animales, pudiéndose concluir a través de estos resultados que presenta una amplia distribución en este medio. Sin embargo, HOADLEY (1977) destacó que la concentración de P. aeruginosa en aguas de climas fríos estaba relacionada con la presencia de contaminación por aguas residuales. Algunos autores opinan que se debe considerar el uso de P. aeruginosa como índice de contaminación fecal, incluso en ausencia de coliformes fecales, debido al aislamiento de este microorganismo tanto de aguas potables como insuficientemente tratadas (HIGHSMITH y ABSHIRE, 1975) e intentan evaluar el significado que tiene para la salud pública la presencia de P. aeruginosa en aguas potables y recreacionales (LEVIN y CABELLI, 1972; MARQUES et al., 1978).

No se debe olvidar la presencia de P. aeruginosa multirresistentes a los agentes antimicrobianos en aguas terrestres y marinas, especialmente en zonas que reciben la acción directa del hombre. La presencia de bacterias resistentes a las drogas supone un insospechado peligro en este medio. Las implicaciones que pueden tener estas bacterias multirresistentes, su incidencia y origen son cuestiones importantes que deben ser contestadas (COLWELL y SIZE-MORE, 1974; KODITSCHKEK y GUYRE, 1974; MORGAN et al., 1976).

Existe la posibilidad de que el suelo y las plantas sirvan de reservorio natural y permanente de P. aeruginosa (GREEN et al., 1974; SCHROTH et al., 1977; MARQUES et al., 1979). YOUNG (1977) observa un incremento de P. aeruginosa en aguas de arroyos después de las lluvias, lo que concuerda con su presencia en suelos, siendo una posible vía de diseminación en zonas agrícolas y ganaderas.

El lugar que ocupa P. aeruginosa como patógeno de los vegetales tiene además una importancia económica. Bajo ciertas condiciones de temperatura y humedad P. aeruginosa coloniza las plantas sin producir ningún cambio aparente en el huésped. Cuando se alteran estas condiciones se convierte en un patógeno oportunista que es capaz de producir da-

ños irreparables en la cosecha. En este hábitat, el agua puede jugar un papel importante en la diseminación del microorganismo (YOUNG, 1977).

Este microorganismo se puede aislar en el hombre. De un 3 a un 19% de los individuos normales son portadores de P. aeruginosa en su tracto gastrointestinal (YOUNG, 1977; HUGH y GILARDI, 1980). Las formas en que P. aeruginosa se puede introducir en el hombre son muy variadas. Muchos adultos están en contacto con este microorganismo a través de los alimentos que toman, del agua que beben o simplemente al estar en contacto con el medio ambiente que les rodea. Algunos autores como HOADLEY (1977) piensan que esta bacteria está principalmente asociada con el hombre, mientras que otros autores (GREEN et al., 1974; SCHROTH et al., 1977) creen que el suelo y las plantas son los reservorios naturales y permanentes de esta bacteria.

La identificación a niveles inferiores a los de especie mediante serotipado, tipado por aeruginocinas y bacteriófagos, permitió a los investigadores diferenciar este microorganismo en los distintos ambientes que se halla presente. De esta forma SHOOTER et al. (1969), KOMINOS et al.

(1972) y GREEN et al. (1974) fueron capaces de demostrar que tanto las plantas como el hombre pueden ser huéspedes de la misma cepa.

P. aeruginosa puede colonizar al hombre, si las defensas del huésped están alteradas, asumiendo el papel de patógeno oportunista, sobreviviendo la infección. En ocasiones el agente primario de la infección es erradicado mediante el tratamiento con antibióticos, adquiriendo P. aeruginosa como nuevo agente causal de la infección, lo que provoca serios problemas de antibioterapia (AYLIFFE et al., 1965; PASCH, 1974; HUGH y GILARDI, 1980).

Se deben estudiar los factores que influyen en la infección por P. aeruginosa. Conforme se alarga la permanencia en un centro hospitalario la posibilidad de adquirir una infección nosocomial se va incrementando, elevándose también el porcentaje de aislamientos de este microorganismo tras la hospitalización (KOMINOS et al., 1977; YOUNG, 1977). Microorganismos portados asintóticamente

por personal y pacientes pueden ser virulentos para algunos enfermos susceptibles, aunque normalmente no produzcan infecciones en personas sanas (DIXON, 1980).

Debido a que la susceptibilidad del huésped y la virulencia bacteriana son difíciles de modificar, tienen más interés las características de propagación microbiana y las posibles formas de contacto con los agentes causales de la infección en el intento de controlar o preveer las infecciones nosocomiales (DIXON, 1980).

Las infecciones nosocomiales pueden tener dos orígenes, endógeno y exógeno. El mismo individuo puede ser portador del microorganismo de forma asintomática durante un largo período de tiempo y que por algún factor asociado con la hospitalización se inicie la infección. Las infecciones se pueden prevenir si se conoce su origen. Existen principalmente cuatro formas de adquisición de microorganismos a partir de fuentes externas :

- Transmisión por vector (animado); se presenta principalmente en climas tropicales como es el caso de la fiebre amarilla y la malaria (DIXON, 1980).

- Transmisión por contacto; es con mucho el modo más importante de transmisión de infecciones en hospitales. Se puede realizar de forma directa entre personas o indirecta , con dispersión de los agentes infecciosos mediante secreciones. Un paciente o miembro del personal con una enfermedad infecciosa es el propagador más importante de la infección mediante el contacto directo o indirecto; no se deben olvidar los portadores asintomáticos (DIXON, 1980). El lavado de las manos del personal antes y después del contacto con cada enfermo es probablemente la medida más efectiva para prevenir la infección por contacto directo. Otras medidas como el aislamiento de pacientes infecciosos también son importantes (STEERE y MALLISON, 1975).
  
- Vehículos contaminados; es la segunda forma en importancia de diseminación de patógenos nosocomiales. En este grupo se incluye comida, agua, medicamentos y material médico. Esto se puede evitar con un control e higiene adecuado en su procesamiento (NOBLE y SAVIN, 1966; FAVERO et al., 1971; KOMINOS et al., 1972<sub>a</sub>; BAIRD y SHOOTER, 1976; GELBART et al., 1976; WRIGHT et al., 1976; KOMINOS et al., 1977; DEVLEESCHOUWER



et al., 1980; DIXON, 1980).

- La posible transmisión por el aire ha sido causa de diversas discusiones pero parece ser que tiene poca importancia al hablar de microorganismos causantes de infecciones nosocomiales (DIXON, 1980).

Al valorar el problema se debe tener en cuenta la población total de la sociedad moderna y los factores que condicionan la aparición de cepas resistentes (COOKE, 1976<sub>a,b,c</sub>). La responsabilidad de este hecho recae principalmente en el ambiente hospitalario, aunque no hay que olvidar las de otros grupos de profesionales, algunos de los cuales no están directamente relacionados con hospitales. No hay duda de que la resistencia a los metales pesados codificada por plásmidos, que pueden codificar a su vez resistencia a los antibióticos, favorece la presencia de bacterias en ambientes hostiles creados por el hombre. El cambio en el microbiota autóctono, crea un problema adicional por la llegada de unas cepas al ambiente hospitalario que ya han sufrido una preselección, incrementándose los problemas de antibioterapia. Las infecciones nosocomiales son un reto para encontrar la forma de control del medio ambiente en beneficio

del enfermo, vigilando a su vez la metodología actual aplicada en vistas del presente y futuro (ISENBERG y BERKMAN, 1971).

Para conocer los factores que permiten a un microorganismo como P. aeruginosa, que tan sólo coloniza a una pequeña proporción de individuos sanos, pero que en cambio es capaz de crear graves problemas en enfermos y producir en muchos casos la muerte, es necesario estudiar los ciclos de este microorganismo en los diferentes medios en los cuales es capaz de crecer. El conocer y relacionar su ecología en los diferentes nichos puede ser de ayuda para poder valorar la importancia de estas fuentes como posibles reservorios de cepas potencialmente patógenas (YOUNG, 1977).

## 2.5. EVOLUCION Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Transcurridos cien años desde el primer aislamiento de P. aeruginosa, este microorganismo continúa siendo una amenaza para los huéspedes debilitados. En ocasiones sólo crea dificultades, pero con una frecuencia demasiado elevada es una grave amenaza para la vida del paciente. La adaptabilidad y supervivencia de los miembros del género Pseudomonas está bien reconocida. La capacidad de

metabolizar un amplio rango de sustratos orgánicos, desarrollarse con escasos nutrientes, son propiedades que las diferentes generaciones de microbiólogos han ido describiendo. Estas características, sin embargo, forman únicamente una pequeña parte de las propiedades que han concedido a P. aeruginosa una remarcada importancia (GOVAN, 1981).

Este microorganismo, patógeno oportunista tanto para plantas como para animales, tiene una gran versatilidad que viene codificada por su material genético, demostrándolo al adaptarse a diferentes hábitats, incluyendo hospitales, donde la resistencia a los antibióticos es un factor importante en su supervivencia (YOUNG, 1977; JACOBY, 1979).

Otro de los factores que ha influido en su desarrollo en este medio ha sido la tecnología moderna aplicada en este campo, que permite prolongar la vida de los pacientes en condiciones adversas (GOVAN, 1981).

En los últimos veinte años la investigación se ha dirigido hacia el campo de la patogénesis y genética de las Pseudomonas. Como es el caso de otras especies bacterianas, los plásmidos son, con mucho, los elementos genéticos más importantes con potencial evolutivo en las Pseudomonas. Estos elementos extracromosómicos se han detectado en la

mayoría de las cepas de las especies del género Pseudomonas, siendo excepcional la carencia de estos elementos (CLARKE y RICHMOND, 1975; BRODA, 1979).

La evolución de los microorganismos no depende exclusivamente de la variación en la población, sino también de la recombinación. La posibilidad de recombinación de genes en plásmidos, autotransmisibles o no, y los tipos alternativos de intercambio genético, transducción y transformación, pueden incrementar la variación sobre la cual la selección natural puede actuar. A estos factores se adiciona la acción de los transposones. Al ser el rango de posibles huéspedes de ADN bacteriano en la naturaleza muy amplio, se piensa que por lo menos las bacterias Gram-negativas pueden estar relacionadas entre si (BRODA, 1979).

La genética interacciona con la microbiología sanitaria principalmente de dos formas. Por una parte estas técnicas se pueden emplear para resolver problemas creados por enfermedades microbianas. Asimismo, puede proporcionar formas de determinar el origen de variantes bacterianos en la naturaleza que puedan causar efectos patológicos distintos, alterar la respuesta a los agentes antibacterianos o cambios en la inmunidad característica (HOLLOWAY, 1979).

Se conoce que la diversidad molecular de las reacciones catalizadas por Pseudomonas es muy grande, con la impresión de que la localización de genes metabólicos en plásmidos es una ventaja para la célula portadora, pudiendo ser a su vez una ventaja para la población de la cual forman parte las células (CLARKE y RICHMOND, 1975).

Hasta ahora el papel del hombre ha consistido principalmente en favorecer la evolución de las bacterias y sus plásmidos, más que en cambiar su naturaleza. A pesar de que los factores R se han incrementado en número y evolucionado rápidamente, su existencia es anterior al uso de antibióticos y son una amenaza constante para la futura utilidad de un número muy elevado de agentes antimicrobianos en uso (GARROD et al., 1973; BRODA, 1979).

Actualmente, de forma adicional a la evolución bacteriana provocada por los cambios en el medio ambiente, el hombre está manipulando de forma directa el material genético, lo que se denomina ingeniería genética. Principalmente se describen dos objetivos, obtener nuevas combinaciones de ADN procariótico y utilizar huéspedes bacterianos y vectores (plásmidos y bacteriófagos) para el estudio y explotación de ADN eucariótico. La ingeniería genética ofrece

claros beneficios tanto en el campo de la investigación como en el desarrollo de la tecnología industrial, médica o agrícola. De todas formas no se deben olvidar los posibles peligros que puede presentar esta técnica, al desconocer exactamente el alcance de los resultados (BRODA, 1979; HOLLOWAY, 1979).

Las investigaciones futuras podrán estar marcadas por una revisión del papel de las Pseudomonas como patógenos oportunistas; un estudio más detallado de la importancia de la exotoxina A; el desarrollo de una vacuna menos tóxica y más protectora. El futuro papel de la vacuna dependerá de los adelantos realizados en el campo de la terapéutica antibiótica (PENNINGTON, 1979; GOVAN, 1981).

### III PLAN DE TRABAJO

## III PLAN DE TRABAJO

- Toma de muestras
- Aislamiento de las cepas presuntivas de P. aeruginosa
- Identificación
- Determinación de la resistencia a :
  - Antibióticos
  - Metales pesados
  - Resistencia combinada
- Metabolización del cromo por bacterias resistentes
- Tipado
  - Serológico
  - Por producción y sensibilidad a las aeruginocinas
  - Determinación de las relaciones existentes entre los diversos tipos
- Interpretación y discusión de los resultados



#### IV MATERIAL Y METODOS

#### IV MATERIAL Y METODOS

##### 4.1. TOMA DE MUESTRAS

###### - AGUAS SUPERFICIALES TERRESTRES

La prospección de las aguas superficiales terrestres se ha basado en el control microbiológico de 85 puntos de muestreo hasta un total de 400 muestras como queda indicado en la TABLA 11. El muestreo se ha realizado entre Octubre 1976- Junio 1980. La distribución geográfica de los puntos de muestreo se presenta en la FIGURA 5.

En todos los casos el volumen de muestra problema tomada corresponde a 200 ml. La siembra de las muestras se ha verificado en todos los casos en menos de 24 horas desde su toma, conservándose en refrigerador a 4°C antes de su manipulación.

###### - AGUAS MARINAS SUPERFICIALES

Otro objeto de este trabajo es el que está basado en un muestreo de aguas marinas situadas junto al litoral

FIGURA 5 Distribución geográfica de los puntos de muestreo.

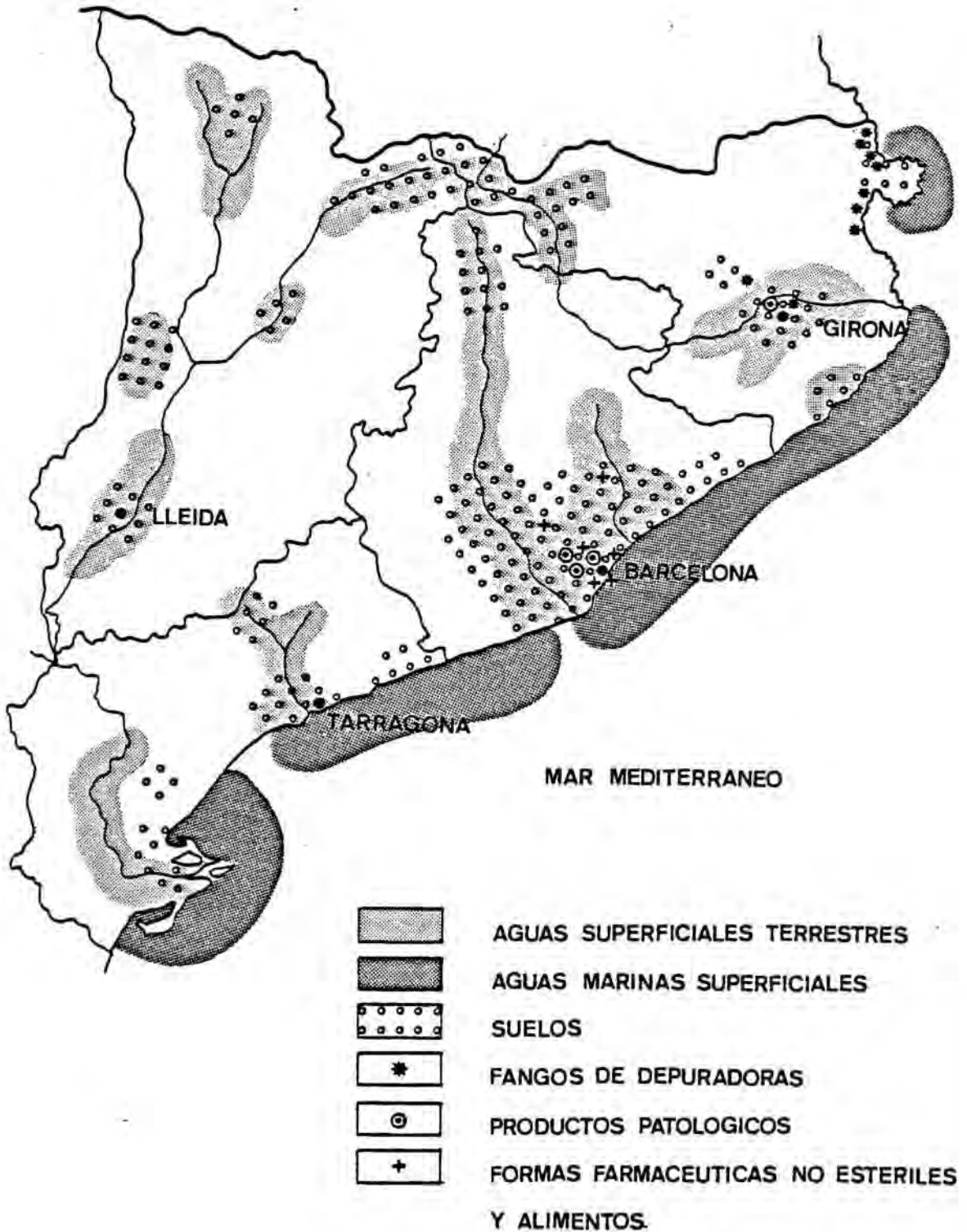


TABLA 11

Muestras de aguas superficiales terrestres analizadas

<u>Localización</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>	<u>Localización</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>
Aiguafreda	3	Empuries	1
Alella	7	Esplugues de Llobregat	7
Alp	3	Esterri d'Aneu	1
Altafulla	3	Figaró	4
Arenys de Mar	1	Francolí	2
Arenys de Munt	1	Gavá	1
Badalona	5	Girona	10
Balaguer	1	Granollers	19
Balsareny	4	L'Ametlla del Vallés	7
Barcelona	12	La Bisbal	1
Bellver de Cerdanya	4	La Garriga	4
Berga	10	La Molina	4
Binéfar	4	La Roca	2
Cabrera	2	Lleida	3
Calella de Mar	1	Llissá de Munt	4
Calonge	2	Lliviá	2
Canet de Mar	4	Lloret	2
Canovelles	3	Malgrat	1
Cardona	2	Manresa	14
Castellar de N'Hug	2	Martorell	17
Castelldefels	1	Molins de Rey	18
Castellet	1	Mollerusa	3
Castellgalí	1	Mollet	16
Cellers	10	Montblanc	7
Cerdanyola	7	Montcada	7
El Masnou	1	Mora d'Ebre	3

TABLA 11 cont.

<u>Localización</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>	<u>Localización</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>
Olesa	12	Sant Miquel del Fai	1
Oliana	1	Sant Pol de Mar	1
Palautordera	1	Sant Sadurní d'Anoia	1
Parets	1	Santa Barbara	2
Platja d'Aro	14	Santa Fe del Montseny	2
Prat del Llobregat	26	Setcases	5
Puigcerdá	6	Tarragona	3
Riells	2	Tibidabo	6
Ripoll	1	Torá	2
Ripollet	5	Tortosa	8
Roses	1	Tremp	5
Rubí	1	Valldoreix	4
Sabadell	4	Valls	2
Sant Feliu de Guixols	2	Vidrá	3
Sant Fruitós de Bages	2	Vilanova i la Geltrú	1
Sant Hilari Sacalm	2	Vilassar de Mar	3
Sant Just Desvern	15	TOTAL	400

a efectos de encontrar una posible relación entre la interacción agua de mar y sedimentos cercanos a la costa. Normalmente la toma de muestras se ha realizado a 10 metros de la orilla y a una altura de la columna de agua de 20-40 cm de la superficie a fin de evitar posibles microorganismos que se encuentren en la capa agua-aire. La totalidad de las muestras tomadas, 162, proceden de aguas del litoral catalán. En la TABLA 12 se detallan los puntos de muestreo.

#### - SUELOS

Las muestras de suelos proceden de zonas rurales, industriales o urbanas de Cataluña. En todos los casos se han tomado 20 g a 10 cm de la superficie de acuerdo con las normas señaladas por CROSE (1968). Se han tomado 350 muestras durante el período Octubre 1976-Junio 1980. Las zonas de muestreo se describen en la TABLA 13.

#### - FANGOS DE DEPURADORAS

Los fangos de depuradoras analizados proceden de diez plantas (TABLA 14). La carga de muestras tomada co-

TABLA 12

Muestras de aguas marinas superficiales analizadas

<u>Localización</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>	<u>Localización</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>
Arenys de Mar	2	Mataró	5
Badalona	7	Montgat	3
Bará	4	Monsolis	3
Barcelona	18	Palamós	5
Blanes	2	Platja d'Aro	8
Cabrera	5	Port de la Selva	2
Cadaqués	8	Premiá de Mar	6
Caldetes	3	Roses	5
Calella de Mar	3	Sant Feliu de Guixols	4
Canet	2	Sant Pol de Mar	1
Castelldefels	7	Sant Salvador	5
Cunit	5	Tarragona	5
Delta del Ebre	5	Torredembarra	5
El Masnou	6	Vilanova i la Geltrú	10
Llavaneres	5	Vilassar de Mar	13
TOTAL	162		

TABLA 13  
Muestras de suelos analizadas

<u>Localización</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>	<u>Localización</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>
Alella	7	Mora d'Ebre	12
Alp	3	Olot	2
Arenys de Mar	3	Platja d'Aro	23
Badalona	12	Premiá	7
Barcelona	84	Puigcerdá	3
Begues	2	Riells	1
Berga	3	Roses	10
Besalú	1	Rupit	3
Binéfar	3	Sant Just Desvern	6
Castelldefels	10	Sant Feliu de Guixols	4
Cellers	4	Santa Barbara	22
El Masnou	2	Sau	1
Esplugues de Llobregat	11	Setcases	13
Guils de Cerdanya	2	Sort	3
L'Ametlla del Vallés	2	Tamariu	8
La Garriga	1	Tarragona	10
La Molina	6	Tárrega	3
Llançá	4	Tibidabo	12
Llinars del Vallés	2	Tortosa	16
Manlleu	3	Vallvidrera	3
Meranges	2	Viella	3
Montcada	12	Vilassar de Mar	6
TOTAL	350		



TABLA 14

Muestras de fangos de depuradoras analizadas

<u>Localización</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>
Begur	9
Blanes	6
Colera	8
Girona	8
L'Estartit	8
Llançà	6
Olot	8
Port-Bou	9
Port de la Selva	7
Roses	8
TOTAL	77

responde a 20 g de peso húmedo del fango recogido en recipientes estériles.

#### - PRODUCTOS PATOLOGICOS HUMANOS Y ANIMALES

Las cepas estudiadas, procedentes de productos patológicos humanos, fueron cedidas por cinco centros hospitalarios y de análisis de Cataluña (TABLA 15). Los microorganismos se aislaron de orinas, esputos, pus y quemaduras. Las muestras de origen patológico animal procedían principalmente de otitis e infecciones urinarias de animales de ámbito doméstico.

#### - FORMAS FARMACEUTICAS NO ESTERILES Y ALIMENTOS

Se ha verificado un control que alcanza a 530 análisis de formas farmacéuticas no estériles de administración por vía oral y de uso tópico, procedentes de las salas de los hospitales o de la farmacia hospitalaria (TABLA 16).

Respecto a las muestras alimentarias debemos señalar que se ha realizado una prospección de 38 alimentos

TABLA 15

Muestras de productos patológicos analizados

<u>Localización</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>
Centro 1	5
Centro 2	73
Centro 3	5
Centro 4	3
Centro 5	11
Origen animal	6
TOTAL	103

TABLA 16

Muestras de formas farmacéuticas no estériles y alimentos analizadas.

<u>Localización</u>	<u>F. F. no estériles</u>	<u>alimentos</u>
	<u>Nºmuestras analizadas</u>	<u>Nºmuestras analizadas</u>
Hospital A	28	0
Hospital B	374	22
Hospital C	10	0
Hospital D	23	8
Hospital E	32	0
Hospital F	49	8
Hospital G	14	0
TOTAL	530	38

procedentes de centros hospitalarios de Barcelona y provincia (TABLA 16). La cantidad de muestra alimentaria tomada en todos los casos ha correspondido a una unidad.

#### 4.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

##### - AGUAS SUPERFICIALES TERRESTRES

A partir de la muestra problema se han filtrado 50 ml a través de una membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore), que posteriormente se deposita en el medio adecuado.

##### - AGUAS MARINAS SUPERFICIALES

Se tomaron 50 ml de agua de mar, una vez homogenizada la muestra. Se filtró por membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore), recogiendo el filtro y desechando el filtrado.

##### - SUELOS Y FANGOS DE DEPURADORAS

Para el procesado de las muestras de suelos y fangos de

depuradoras, se tomaron 10 g y se depositaron en frascos Sovirel con 200 ml de solución de pirofosfato sódico al 0,1% estéril. Se agitó fuertemente para facilitar la disgregación total de las partículas (POCHON y TARDIEUX, 1962).

#### 4.3. METODOS DE ENRIQUECIMIENTO

##### - AGUAS SUPERFICIALES TERRESTRES Y MARINAS

A efectos de asegurar el aislamiento de muestras que contengan una carga escasa de P. aeruginosa, se ha considerado conveniente sembrar el filtro que ha recibido la muestra en un medio de enriquecimiento universal como TRIPTIC SOY BROTH -TSB- (Difco) (HEDBERG, 1969; HART et al., 1976; COLWELL y KAPER, 1978). Una vez inoculados los tubos se incubaron a 42°C durante 24-48 horas. Posteriormente, alícuotas de este cultivo se trasladaron hasta un medio selectivo para P. aeruginosa.

La composición del medio de enriquecimiento es la siguiente:

Bacto-Tryptone	17	g
Bacto-Soytone	3	g

Bacto-Dextrose	2,5 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato bipotásico	2,5 g
Agua destilada	1000 ml

El medio se esterilizó a 120°C durante 15 minutos.

#### - SUELOS Y FANGOS DE DEPURADORAS

Una vez homogenizadas las muestras en pirofosfato sódico al 0,1% se tomó 1 ml de la suspensión del suelo o del fango depositándose en el medio de enriquecimiento -TBS-.

Los tubos se llevaron a incubar a 42°C durante 24-48 horas.

#### - FORMAS FARMACEUTICAS NO ESTERILES Y ALIMENTOS

Los medicamentos y alimentos se estudiaron añadiendo a 1 ml o 1 g, 20 ml de -TSB- (Difco) adecuadamente concentrado (BAIRD et al., 1976<sub>a</sub>).

El vial se llevó a incubar a 42°C durante 24-48 horas.

## 4.4. METODOS DE AISLAMIENTO

La siembra se realizó en un medio selectivo, recomendado para el desarrollo y diferenciación de P. aeruginosa. El medio de cultivo utilizado, agar Cetrimide (MERCK), favorece la producción y difusión de los pigmentos característicos de P. aeruginosa, piocianina y fluoresceína.

La composición del medio de cultivo se detalla a continuación :

Peptona de gelatina	20 g
Cloruro magnésico	1,4 g
Sulfato potásico	10 g
Bromuro de N-cetil-N,N,N,-trimetil amonio	0,5 g
Agar-agar	13,6 g
Agua destilada	1000 ml

45,5 g del producto se suspendieron en 1000 ml de agua destilada, dejándose en reposo durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron 10 ml de glicerina. El medio se esterilizó a 120°C durante 15 minutos.



Se agitaron los tubos con crecimiento positivo en TSB, para lograr una mejor homogenización, tomando con una pipeta estéril 1 ml de la suspensión, sembrando en la superficie de la placa de agar Cetrimide con asa de Digrafsky. Se llevaron a incubar las placas a 42°C durante 24-48 horas. Se ha considerado oportuno proceder a la siembra de muestras de 1 ml sobre las placas a efectos de compensar la deshidratación por una incubación a 42°C durante 48 horas.

Una vez observado el crecimiento de colonias presuntamente pertenecientes a P. aeruginosa se ha verificado su identificación.

#### 4.5. METODOS DE IDENTIFICACION

Para la identificación de las cepas se siguieron los criterios expuestos por COWAN (1974), DOUDOROFF y PALLERONI (1974) y HUGH y GILARDI (1974).

En todas las pruebas de aislamiento e identificación se usaron los correspondientes controles positivos empleándose la cepa P. aeruginosa ATCC 27853.

- TINCION DE GRAM

El procedimiento empleado fue el clásico, preparándose los reactivos y realizándose según la técnica descrita por HARRIGAN y McCANCE (1979).

- OXIDASA

La prueba de la oxidasa se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Kovacs (1956) y Steel (1961) tal como describieron HARRIGAN y McCANCE en 1979.

La composición del reactivo empleado es la siguiente:

Clorhidrato de tetrametil-P-	
fenilen-diamina	1 g
Agua destilada	100 ml

Se adicionó una gota del reactivo preparado en un trozo de papel de filtro, depositándose posteriormente una colonia con el asa de platino. En los microorganismos oxidasa positivos, apareció a los 5-10 segundos una coloración púrpura. Una reacción positiva retardada se manifestó a los 10-60 segundos, por la aparición del mismo

color y debe tomarse como negativa cualquier otra reacción posterior.

#### - CATALASA

La prueba de la catalasa se ha realizado según la técnica descrita por HARRIGAN y McCANCE (1979).

Se vertió 1 ml de agua oxigenada (diez volúmenes) en la superficie de un cultivo de agar. La presencia de catalasa se manifestó mediante una efervescencia, producida por la liberación de oxígeno libre en forma de burbujas.

#### - OXIDACION O FERMENTACION DE LA GLUCOSA

Para el estudio del metabolismo oxidativo o fermentativo de los microorganismos se empleó el medio descrito por HUGH y LEIFSON (1953).

La composición del medio de cultivo (MERCK) es la siguiente :

Peptona de caseína

2 g

Extracto de levadura	1	g
Cloruro sódico	5	g
Fosfato dipotásico	0,3	g
Azul de bromotimol	0,08	g
Agar-agar	2,5	g
Agua destilada	1000	ml

Se suspendieron 11 g del producto en 1000ml de agua destilada, esterilizándose a 120°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar hasta 50°C y se añadieron 100ml de solución acuosa de D(+) glucosa al 10% esterilizada por filtración. A continuación se distribuyó el medio en tubos de ensayo estériles, cubriendo la mitad de los tubos inmediatamente después de su enfriamiento con una capa de 1 cm de altura de aceite de parafina estéril.

Cada cepa se sembró por picadura en dos tubos, uno tapado con parafina y otro no. Se llevaron a incubar a 37°C durante 2-7 días.

La lectura se realizó observando el viraje de color de verde a amarillo. Si el viraje se había producido en el tubo abierto, se interpretó como degradación oxidativa del carbohidrato añadido, pero si el cambio de color se produjo

tanto en el tubo abierto como en el protegido por la capa de parafina significó que la degradación era fermentativa.

Se puede observar a su vez si ha habido producción de gas por el agrietamiento del agar o por la acumulación de burbujas de gas bajo la capa de parafina.

Finalmente hubo que comprobar si el crecimiento del microorganismo ensayado se produjo solamente a lo largo del canal de punción o si difundió homogéneamente a la totalidad del medio de cultivo. En el primer caso, se consideró la cepa como inmóvil, en el último como móvil.

#### - HIDROLISIS DE LA GELATINA

Para la realización de su estudio utilizamos una modificación de la técnica de Lajudie y Chalvignac (1956) descrita por POCHON y TARDIEUX (1962).

El medio empleado está formado por :

Peptona	10	g
Extracto de carne	3	g
Cloruro sódico	5	g

Gelatina	30 g
Agua destilada	1000 ml

Se preparó el caldo nutritivo, al cual se le adicionó la gelatina, calentando hasta lograr su fusión total, ajustando posteriormente el pH a 7,2-7,4. Una vez esterilizados los tubos, se sembraron y se incubaron a 37°C durante una semana.

La lectura se realizó manteniendo los tubos en la nevera durante 30 minutos, siendo positiva la prueba cuando el cultivo permaneció líquido.

#### - REDUCCION DE NITRATOS

Para efectuar esta prueba se empleó el medio descrito por COWAN (1974). La composición del medio de cultivo es la siguiente :

Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Nitrato potásico	0,2 g
Agua destilada	1000 ml

Se preparó el agua de peptona a la que se añadió posteriormente el nitrato potásico hasta lograr su total disolución, ajustando el pH a 7,2-7,5.

El medio se distribuyó en tubos, esterilizándose en el autoclave a 120°C durante 20 minutos. Los tubos inoculados se incubaron a 37°C durante 2-7 días.

Para realizar la lectura se preparó :

- 8 g de ácido sulfanílico en 1000ml de ácido acético 5N
- 5 g  $\alpha$ -naftilamina en 1000ml de ácido acético 5N.

Se añadió 1 ml de cada uno de los dos reactivos en todos los tubos preparados para la lectura. La presencia de nitritos se manifestó por la aparición de un color rojo en el plazo de unos minutos. El resultado negativo debió confirmarse añadiendo al tubo una pequeña cantidad de polvos de cinc. El desarrollo del color rojo indicó la presencia de nitrato y por ello que no había tenido lugar la reducción.

Si tampoco apareció coloración, significó que la reducción

había sido total, pasando el nitrato potásico a nitrógeno gas, eliminándose del medio.

#### - HIDROLISIS DE LA ARGININA

El medio utilizado es el descrito por COWAN (1974) siguiendo la técnica de Thornley (1960). Su composición es la siguiente :

Peptona	1	g
Cloruro sódico	5	g
Fosfato dipotásico	0,3	g
Agar	3	g
Rojo fenol	0,01	g
Monoclorhidrato de arginina	10	g
Agua destilada	1000	ml

Se mezclaron los productos y se ajustó al pH final de 7,2 esterilizándose a 121°C durante 15 minutos. La siembra se realizó por picadura, depositando seguidamente sobre el agar aceite de parafina estéril. Se incubó a 37°C durante 3-7 días.

La presencia del enzima se puso de manifiesto por un cam-



bio de color del medio de cultivo a color rojo.

- DESCARBOXILACION DE LA LISINA Y FORMACION DE SULFURO DE HIDROGENO

Para su estudio se empleó el medio de cultivo modificado por COSTIN (1968). La composición del medio (MERCK) es la siguiente :

Peptona especial	4,5	g
Peptona de harina de soja	2	g
Extracto de levadura	3	g
D(+)-glucosa	1	g
Cloruro sódico	5	g
Tiosulfato sódico	5	g
L(+)-monoclorhidrato de lisina	10	g
Sulfato de amonio y hierro II	0,2	g
Púrpura de bromocresol	0,032	g
Agar-agar	6	g
Agua destilada	1000	ml

pH final 5,6

32 g del producto se suspendieron en 1000ml de agua destilada, hirviéndose hasta solución total. Posteriormente

se distribuyó en tubos y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Una vez frío, el medio de cultivo se cubrió con una capa de parafina líquida estéril.

La siembra se efectuó por picadura a través de la capa de parafina, hasta el fondo del tubo, incubándose a 37°C durante 20-24 horas.

La lectura se realizó por la observación de cambio de color del medio de cultivo de amarillo a violeta. Si a su vez se produjo reducción del tiosulfato a sulfuro de hidrógeno se observó un ennegrecimiento del medio de cultivo, ya violeta, por precipitación del sulfuro de hidrógeno.

#### - HIDROLISIS DE LA SACAROSA

Se utilizó la técnica descrita por HARRIGAN y McCANCE (1979). La composición del medio de cultivo es la siguiente :

Triptona	10	g
Cloruro sódico	5	g

·Púrpura de bromocresol, solución	
en etanol al 10%	2,5 g
Agua destilada	1000 ml

Se mezclaron todos los productos, ajustándose el pH final a 7,2. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 21 minutos.

Se preparó una solución de 100 ml de sacarosa al 10% esterilizándose por filtración, añadiéndose posteriormente al medio de cultivo. Los tubos, una vez inoculados, se incubaron a 37°C durante 24-48 horas. La lectura se realizó por viraje de color del medio de púrpura a amarillo en el caso de que la prueba fuese positiva.

#### - MOVILIDAD

Para su observación se recurrió al método de los tubos concéntricos de Craigie (FOZ et al., 1962). La composición del medio de cultivo empleado es la siguiente :

Bacto-peptona	10,0 g
Gelatina	80,0 g

Extracto de carne	3	g
Agar-agar	3	g
Cloruro sódico	5	g
Agua destilada	1000	ml

Se disolvieron todos los componentes calentando a ebullición, ajustándose posteriormente a pH=7. A continuación se añadió una clara de huevo a punto de nieve con 50 ml de suero fisiológico, manteniéndose a ebullición unos minutos, filtrándose posteriormente. Se distribuyó el medio en tubos que contenían en su interior un tubito pequeño de vidrio de 4 cm de longitud y 5-6 mm de diámetro, abierto por los dos extremos, esterilizándose 15 minutos a 110°C.

A partir de un cultivo en agar de 24 horas o menos, se sembró ligeramente dentro del tubito interior, penetrando menos de 1 cm en la masa del medio. Los tubos se incubaron a 37°C, prolongando su observación hasta 10 días. Si el microorganismo es móvil, en un plazo más o menos largo avanza en el interior del tubito central y pasa a la masa externa del agar para alcanzar finalmente la superficie, en donde prolifera abundantemente.

#### 4.6. CONSERVACION DE LAS CEPAS

La conservación de los microorganismos se realizó según la técnica descrita por BROKOPP et al.(1977) que utilizan TSB/100 (0,3 g de TSB en 1000ml de agua destilada). Las cepas se mantuvieron a 4°C, realizándose siembras periódicas cada seis meses.

#### 4.7. ANTIBIOGRAMA

De acuerdo con la técnica de KIRBY y BAUER (BAUER et al., 1966), recomendada a su vez por la OMS (1977), el medio empleado para la realización de los correspondientes antibiogramas fue agar Mueller-Hinton (Difco), cuyos componentes son los siguientes :

Infusión de carne	300	g
Acidos de casamino	17,5	g
Almidón	1,5	g
Agar	17	g
Agua destilada	1000	ml

El pH final del medio es 7,4. El medio de cultivo se esterilizó a 120°C durante 15 minutos.

Para preparar el inóculo partimos de un cultivo de 18-20 horas y lo diluimos en solución salina estéril hasta alcanzar una turbidez visualmente comparable al tubo patrón preparado añadiendo 0,5 ml de 0,048M BaCl<sub>2</sub> a 99,5ml de 0,36N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (corresponde a la mitad de la densidad del número 1 de la escala de MacFARLAND). El tubo de turbidez patrón se agitó inmediatamente antes de su uso (BARRY y THORNSBERRY, 1980).

La siembra se realizó por la técnica de inundación (OMS, 1977; DRUGEON y COURTIEU, 1978; ARVIDSON et al., 1981). Se añadió 1 ml de inóculo, repartiéndolo por toda la superficie de la placa. El líquido sobrante se retiró con la pipeta, dejando secar la placa 15 minutos a temperatura ambiente. Se colocaron los discos de los antibióticos comprobando que quedasen bien adheridos a la superficie del agar. Se mantuvieron las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la predifusión de los antibióticos. Las placas se incubaron a 35-37°C durante 16-18 horas.

Para controlar la precisión del método se utilizaron las cepas patrón E. coli (ATCC 25922), S. aureus (ATCC 25293) y P. aeruginosa (ATCC 27853) recomendadas por la OMS(1977)

y BARRY y THORNSBERRY(1980). Los discos empleados en nuestra experiencia son los recomendados por BAILED y SCOTT (1970), BARRY et al. (1976), BROKOPP y FARMER (1979) y SHERRIS y WASHINGTON II (1980). Se indican en la TABLA 17.

La interpretación de las medidas de los halos de inhibición se ha realizado según las normas de la OMS (1977), de acuerdo con los datos recomendados por la FDA (Food and Drug Administration) y la N.C.C.L.S. (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (BARRY y THORNSBERRY,1980), así como con los valores suministrados por las casas comerciales (TABLA 18).

Existe una correlación aproximada entre el diámetro de los halos de inhibición y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (OMS, 1977). Una sensibilidad se tiene que comprobar con la determinación de la CMI; sin embargo, la observación de una resistencia siempre es significativa (MATSEN y BARRY, 1974).

#### 4.8. METALOGRAMA

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria -CMI- WASHINGTON y SUTTER (1980) recomiendan la

TABLA 17

Relación de los discos de antibióticos empleados para la realización de los antibiogramas.

<u>Agente</u>	<u>Código</u>	<u>Potencia del disco</u>
<u>Antimicrobiano</u>		
Ampicilina (1) <sup>‡</sup>	AM	10 µg
Carbenicilina (1)	CB	100 µg
Cefalotina (1)	CF	30 µg
Cloranfenicol (1)	C	30 µg
Colistina (1)	CL	10 µg
Estreptomina (1)	S	10 µg
Fosfomicina (2)	FO	50 µg
Nitrofurantoina (1)	FM	300 µg
Gentamicina (1)	GM	10 µg
Kanamicina (1)	K	30 µg
Ac. nalidixico (1)	NA	30 µg
Neomicina (2)	N	30 µg
Sulfadiazina (2)	SD	300 µg
Tetraciclina (1)	TE	30 µg
Tobramicina (1)	NN	10 µg

<sup>‡</sup> (1) : BBL

(2) : Difco



TABLA 18

Interpretación del antibiograma según el diámetro del halo de inhibición.

	<u>Resistente</u> <sup>‡</sup>	<u>Intermedio</u> <sup>‡</sup>	<u>Sensible</u> <sup>‡</sup>
Ampicilina	≤ 11	12-13	≥ 14
Carbenicilina	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefalotina	≤ 14	15-17	≥ 18
Cloranfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18
Colistina	≤ 8	9-10	≥ 11
Estreptomina	≤ 11	12-14	≥ 15
Fosfomicina	≤ 11	12-14	≥ 15
Nitrofurantoina	≤ 14	15-16	≥ 17
Gentamicina	≤ 12	-	≥ 13
Kanamicina	≤ 13	14-17	≥ 18
Ac. nalidixico	≤ 13	14-18	≥ 19
Neomicina	≤ 12	13-16	≥ 17
Sulfadiazina	≤ 12	13-16	≥ 17
Tetraciclina	≤ 14	15-18	≥ 19
Tobramicina	≤ 12	13-14	≥ 15

<sup>‡</sup> Datos expresados en mm.

utilización de agar Mueller Hinton en el caso de bacterias de crecimiento rápido como P. aeruginosa.

Las sales de los metales pesados empleados, así como los criterios de sensibilidad y resistencia se encuentran en la TABLA 19.

Las sales de los metales pesados se disolvieron en agua destilada, esterilizándose por filtración a través de membrana (millipore, tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ), añadiéndose posteriormente al medio de cultivo.

Las concentraciones de las sales de metales pesados empleados se indican en la TABLA 20.

El inóculo se preparó de igual forma que la descrita para los antibiogramas. Esta concentración equivale aproximadamente a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por ml -UFC/ml-, en el caso de P. aeruginosa. Posteriormente se preparó una dilución 1:20 en suero fisiológico, realizándose la inoculación del medio como máximo después de 30 minutos.

La inoculación de las placas se realizó depositando 1-2  $\mu\text{l}$

TABLA 19

Interpretación de la resistencia y sensibilidad a las sales de metales pesados según su Concentración Mínima Inhibitoria -CMI-.

<u>Sales de metales pesados</u>	<u>Sensible</u> <sup>‡</sup> (CMI)	<u>Resistente</u> <sup>‡</sup> (CMI)
AgNO <sub>3</sub>	< 128	≥ 128
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	< 12800	≥ 12800
CdCl <sub>2</sub>	< 1600	≥ 1600
HgCl <sub>2</sub>	< 10	≥ 10
Pb(CH <sub>3</sub> -COO) <sub>2</sub>	< 3200	≥ 3200
UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	< 1600	≥ 1600
K <sub>2</sub> TeO <sub>3</sub>	< 64	≥ 64
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	< 102400	≥ 102400
Tl(CH <sub>3</sub> -COO)	< 128	≥ 128
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	< 1600	≥ 1600
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	< 102400	≥ 102400
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	< 1600	≥ 1600

<sup>‡</sup>Concentraciones expresadas en µg/ml

(JOLY et al., 1976; AUSTIN et al., 1977; NAKAHARA et al., 1977; WILSON y DEAN, 1977; SUMMERS y JACOBY, 1977; MARQUES et al., 1979).

TABLA 20 Diluciones de los metales pesados empleadas en la realización de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias

		<u>Concentraciones expresadas en <math>\mu\text{g/ml}</math></u>										
		2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2
HgCl <sub>2</sub>				x	x	x	x	x	x	x	x	x
AgNO <sub>3</sub>						x	x	x	x	x		
Pb(CH <sub>3</sub> -COO)		x	x	x	x	x	x	x				
K <sub>2</sub> TeO <sub>3</sub>		x	x	x	x	x	x	x	x	x		

---

		<u>Concentraciones expresadas en <math>\mu\text{g/ml}</math></u>									
		102400	51200	25600	12800	6400	3200	1600	800	400	200
Pb(CH <sub>3</sub> -COO) <sub>2</sub>		x	x	x	x	x	x	x			
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O				x	x	x	x	x	x	x	x
CdCl <sub>2</sub>						x	x	x	x	x	x
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>					x	x	x	x			
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		x	x	x	x	x	x				
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		x									
UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O						x	x	x	x		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O						x	x	x	x	x	x

en una superficie de 5-8 mm de diámetro, lo que corresponde a  $10^4$  CFU. Se sembraron las placas control en último lugar para asegurar la presencia de microorganismos viables a través de todo el procedimiento.

Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la adsorción del inóculo, llevándose posteriormente a incubar a  $35^{\circ}\text{C}$ , 16-20 horas.

La Concentración Mínima Inhibitoria representa la concentración más baja en la cual se observa una inhibición completa del crecimiento. Se desecha la aparición de colonias aisladas o crecimiento muy leve (HOOGKAMP-KORSTANJE y WESTERDAAL, 1979; WASHINGTON y SUTTER, 1980).

#### 4.9. TIPADO

##### 4.9.1. SEROTIPADO

El tipado serológico de las cepas de P. aeruginosa se realizó según la técnica descrita por BROKOPP et al. (1977).

Se utilizaron 17 antisueros Bacto-Pseudomonas aeruginosa-antisera (Difco) recomendados para la aglutinación en por-

ta. Dichos antisueros son los obtenidos a partir de las cepas de distintos autores, tal como se muestra en la TABLA 21. Estos grupos O se propusieron como patrones para el serotipado de P. aeruginosa por el Subcomité de Pseudomonadaceae y organismos relacionados con el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología. (BROKOPP y FARMER III, 1979).

#### - PREPARACION DE LOS SUEROS

Se rehidrataron los 17 sueros con 1 ml de agua destilada por vial, agitando fuertemente hasta conseguir la disolución total del contenido. La solución resultante contiene 1:10000 de Mertiolato<sup>®</sup> como conservador.

Posteriormente se realizó una dilución 1:10 de los antisueros rehidratados, utilizando una parte del antisuero rehidratado y 9 partes de una solución de cloruro sódico al 0,85% conteniendo 1:10000 de Mertiolato<sup>®</sup>. Esta dilución del antisuero conservada a 2-8°C es estable durante 4-5 meses (BROKOPP y FARMER, 1979).

TABLA 21

Descripción de los 17 grupos O de antígenos usados como patrón (BROKOPP y FARMER III, 1979).

<u>Antígeno O</u>	<u>Origen de la cepa</u>
1	HABS 0:1
2	HABS 0:2
3	HABS 0:3
4	HABS 0:4
5	HABS 0:5
6	HABS 0:6
7	HABS 0:7
8	HABS 0:8
9	HABS 0:9
10	HABS 0:10
11	HABS 0:11
12	HABS 0:12
13	SANDVIK 0:II
14	VERDER y EVANS 0:5
15	LANYI 0:12
16	HOMMA 0:13
17	MEITERT 0:X

## - PREPARACION DE LOS ANTIGENOS VIVOS

Se realiza una siembra de las cepas problema en placas con Trypticase Soy Agar-TSA- (BBL) cuya composición es la siguiente :

Peptona de caseína	15	g
Peptona de harina de soja	5	g
Cloruro sódico	5	g
Agar	15	g
Agua destilada	1000	ml
pH final 7,3		

Se suspendieron 40g del medio deshidratado en 1000ml de agua destilada, mezclándose hasta obtener una suspensión. Se calentó, agitando hasta ebullición durante un minuto. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, emplacándose posteriormente. Una vez sembradas las placas se llevaron a incubar a 37°C durante 24 horas. El crecimiento obtenido después de la incubación se utilizó como antígeno vivo.

## - AGLUTINACION EN PORTA

Según la técnica descrita por BROKOPP et al. (1977) se



colocó sobre una placa de Petri de plástico una gota de cada antisuero y una gota de suero de conejo como control. Con el asa de platino se suspendió parte de una colonia aislada en la resiembra de la cepa problema en cada gota de los antisueros y del control. Se agitó la placa entera durante un minuto sin que se uniesen los diferentes antisueros, observándose a continuación la aglutinación.

Con el suero de conejo se detectaron las cepas de P. aeruginosa que son autoaglutinables. Estas cepas pueden reaccionar con todos o con casi todos los antisueros. Las cepas rugosas no son tipables.

#### 4.9.2. AERUGINOCINOTIPADO

##### - TIPADO POR PRODUCCION DE AERUGINOCINAS

Para la realización del tipado de las cepas de P. aeruginosa por producción se empleó el método descrito por FARMER y HERMAN (1969) simplificado por JONES et al. (1974). Esta técnica se basa en la característica que tienen casi todas las cepas de P. aeruginosa de usar nitrato como aceptor final de electrones (JONES et al., 1973).

Para la producción de aeruginocinas se utilizó el medio 81 cuya composición es la siguiente :

TSB sin glucosa (BBL) :

Peptona de caseína	17	g
Peptona de harina de soja	3	g
Cloruro sódico	5	g
Fosfato dipotásico	2,5	g

Se suspendieron 27,5 g de TSB sin glucosa y 10 g de nitrato potásico en 1000 ml de agua destilada, mezclándose bien hasta la disolución completa. Los tubos con 10 ml del medio se esterilizaron a 121°C (JONES et al., 1973).

Para la obtención de aeruginocinas las cepas problema se sembraron en 10 ml del medio 81, tomándose una gota del medio de conservación (TSB/100). Las cepas se incubaron a 32°C durante 18 horas. Posteriormente se añadió 1 ml de cloroformo a cada tubo, agitándose la mezcla vigorosamente durante 10 segundos, dejando reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los tubos se volvieron a agitar y se dejaron reposar 20 minu-

tos. Se tomaron 2 ml del sobrenadante de cada tubo problema y se colocaron en tubos estériles, que se dejaron abiertos a temperatura ambiente durante una hora, produciéndose la evaporación del cloroformo residual.

Los lisados de aeruginocinas así obtenidos se aplicaron sobre las placas sembradas con las cepas indicadoras mediante un dispositivo diseñado por FARMER (FIGURA 6). En todos los casos se adicionó un tubo control con medio 81 sin inocular, que recibió todos los pasos de la técnica, realizándose igualmente su inoculación en la placa.

Se utilizaron 18 cepas indicadoras de FARMER denominadas ALA (Alabama). Las cepas se sembraron por inundación en placas de petri preparadas con Trypticase Soy Agar (BBL). El exceso de inóculo se retiró con una pipeta, dejándose secar las placas a temperatura ambiente durante una hora. En todos los casos se utilizó una placa control sin inocular, a la cual se le añadieron los extractos de aeruginocinas. A continuación se colocó una gota de cada lisado de aeruginocinas de las cepas problema. Se dejaron las placas a temperatura ambiente hasta la adsorción de las

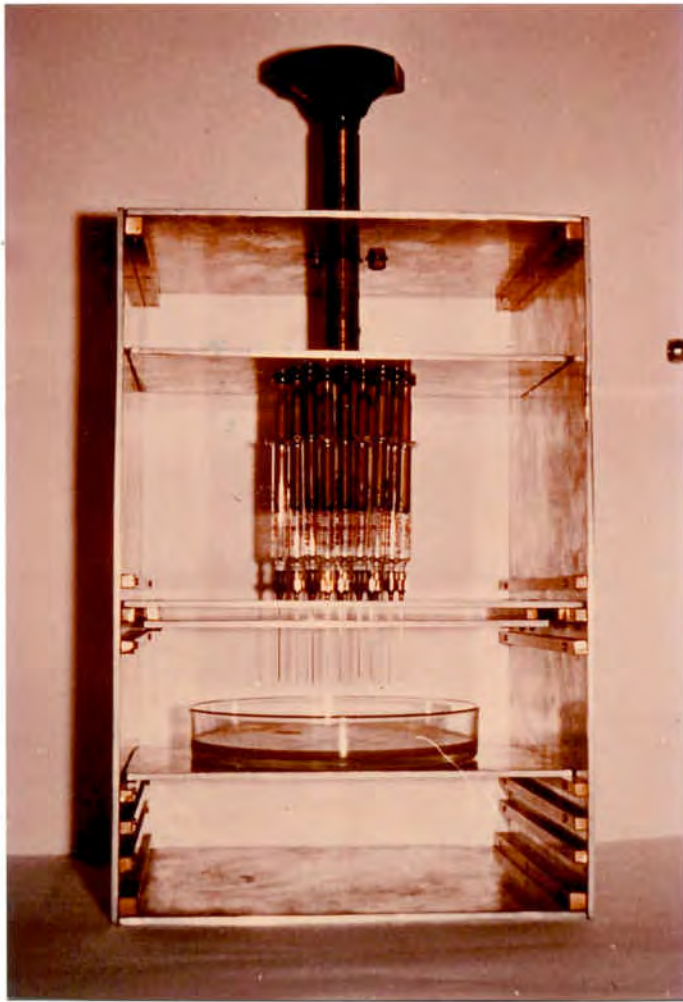


FIGURA 6 Dispositivo diseñado por FARMER para la aplicación de los lisados de aeruginocinas sobre las placas sembradas con P. aeruginosa.

aeruginocinas y se llevaron las placas a incubar a 37°C durante 24 horas.

En la realización de la lectura (FIGURA 7), cualquier inhibición mayor que el control se definió como positiva. Se anotaron también las características de las zonas de inhibición. Para cada cepa se interpretó la respuesta de las 18 cepas indicadoras, transformándose las reacciones en un número de seis cifras, cada una de las cuales representa la reacción de tres cepas indicadoras según el método mnemónico de JONES et al. (1974), que se encuentra descrito en la TABLA 22.

Además, en la lectura de los resultados se utilizó una serie de símbolos, que representaron las distintas clases de zonas de inhibición y que contribuyeron a que este método fuese una verdadera huella dactilar (FINGERPRINTING) para las cepas (TABLA 23).

#### - TIPADO POR SENSIBILIDAD A LAS AERUGINOCINAS

Se efectuó según la técnica descrita por GOMEZ LUS y RUBIO CALVO (1977).

Se sembraron las 18 cepas indicadoras ALA en el medio 81



FIGURA 7 Placa de tipado por producción de aeruginocinas de 29 cepas problema sobre una cepa ALA.

TABLA 22

Método para interpretar los patrones de inhibición según JONES et al. (1974) y GOMEZ LUS y RUBIO CALVO (1977).

<u>Reacciones de las 18 cepas</u> <u>indicadoras en grupos de tres</u>	<u>Representación</u>
+ + +	1
+ + -	2
+ - +	3
- + +	4
+ - -	5
- + -	6
- - +	7
- - -	8

TABLA 23

Símbolos utilizados en la representación de las zonas de inhibición según JONES et al. (1974) y GOMEZ LUS y RUBIO CALVO (1977).

<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>
+	Inhibición completa debida a aeruginocinas
+ <sub>50</sub>	Inhibición con 50 colonias en su interior
+ <sub>d</sub>	Inhibición en una zona mayor que la correspondiente a la gota debido a su difusión
+ <sub>w</sub>	Inhibición débil, con invasión de colonias
∅	Lisis por bacteriófagos



más un tubo control y se llevaron a incubar a 32°C durante 18 horas. Posteriormente se añadió 1 ml de cloroformo a cada tubo, agitando dos veces y dejando reposar respectivamente 10 y 20 minutos. Se recogieron 2ml del sobrenadante desechándose el resto, dejándose evaporar durante una hora en tubos abiertos hasta lograr la evaporación total del cloroformo.

Se sembraron las cepas problema, cuya sensibilidad queremos conocer, por inundación en placas de TSA, dejándose secar una hora a temperatura ambiente. A continuación se añadieron los extractos de aeruginocinas de las 18 cepas indicadoras y del control utilizando el dispositivo diseñado por FARMER. Una vez inoculadas las placas y adsorbidas las aeruginocinas en la superficie del agar, se llevaron a incubar las placas a 37°C, 24 horas.

La lectura se realizó observando la inhibición que producen las aeruginocinas de las 18 cepas ALA sobre cada cepa problema, anotándose todas las características de las zonas de inhibición (TABLA 23). El resultado obtenido se transformó a su vez en un número de seis cifras tal como se describe en la TABLA 22.

#### 4.10. MICROSCOPIA ELECTRONICA

##### - OBSERVACION PREVIA TINCION

La técnica empleada fue la descrita por GERRAD et al. (1974) y BEVERIDGE y MURRAY (1976). Las células utilizadas para su fijación y corte se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 minutos. El sedimento resultante se fijó con 2-3 ml de glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato Sörensen 0,1 M, pH 7,38 durante 2 horas a 4°C. Después de varios lavados con solución tampón, las células se fijaron con  $O_4Os$  al 1% en Sörensen 0,1 M durante 2 horas a temperatura ambiente, protegiendo la preparación de la luz. Después de varios lavados con agua destilada, se incluyó el sedimento con una gota de agar Noble (Difco), que fue seccionado en pequeñas unidades. Estas fueron deshidratadas a través de concentraciones crecientes de etanol. Las preparaciones así obtenidas se guardaron en nevera. Posteriormente se realizó una tinción con acetato de uranilo al 2%.

#### - OBSERVACION DIRECTA

La técnica realizada fue la descrita por BEVERIDGE y MURRAY (1980). La cepa problema se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó una gota de agar Noble al sedimento, cortándose en pequeñas fracciones. Se realizó una deshidratación con concentraciones crecientes de alcohol. La observación al microscopio se efectuó sin posterior tinción.

#### - PRETRATAMIENTO CON EDTA

El EDTA se utilizó como quelante de los posibles iones de  $\text{Cr}^{6+}$  que se encuentran en la superficie del microorganismo. La técnica empleada es una modificación de la de NORRIS y KELLI (1979). Una concentración 1 mM de EDTA secuestra los cationes extracelulares.

A partir de la suspensión bacteriana a observar, que se encontraba en presencia de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , se realizó una centrifugación a 5000 rpm y posterior lavado del sedimento con agua destilada. Esta última operación se repitió tres veces.

El sedimento se dejó 5 minutos en presencia de una concentración 12 mM de EDTA a temperatura ambiente (HORI-KOSHI et al., 1979). Se centrifugó durante 30 minutos a 5000 rpm resuspendiendo el sedimento en agua destilada. El sedimento obtenido se observó por microscopía electrónica según la técnica de BEVERIDGE y MURRAY (1980).

#### 4.11. DETERMINACION DEL CROMO

Para la determinación del ión cromo se emplearon dos técnicas distintas : colorimetría para la determinación del ión cromo hexavalente y espectroscopía de absorción atómica para la determinación del cromo total. En la determinación del cromo hexavalente se empleó un método colorimétrico descrito por SANDELL en 1959 y posteriormente revisado por CHARLOT en 1978.

La colorimetría del ión cromato fue posible ya que a concentraciones que oscilen entre 5 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , el ión cromato sigue la ley de Lambert Beer. Para ello se debe conseguir que las soluciones problema se mantengan a un pH cercano a 9 y que los límites de las concentraciones a examinar se encuentren entre los márgenes antes citados (WEAST, 1976 - 1977; CHARLOT, 1978). Para conseguir un

pH cercano a 9 utilizamos tampón borato (CHARLOT, 1978).

En la marcha analítica se partió de matraces con concentraciones de cromato potásico entre 4500  $\mu\text{g/ml}$  y 500  $\mu\text{g/ml}$ . A cada uno de los matraces se añadió 1 ml de suspensión del microorganismo que corresponde al número uno de la escala de MacFARLAND (0,1 ml  $\text{BaCl}_2$  y 9,9 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%). Se preparó un blanco con agua destilada estéril y un control al que se le adicionó 1 ml de la suspensión problema al TSB sin haberle añadido cromato potásico.

Una vez preparados los matraces, se agitaron y se tomó una parte alícuota de cada matraz, se centrifugó 30 minutos a 5000 rpm, recogiendo 1 ml del sobrenadante al que se le adicionó 2 ml de tampón borato, llevándose hasta 100 ml con agua destilada estéril.

Se realizó la primera lectura en absorbancias a tiempo cero en un espectrofotómetro PERKIN ELMER modelo 55 a 370 nm, dando un valor cero a la parte alícuota correspondiente al tubo control.

Con los resultados obtenidos a las distintas concentracio-

nes se calculó el coeficiente de correlación y la recta de regresión. Con estos datos hallados configuramos la recta patrón.

Los matraces se incubaron a 37°C, realizándose una lectura a las 24, 48 y 72 horas de la forma anteriormente descrita.

El sobrenadante obtenido después de las 72 horas de incubación se dividió en dos fracciones. Con una de ellas se siguió la pauta anteriormente descrita. Se tomó 1 ml de la otra fracción al que se añadió 0,6 ml de agua oxigenada de 110 volúmenes y 2 ml de tampón borato (DRUCKER et al., 1979). Se añadieron 10 ml de agua destilada estéril durante media hora a 45°C, quedando de esta forma los compuestos de cromo con valencia 6<sup>+</sup> (CHARLOT, 1978; DRUCKER et al., 1979). Al cabo del tiempo indicado se enrasó a 100 ml con agua destilada estéril y se realizó la lectura en el espectrofotómetro.

Con el agua oxigenada se consiguió que los posibles compuestos de cromo que se hubiesen formado y no poseyesen el cromo en su forma hexavalente pasasen a este grado de oxidación (CHARLOT, 1978; DRUCKER et al., 1979).

Para la determinación del cromo total por absorción atómica se prepararon un conjunto de cuatro frascos. La composición de los mismos fue :

- 1- TSB + 1600  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (control de cromo)
- 2- TSB + cepa problema (control del inóculo)
- 3- TSB (control del medio)
- 4- TSB + una suspensión de la cepa problema igual a la concentración del frasco "2" + una concentración de cromato potásico hasta alcanzar el conjunto una concentración de 1600  $\mu\text{g/ml}$ .

Una vez preparados los frascos se dejaron en la estufa durante 48 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrido el tiempo se centrifugaron los cuatro frascos durante 30 minutos a 5000 rpm. Los sedimentos obtenidos se sometieron posteriormente a sucesivos lavados y centrifugados, añadiéndose las aguas de lavado a los sobrenadantes correspondientes obtenidos en el primer centrifugado.

El sedimento del frasco número "4" se dividió en dos mitades :

- a- A una de las mitades se añadió 0,2 ml de  $\text{HNO}_3$  6 M

y durante 30 minutos se mantuvo a ebullición en el baño maría (NORRIS y KELLI, 1977). Posteriormente se adicionó 4 ml de agua destilada. Se centrifugó durante 30 minutos a 5000 rpm y el sobrenadante fue leído por absorción atómica.

b- A la otra mitad se le adicionó 4 ml de DPTA 0,005M y pH 7,3 (LINDAY y NOVELL, 1978). El DPTA empleado fue de MERCK, comercializado con el nombre de "Tri-triplex V", de fórmula empírica  $C_{14}H_{23}O_{10}$ , este compuesto contiene además de 0,005M de DPTA,  $CaCl_2$  0,01M y trietanol amina con un pH final de 7,3.

A los sobrenadantes obtenidos 1, 2, 3, a y b, previa lectura en el espectrofotómetro, se les adicionó a partes iguales  $NH_4Cl$  al 2% p/v, para poder evitar las posibles interferencias de hierro y níquel tal como señalan Barnes y Giamorise en las normas de utilización del aparato.

Se empleó un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 460, cuyas características más importantes en la determinación del cromo son :

Lámpara de cátodo hueco



Llama reductora rica y amarilla

Gases, aire y acetileno

Longitud de onda 425,4nm

Sensibilidad máxima 5 µg/ml, mínima 0,1 µg/ml

#### 4.12. METODOS ESTADISTICOS

De acuerdo con SCHWARTZ (1977) se aplicaron los siguientes cálculos estadísticos :

##### - INDICE DE PEARSON

Para probar la independencia entre dos variables cualitativas a partir de una tabla de contingencia de l líneas y c columnas, se determinó primero para cada caso el valor calculado en la hipótesis de independencia, que es el producto del total de su línea por el total de su columna, dividiendo por el total general. Se formó a continuación

$$x^2 = \sum \frac{(o - c)^2}{c}$$

para el conjunto de los casos y se buscó el riesgo  $\alpha$  correspondiente dado por la tabla de  $x^2$  de FISHER y YATES para el número de grados de libertad

$$\text{grados de libertad} = (1 - 1) (c - 1)$$

Si  $\alpha > 5\%$  no hay unión significativa

Si  $\alpha \leq 5\%$  la unión es significativa y  $\alpha$  mide su grado de significación.

El método sólo es válido si los valores calculados son iguales o superiores a 5.

En el caso de que los valores calculados fuesen menores que 5 se recomienda :

a) Se calcula primero la prueba del  $\chi^2$  anteriormente descrita. Si es inferior al umbral de significación (3,84 al 5%), se puede finalizar aquí; la diferencia no es significativa.

b) Si por el contrario  $\chi^2$  es igual o superior a este umbral se calcula el  $\chi^2$  corregido (corrección de YATES) donde :

$$\chi^2 = \sum \frac{(|o - c| - 1/2)^2}{c}$$

Si  $\chi^2 < 3,84$  la diferencia es no significativa al 5%.

Si  $X^2 \geq 3,84$  la diferencia es significativa y el grado de significación está fijado por el riesgo leído en la tabla de  $X^2$  para un grado de libertad. El método sólo es válido para caracteres de dos clases.

c) Pero si el  $X^2$  de YATES es próximo al umbral de significación, se debe utilizar el método exacto basado en las diferentes configuraciones. Para ello se calcula la probabilidad  $p = \sum p_i$  de obtener alguna de las configuraciones representadas por :

$a_i$	$b_i$	$l_i$
$c_i$	$d_i$	$l_2$
$c_1$	$c_2$	$N$

donde cada conjunto ( $a_i, b_i, c_i$  y  $d_i$ ) representa una configuración que proporciona una desviación igual o mayor que la obtenida. Se demuestra que esto es :

$$P_i = \frac{l_1! l_2! c_1! c_2!}{a_i! b_i! c_i! d_i! N!}$$

Para su realización se parte del menor de los valores calculados, se le hace decrecer de unidad en unidad hasta cero, manteniendo constantes los totales de líneas y columnas y se calcula la suma  $p = \sum p_i$  de las probabilidades de

estas configuraciones. Si  $2p \leq 5\%$ , la diferencia es significativa y  $2p$  fija el grado de significación.

#### - ANALISIS DE LA VARIANZA

La comparación de medias de  $c$  series de medidas de una cantidad  $x$ , inscritas en  $c$  columnas de una tabla, está basada en la distribución  $F$  en la cual :

- El numerador es la varianza "entre columnas":

$$\frac{\sum (T_i^2 / n_i) - T_G^2 / N}{c - 1}$$

- El denominador es la "varianza residual" :

$$\frac{\sum x^2 - \sum (T_i^2 / n_i)}{N - c}$$

donde :

$n_i$  = número de medidas de la columna  $i$

$N$  = número total de medidas =  $\sum n_i$

$T_i$  = total de las medidas de la columna  $i$

$T_G$  = total general de las medidas =  $\sum T_i$

Las medidas difieren significativamente en su conjunto con el riesgo del 5% si  $F$  supera el límite  $F_{N-c}^c$  leído en la tabla de  $F$  (PEARSON y HARTLEY) "punto 5%" para los grados de libertad  $(c - 1)$  y  $(N - c)$ . Difieren con el umbral 1% si  $F$  es superior al límite leído en la tabla "punto 1%".

Esta prueba sólo es válida si las diversas series provienen de poblaciones distribuidas normalmente y teniendo todas la misma varianza.

Si las medias difirieron significativamente en su conjunto pasamos a estudiar sus relaciones dos a dos aplicando la siguiente fórmula :

$$\xi = \frac{m_A - m_B}{\sqrt{\frac{S_A^2}{n_A} + \frac{S_B^2}{n_B}}}$$

donde  $S_A^2$  y  $S_B^2$  son las varianzas estimadas.

Si  $|\xi| < 1,96$  la diferencia no es significativa al 5%.

Si  $|\xi| \geq 1,96$  la diferencia es significativa y el riesgo correspondiente a  $\xi$ , leído en la tabla de la desviación

standard de FISHER y YATES, fija el grado de significación.

Esta fórmula sólo es válida para muestras en las que  $n_A \geq 30$  y  $n_B \geq 30$ .

En el caso que no se cumpliera esta última premisa se aplicó el test de STUDENT que está basado en la siguiente igualdad.:

$$t = \frac{m_A - m_B}{\sqrt{\frac{S^2}{n_A} + \frac{S^2}{n_B}}}$$

donde  $S^2$  representa la estimación de la varianza, supuesta común, por la fórmula :

$$S^2 = \frac{\sum (x - m_A)^2 + \sum (x - m_B)^2}{n_A + n_B - 2}$$

Si  $|t|$  es inferior al valor leído en la tabla de  $t$  de Student (FISHER y YATES) para

$$\text{grados de libertad} = n_A + n_B - 2$$

y el riesgo 5%, la diferencia no es significativa; en el

caso contrario es significativa y el riesgo indicado por la tabla para el valor de  $|t|$  encontrado fija el grado de significación.

La prueba sólo es válida si el carácter estudiado está distribuido, en las dos poblaciones de donde provienen las muestras, según leyes normales de igual varianza.

- COEFICIENTE DE CORRELACION  $r$

La independencia entre dos variables  $x$  e  $y$  a partir de una muestra de  $n$  pares de valores, está basado en el valor de la pendiente en coordenadas reducidas :

$$r = \frac{\sum (x - m_x) (y - m_y)}{\sqrt{\sum (x - m_x)^2 \sum (y - m_y)^2}}$$

donde  $m_x$  y  $m_y$  son las medias observadas de los valores de  $x$  y de  $y$ .

El riesgo  $\alpha$  correspondiente a  $r$  puede ser obtenido por la tabla del coeficiente de correlación para  $n - 2$  grados de libertad o para mayor exactitud calculando :

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{n - 2}$$

y buscando el riesgo correspondiente en la tabla de t de Student para  $n - 2$  grados de libertad.

Si  $\alpha > 5\%$  la relación no es significativa al 5%.

Si  $\alpha \leq 5\%$  la relación es significativa y  $\alpha$  mide su grado de significación.

#### - RECTA DE REGRESION

Una vez calculado el coeficiente de correlación  $r$ , habiendo encontrado una relación significativa, se puede realizar la estimación de la recta de regresión  $y = f(x)$ .

Esta recta pasa por el centro de gravedad de los resultados :

$$m_x = \frac{\sum x}{n} \quad y \quad m_y = \frac{\sum y}{n}$$

con pendiente

$$P_o = \frac{\sum (x - m_x) (y - m_y)}{\sum (x - m_x)^2}$$



siendo la ecuación de la recta :

$$y = P_0 (x - m_x) + m_y$$

## V RESULTADOS

## V RESULTADOS

### 5.1. PORCENTAJES DE AISLAMIENTO DE P. aeruginosa EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS

En la TABLA 24 se especifica el número de muestras analizadas y los porcentajes de aislamiento de P. aeruginosa hallados en los distintos hábitats. Como se señala en la referida TABLA se han analizado 1557 muestras con 565 aislamientos de P. aeruginosa. La distribución del muestreo fluctúa desde 530 muestras analizadas procedentes de formas farmacéuticas no estériles hasta 38 muestras de alimentos manipulados en ambiente hospitalario.

El mayor porcentaje de aislamientos de P. aeruginosa ha correspondido al hábitat constituido por aguas superficiales terrestres, con un 57,5%. Obviamente las formas farmacéuticas no estériles han proporcionado el porcentaje más bajo de este microorganismo (3,6%). Es interesante hacer constar que las cepas de P. aeruginosa pertenecientes a productos patológicos humanos y animales no se expresan con el correspondiente porcentaje de aislamiento, al haber sido suministradas directamente por

TABLA 24

Número de muestras analizadas y porcentajes de aislamiento de P. aeruginosa.

	<u>Nº muestras analizadas</u>	<u>Nº P. aeruginosa aisladas</u>	<u>%</u>
Aguas superficiales terrestres	400	230	57,5
Aguas marinas superficiales	162	88	54,3
Suelos	350	75	21,4
Fangos de depuradoras	77	43	55,8
Productos patológicos humanos		97	
Productos patológicos animales		6	
Formas farmacéuticas no estériles	530	19	3,6
Alimentos	38	7	18,4
TOTAL	1557	565	

bacteriólogos de centros hospitalarios. Los datos obtenidos se han procesado de acuerdo a la prueba de  $X^2$ , observándose una diferencia significativa ( $X^2=370$ , en base a cuatro grados de libertad -g.l.-, con un riesgo de error  $\alpha < 0,001$ ). Estos datos señalan una desviación que afecta al porcentaje de aislamiento en función del origen de la muestra problema.

Independientemente, en la TABLA 25 se señala la naturaleza y características de preparados farmacéuticos y productos alimenticios positivos en P. aeruginosa, especificándose en clave el centro hospitalario de procedencia y el número de muestras examinadas.

## 5.2. IDENTIFICACION

La TABLA 26 señala los resultados obtenidos en la identificación de P. aeruginosa. Evidentemente se trata de una prospección crítica con un número de pruebas limitado, pero altamente significativo.

TABLA 26

Resultados de la identificación de las cepas de P. aeruginosa

Gram	-
Oxidasa	+
O/F (glucosa)	+/-
Hidrólisis de la gelatina	+
Reducción de los nitratos	+
Hidrólisis de la arginina	+
Descarboxilación de la lisina	-
Formación de SH <sub>2</sub>	-
Hidrólisis de la sacarosa	-
Movilidad	+
Crecimiento a 42°C	+
Producción de piocianina	+
Producción de fluoresceína	
detectable a la luz de Wood	+

TABLA 25

Formas farmacéuticas y alimentos contaminados por P. aeruginosa.

<u>Muestra número</u>	<u>Producto analizado</u>	<u>Hospital</u>
14	Altabactina <sup>®</sup>	B
71	Conductasa <sup>®</sup>	C
96	Persantin <sup>®</sup>	B
126	Solución KI 2%	B
129	Solución de glucosa 50%	B
132	Suero glucosado	B
133	Suero glucosado	B
150	Suero ringer	B
155	Suero glucosado	B
189	Jabón	D
224	Suero glucosado	B
243	Suero glucosado	B
245	Suero glucosado	B
294	Suero ringer	B
295	Suero glucosado	B
503	Solución fisiológica	B
548	Pasta lassar	B
553	Solución fisiológica	B
564	Solución fisiológica	B
172	Rábanos	B
173	Escarola	B
174	Tomate	B
540	Lechuga	F
541	Rábano	F
561	Mermelada	B
563	Queso	B

### 5.5. ACTIVIDAD DE ANTIBIOTICOS Y QUIMIOTERAPICOS FRENTE A LAS CEPAS ESTUDIADAS

Respecto a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, en la TABLA 27 y en la FIGURA 8 se expresan los datos correspondientes al comportamiento de las diferentes cepas de P. aeruginosa frente a la ampicilina. En todos los casos, el 100% de las cepas estudiadas se muestran resistentes.

En la TABLA 28 y en la FIGURA 9 se señalan los resultados correspondientes a la acción de la carbenicilina sobre las cepas de P. aeruginosa. En términos generales el espectro de comportamiento se puede distribuir en tres grupos. El índice de mayor resistencia es el que corresponde a las cepas aisladas de productos patológicos ( $X^2=16,1$ ; g.l.=1;  $\alpha < 0,001$ ), y la mayor sensibilidad se sitúa a nivel de las bacterias aisladas a partir de formas farmacéuticas no estériles y alimentos ( $X^2=15,68$ ; g.l.=1;  $\alpha < 0,001$ ). Finalmente existe un grupo intermedio con un comportamiento relativamente semejante, que corresponde a las colecciones de P. aeruginosa aisladas a partir de suelos, aguas superficiales terrestres, aguas marinas y fangos de depuradoras, con unos porcentajes de resistencia que oscilan



TABLA 27

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la ampicilina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	230	230
M	88	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	565	565

TABLA 28

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la carbenicilina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	30	75
A	119	230
M	43	88
D	17	43
H	72	103
F	2	26
TOTALES	283	565

FIGURA 8 Porcentajes de resistencia a la ampicilina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

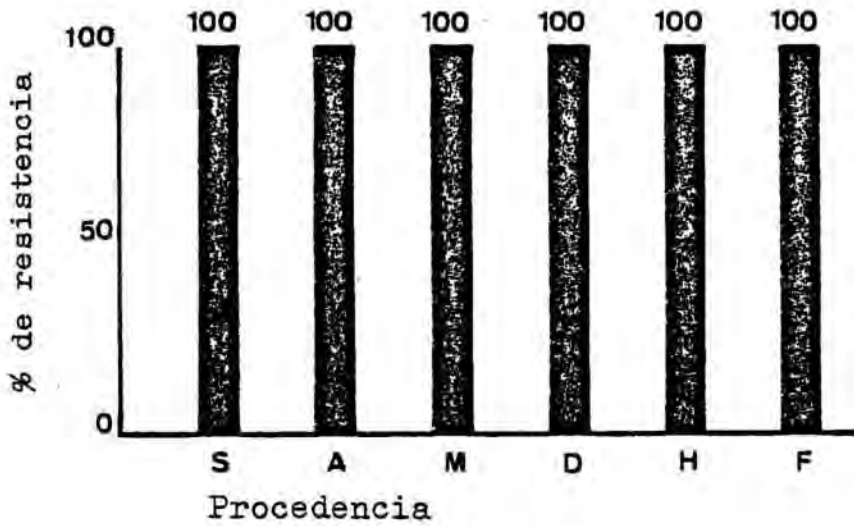
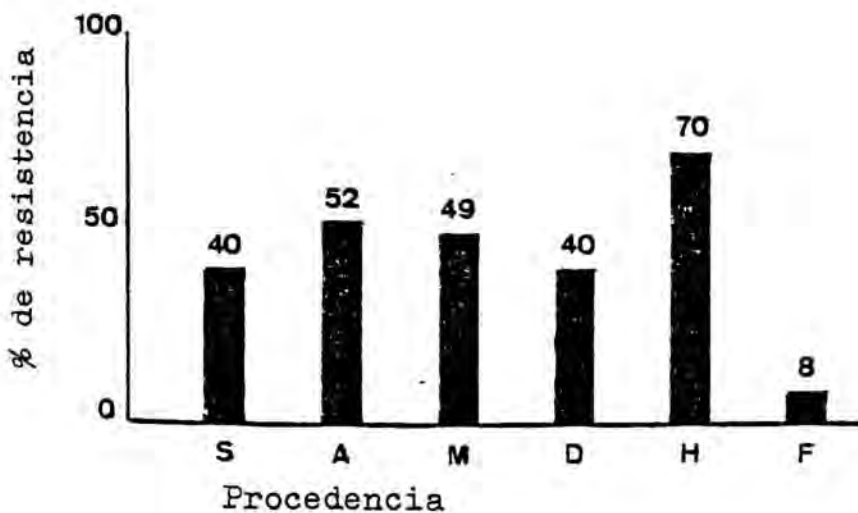


FIGURA 9 Porcentajes de resistencia a la carbenicilina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.



entre 40 para suelos y fangos de depuradoras, 49 para aguas litorales y 52 para aguas terrestres superficiales. El tratamiento estadístico de estos resultados señala que entre estas cuatro procedencias las diferencias no son significativas ( $\chi^2=4,48$ ; g.l.=3;  $\alpha=0,30$ ).

Finalmente, dentro de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se ha utilizado la cefalotina, a efectos de herramienta taxonómica, comprobándose que en todos los casos las cepas de P. aeruginosa de los distintos hábitats son resistentes. En la TABLA 29 y FIGURA 10 quedan expresados los datos que hacen referencia a este antibiótico.

Entre los antibióticos de la familia de los aminoglicósidos ensayados, los resultados obtenidos presentan cierta heterogeneidad. En principio puede afirmarse que los aminoglicósidos más antiguos presentan una eficacia más reducida y, alternativamente, los de uso más reciente se presentan francamente efectivos, pudiéndose afirmar que la tobramicina es el antibiótico más activo frente a este grupo de P. aeruginosa aisladas de diferentes hábitats.

TABLA 29

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la cefalotina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nºcepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	230	230
M	88	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	565	565

Los únicos índices testimoniales de sensibilidad a la estreptomicina los proporcionan las cepas procedentes de aguas superficiales terrestres y las de aguas litorales, con un 89 y un 97% de resistencia respectivamente (TABLA 30 y FIGURA 11). Las restantes P. aeruginosa de suelos, fangos de depuradoras, productos patológicos y formas farmacéuticas no estériles y alimentos tienen un comportamiento homogéneo de máxima resistencia. Los cálculos estadísticos señalan que las diferencias entre las cepas procedentes de aguas superficiales terrestres y aguas litorales respecto a los restantes hábitats son significativas (según el método exacto basado en las diferentes configuraciones obtenidas  $\alpha = 0,04$ ).

El comportamiento frente a la neomicina queda perfectamente señalado en la FIGURA 12 y en la TABLA 31. Es interesante observar la heterogeneidad frente a las cepas procedentes de los diferentes hábitats. En ningún caso hay coincidencia de resultados, aunque para las cepas procedentes de suelos y aguas marinas superficiales son muy semejantes, con un 71 y 72% de resistencia respectivamente. En cambio, las aguas superficiales terrestres presentan un 47% de resistencia. La máxima resistencia a la neomi-

TABLA 30

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la estreptomomicina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	205	230
M	86	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	538	565

FIGURA 10 Porcentajes de resistencia a la cefalotina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

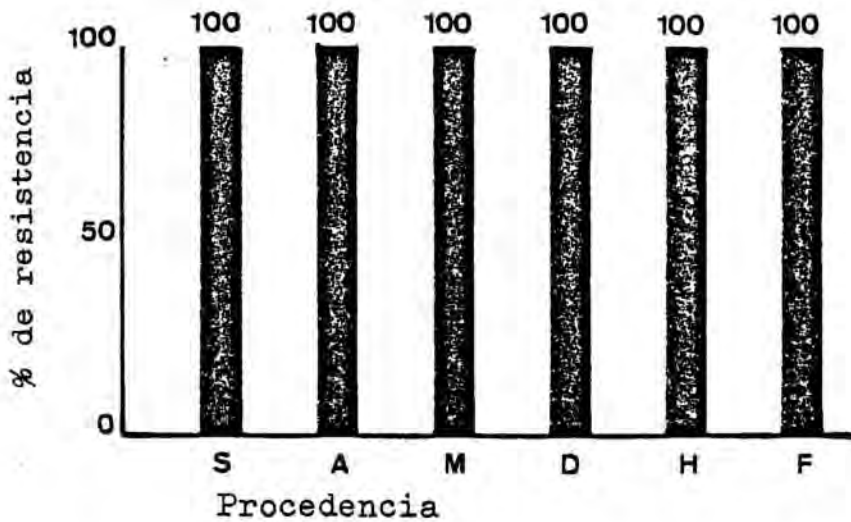


FIGURA 11 Porcentajes de resistencia a la estreptomicina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

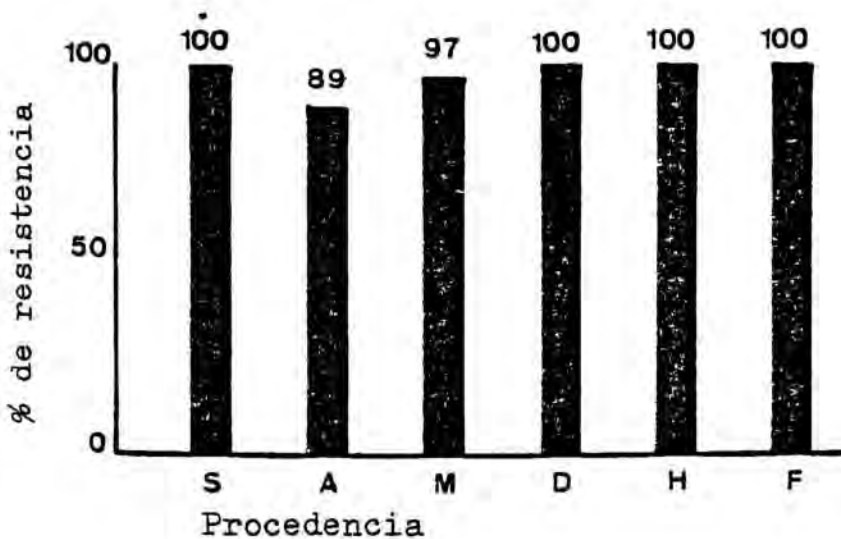




TABLA 31

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la neomicina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	53	75
A	109	230
M	63	88
D	16	43
H	85	103
F	8	26
TOTALES	334	565

cina se observa a nivel de las cepas procedentes de aislamientos hospitalarios y la mayor sensibilidad ha correspondido a los aislamientos obtenidos a partir de fármacos y alimentos, con un 31%. Curiosamente, los aislamientos procedentes de muestras de fangos de depuradoras se distancian, con un 37% de resistencia, de los resultados de aguas litorales y suelos. El tratamiento estadístico, que se ha verificado ante este comportamiento tan singular, muestra que las diferencias en el grupo de suelos, aguas marinas superficiales y productos patológicos no son significativas ( $X^2=4,36$ ; g.l.=2;  $\alpha=0,20$ ), aunque sí respecto a los tres restantes, aguas terrestres superficiales, fangos de depuradoras y formas farmacéuticas no estériles y alimentos ( $X^2=56,37$ ; g.l.=1;  $\alpha<0,001$ ), que entre ellos tampoco muestran diferencias significativas ( $X^2=3,61$ ; g.l.=2;  $\alpha=0,02$ ).

Los resultados correspondientes a la kanamicina se señalan en la FIGURA 13 y en la TABLA 32. El comportamiento es homogéneo y el índice de resistencia es máximo, del orden del 100%, para las cepas procedentes de muestras de suelos, aguas marinas superficiales, productos patológicos y formas farmacéuticas no estériles y alimentos.

TABLA 32

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la kanamicina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	225	230
M	88	88
D	41	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	558	565

FIGURA 12 Porcentajes de resistencia a la neomicina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

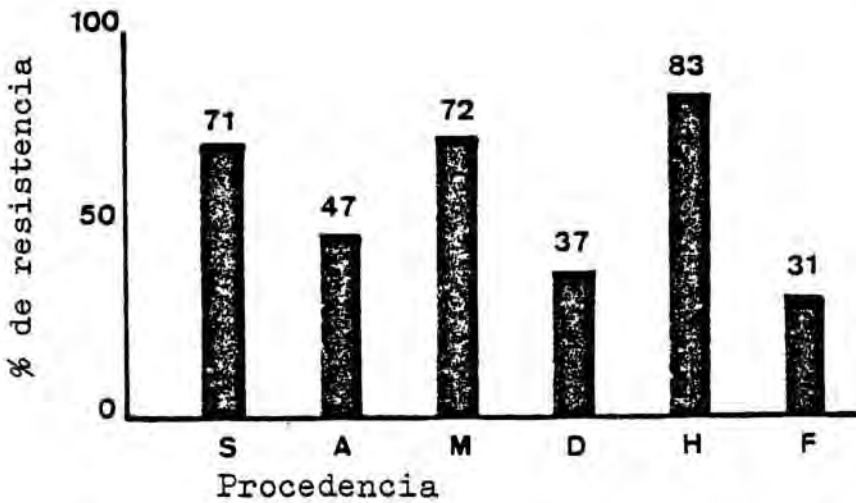
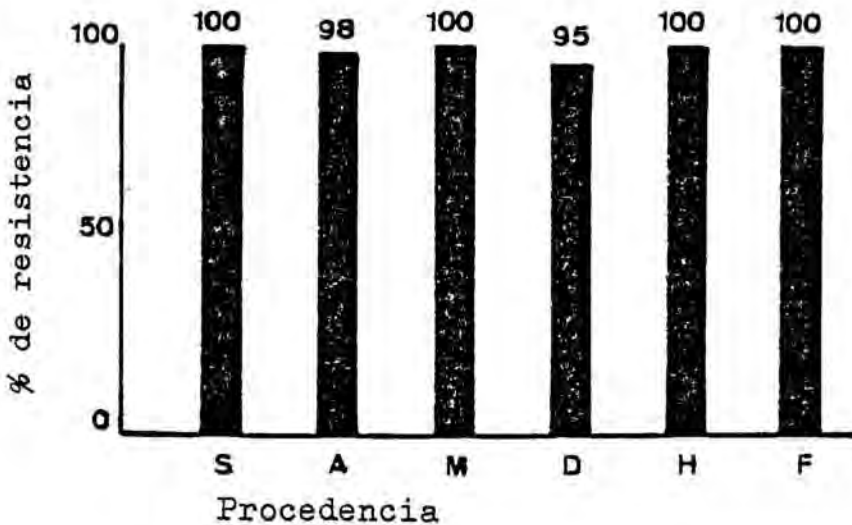


FIGURA 13 Porcentajes de resistencia a la kanamicina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.



Solamente el 2% de las P. aeruginosa procedentes de aguas terrestres superficiales y el 5% procedentes de fangos de depuradoras son sensibles a la kanamicina. El estudio estadístico con los resultados correspondientes a la TABLA 32 ha puesto de manifiesto que los porcentajes de resistencia hallados con las cepas procedentes de fangos de depuradoras y aguas terrestres no son significativos ( $\chi^2=0,90$ ; g.l.=1;  $\alpha=0,50$ ). Obviamente, los datos estadísticos entre las cepas correspondientes a las muestras de aguas terrestres y fangos de depuradoras son significativamente distintos a los resultados hallados con las cepas de las restantes procedencias (según el método exacto basado en las diferentes configuraciones obtenidas  $\alpha=0,01$ ).

Entre los aminoglicósidos, la gentamicina actúa con gran eficacia frente a las diferentes cepas de P. aeruginosa aisladas. Es interesante señalar que la totalidad de las cepas procedentes de preparados farmacéuticos y alimentos es sensible a este antibiótico y que las P. aeruginosa aisladas de suelos, fangos de depuradoras y aguas litorales presentan porcentajes tan bajos como 9, 7 y 3 respectivamente. Este porcentaje de resistencia prácticamente

se duplica para las cepas procedentes de aguas superficiales terrestres, con un 16% de resistencia ( $X^2=13,13$ ; g.l.=1;  $\alpha < 0,001$ ), y el máximo nivel de resistencia se alcanza entre las cepas procedentes de productos patológicos, con un 49% de resistencia ( $X^2=38,7$ ; g.l.=1;  $\alpha < 0,001$ )(TABLA 33, FIGURA 14).

Los mayores índices de sensibilidad se alcanzan con la tobramicina. Todas las cepas procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos son sensibles a este antibiótico y solamente aparecen resistencias a nivel de un 1% entre las cepas aisladas de suelos y aguas marinas superficiales. En las aguas superficiales y en los fangos de depuradoras solamente se ha encontrado P. aeruginosa con un índice de resistencia del 5%. Finalmente, el mayor grado de resistencia aparece para el caso de las cepas de origen hospitalario, con un 18% (TABLA 34, FIGURA 15). El empleo de la estadística para procesar los datos obtenidos ha puesto en evidencia que las diferencias entre los porcentajes hallados en suelos, aguas superficiales terrestres, aguas marinas superficiales, fangos de depuradoras y formas farmacéuticas no estériles y alimentos no son significativas ( $X^2=0,24$ ; g.l.=1;  $\alpha = 0,90$ );

TABLA 33

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la gentamicina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	7	75
A	37	230
M	3	88
D	3	43
H	50	103
F	0	26
TOTALES	100	565

TABLA 34

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la tobra-  
micina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	1	75
A	11	230
M	1	88
D	2	43
H	19	103
F	0	26
TOTALES	34	565



FIGURA 14 Porcentajes de resistencia a la gentamicina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

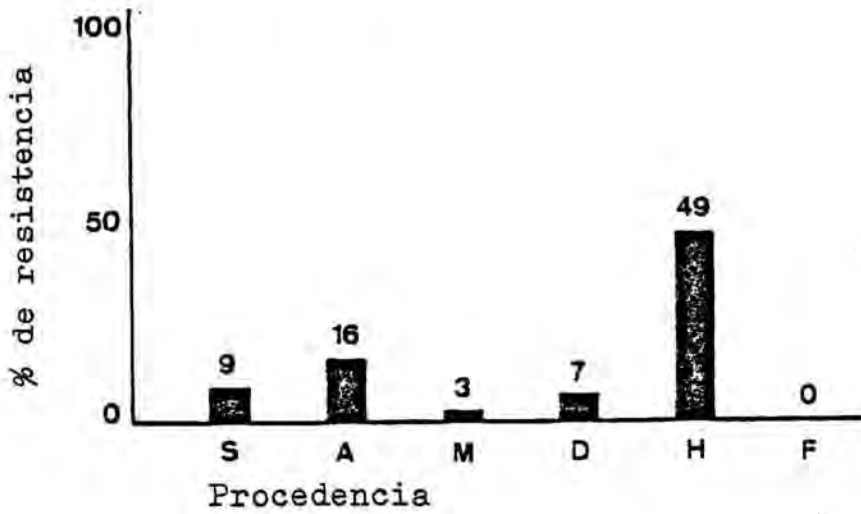
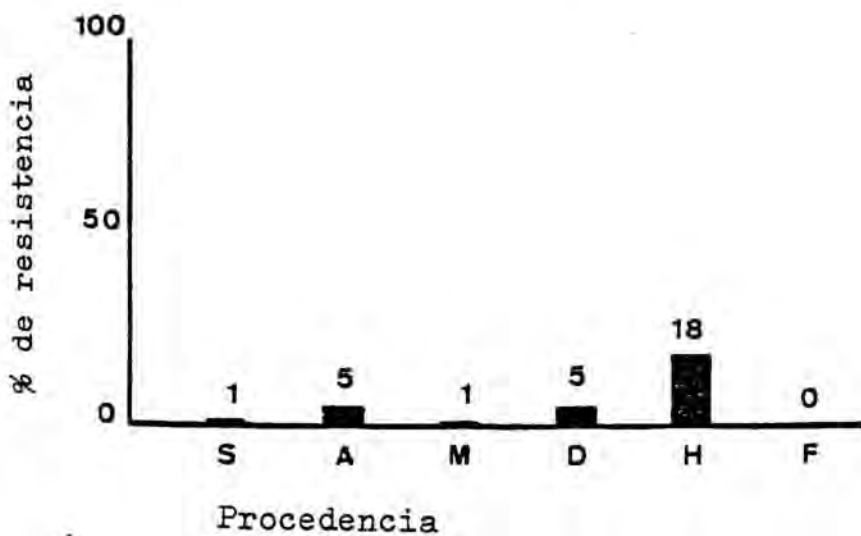


FIGURA 15 Porcentajes de resistencia a la tobramicina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia



en cambio, los resultados que se refieren al porcentaje de resistencia de las cepas de origen hospitalario son significativamente distintos ( $X^2=34,36$ ; g.l.=1;  $\alpha < 0,001$ ).

La FIGURA 16 y la TABLA 35 señalan los porcentajes de resistencia a la tetraciclina de las cepas objeto de estudio, así como el número de las mismas que son resistentes en función del número total.

La resistencia es del 100% para las cepas procedentes de muestras de suelos, aguas marinas, productos patológicos y formas farmacéuticas no estériles y alimentos. En cambio, 12 cepas procedentes de aguas superficiales terrestres (5,3%) y dos procedentes de fangos de depuradoras (4,7%) han presentado sensibilidad a la tetraciclina. El tratamiento estadístico de los resultados de la TABLA 35 (prueba del  $X^2$ ) señala que hay diferencias significativas entre el grupo de cepas procedentes de aguas superficiales terrestres y fangos de depuradoras respecto al resto de las cepas ( $X^2=15,19$ ; g.l.=1;  $\alpha < 0,001$ ).

En la TABLA 36 y FIGURA 17 se expresan los resultados obtenidos mediante el uso del cloranfenicol. Frente a este

TABLA 35

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la tetraciclina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	218	230
M	88	88
D	41	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	551	565

TABLA 36

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al cloranfenicol según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	230	230
M	88	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	565	565

FIGURA 16 Porcentajes de resistencia a la tetraciclina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

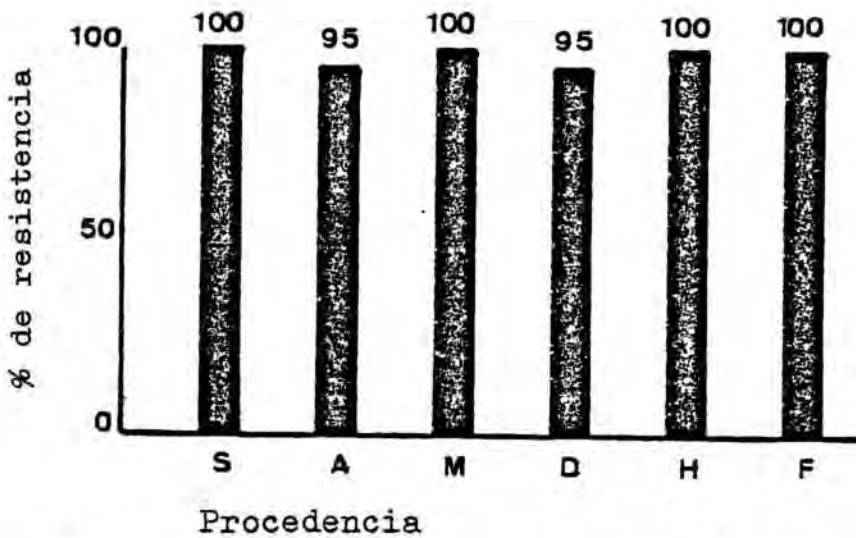
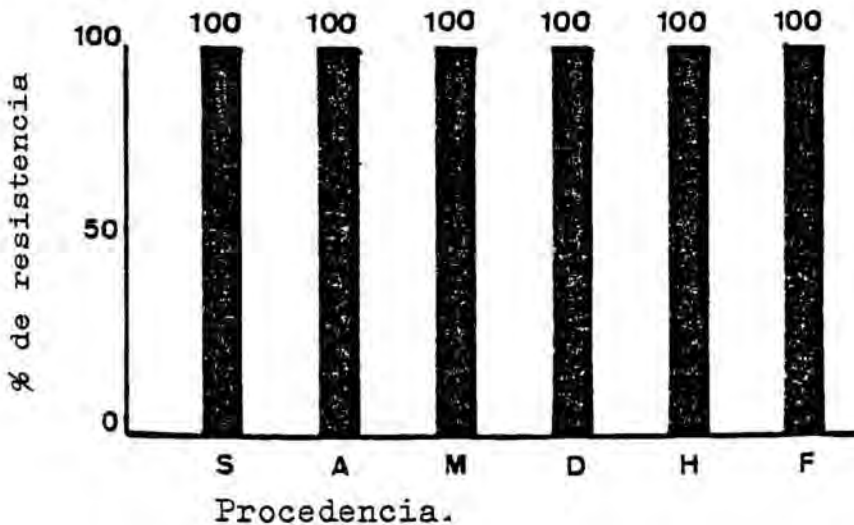


FIGURA 17 Porcentajes de resistencia al cloranfenicol de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.



antibiótico todas las cepas se han comportado de forma similar, hallándose en todas las procedencias estudiadas un 100% de resistencia.

Entre los antibióticos polipeptídicos que trabajan a nivel de membrana, los resultados obtenidos con la colistina se presentan en la FIGURA 18 y en la TABLA 37. Es el antibiótico que mayor índice de sensibilidad proporciona frente a las cepas de origen hospitalario. Las cepas aisladas de suelos sólo presentan un 1% de resistencia y el grupo de P. aeruginosa procedentes de formas farmacéuticas no estériles y alimentos, productos patológicos, fangos de depuradoras y aguas marinas, presenta unos porcentajes de resistencia del 4, 7, 7 y 9 respectivamente. El porcentaje más elevado de resistencia, dentro de unos valores francamente moderados, pertenece al grupo de bacterias aisladas de aguas superficiales, con un 13% de resistencia. Los datos estadísticos aplicados para este antibiótico señalan que entre las cepas procedentes del medio ambiente existe una diferencia significativa ( $X^2=6,87$ ;  $\text{E.l.}=1$ ;  $\alpha=0,01$ ), siendo las cepas aisladas de muestras de aguas las más resistentes.

TABLA 37

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la colistina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	1	75
A	29	230
M	8	88
D	3	43
H	7	103
F	1	26
TOTALES	49	565

En la FIGURA 19 y TABLA 38 se expresan los resultados obtenidos con el ácido nalidíxico. En todos los casos se ha hallado un 100% de resistencia, dato que no es sorprendente si se considera la historia de P. aeruginosa frente a este compuesto, que en algunos casos ha presentado bajos índices de sensibilidad.

Entre el arsenal de las sulfamidas, se ha utilizado la sulfadiazina. En la FIGURA 20 y TABLA 39 se señalan los resultados obtenidos. Puede comprobarse que presentan unas diferencias significativas ( $\chi^2=37,66$ ; g.l.=5;  $\alpha < 0,001$ ). El suelo es el hábitat natural que contiene un porcentaje más bajo de cepas resistentes, con un 44%; le siguen los datos pertenecientes a aguas superficiales (55%), aguas marinas (58%) y, finalmente, fangos de depuradoras (63%). Los porcentajes más elevados de resistencia pertenecen a los aislamientos obtenidos a partir de productos patológicos (81%) y formas farmacéuticas no estériles y alimentos manipulados en el hospital (88%). Ante este quimioterápico hemos considerado oportuno verificar un tratamiento estadístico entre los datos hallados con el conjunto de cepas de origen hospitalario y de fármacos frente a los resultados obtenidos a partir de



TABLA 38

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes al ácido nalidíxico según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	230	230
M	88	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	565	565

FIGURA 18 Porcentajes de resistencia a la colistina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

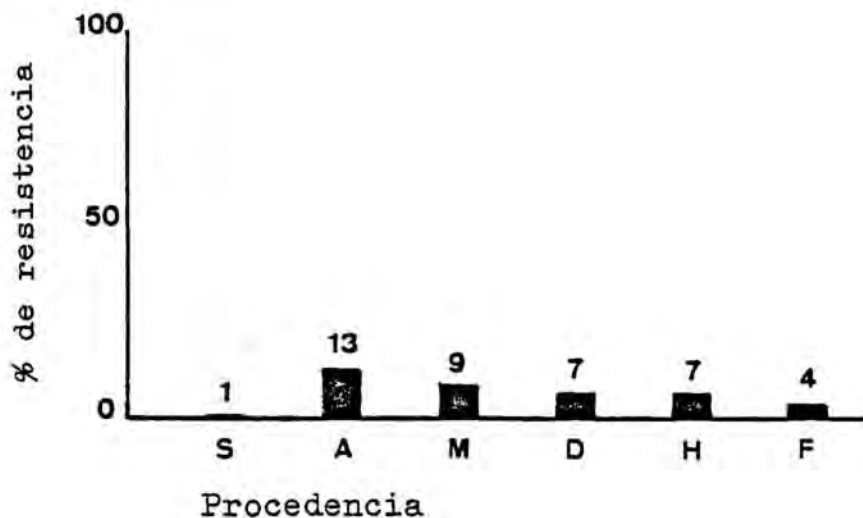


FIGURA 19 Porcentajes de resistencia al ácido nalidíxico de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

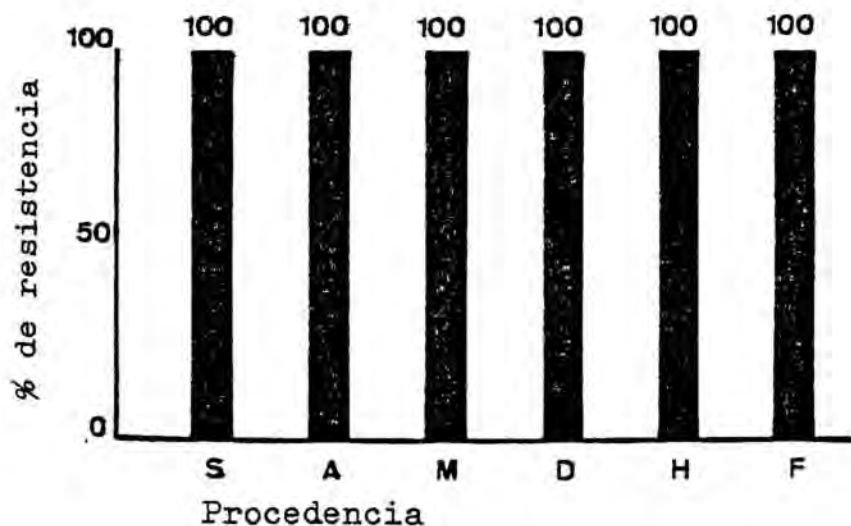


TABLA 39

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a sulfadiazina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	33	75
A	126	230
M	51	88
D	27	43
H	83	103
F	23	26
TOTALES	343	565

las cepas aisladas del medio ambiente, verificándose una diferencia significativa ( $\chi^2=6,91$ ; g.l.=1;  $\alpha=0,01$ ). De igual forma, se manifiesta una diferencia significativa al comparar los porcentajes de resistencia obtenidos con las cepas procedentes de suelos y fangos de depuradoras ( $\chi^2=3,88$ ; g.l.=1;  $\alpha=0,05$ ).

La nitrofurantoina es un quimioterápico empleado frente a P. aeruginosa a efectos de herramienta taxonómica, debido a la característica resistencia que presenta esta especie. En la TABLA 40 y en la FIGURA 21 quedan expresados los datos que hacen referencia a este agente antimicrobiano.

La fosfomicina muestra un comportamiento relativamente homogéneo. Los niveles de resistencia son elevados. La FIGURA 22 muestra los porcentajes de resistencia y la TABLA 41 presenta el número de cepas resistentes de acuerdo con su procedencia. El tratamiento estadístico ha puesto en evidencia que las cepas más sensibles a este antibiótico son las procedentes de aguas superficiales ( $\chi^2=17,35$ ; g.l.=1;  $\alpha<0,001$ ). En las cepas restantes no se ha evidenciado la existencia de diferencias significativas.

TABLA 40

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la nitrofurantoína según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nºcepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	75	75
A	230	230
M	88	88
D	43	43
H	103	103
F	26	26
TOTALES	565	565

FIGURA 20 Porcentajes de resistencia a la sulfadiazina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

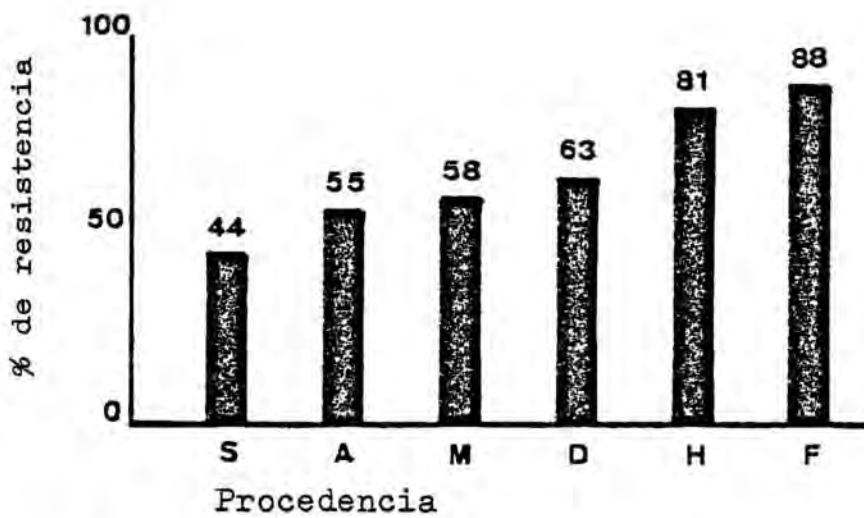


FIGURA 21 Porcentajes de resistencia a la nitrofurantoína de cepas de P. aeruginosa según su procedencia.

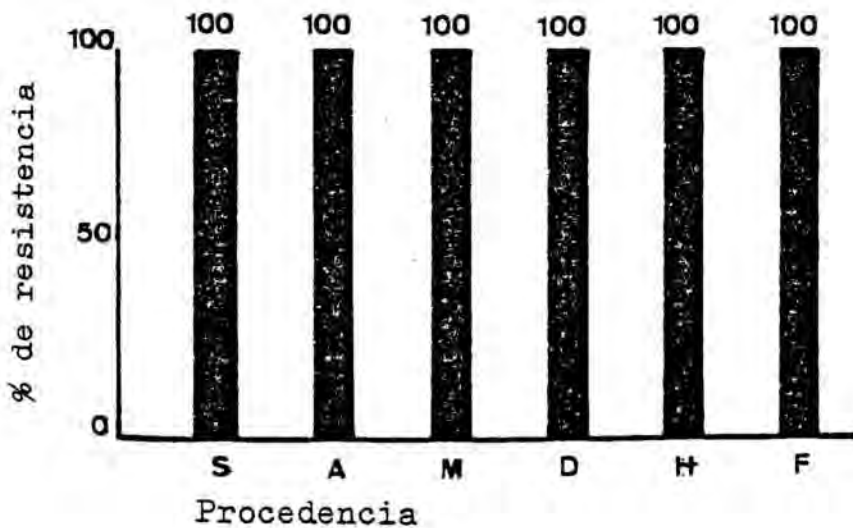
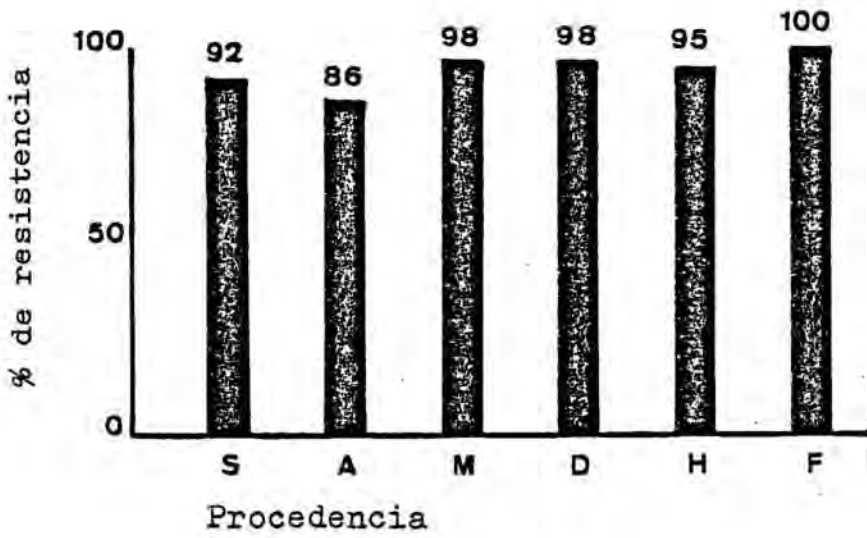


TABLA 41

Número de cepas de P. aeruginosa resistentes a la fosfomicina según su procedencia.

<u>Procedencia</u>	<u>Nº cepas resistentes</u>	<u>TOTALES</u>
S	69	75
A	198	230
M	86	88
D	42	43
H	98	103
F	26	26
TOTALES	519	565

FIGURA 22 Porcentajes de resistencia a la fosfomicina de las cepas de P. aeruginosa según su procedencia.





En la TABLA 42 y en la FIGURA 23 se resumen los resultados señalados hasta ahora y que constituyen el reflejo de los datos parciales que hemos circunstanciado. La tobramicina ha sido el antibiótico más eficaz frente al conjunto de cepas procedentes de diferentes hábitats. La colistina se sitúa por su eficacia en segundo lugar, siguiéndole la gentamicina y carbenicilina. Con datos superiores al 50% de resistencia, se encuentran la neomicina y la sulfadiazina. Finalmente, existe un grupo que sólo es activo frente a estirpes aisladas de hábitats naturales; se trata de la fosfomicina, estreptomycinina, tetraciclina y kanamicina.

La TABLA 43 expresa la matriz de correlación de la resistencia a los agentes antimicrobianos empleados. Los índices hallados son muy elevados, destacando especialmente los valores hallados al comparar aguas marinas con suelos ( $r=0,9922$ ) y depuradoras con aguas terrestres superficiales ( $r=0,9869$ ). Son las cepas aisladas de productos farmacéuticos y alimentos las que más se separan de la media ( $r=0,7656$ ).

TABLA 42

Porcentajes de sensibilidad y resistencia a los distintos agentes antimicrobianos de 565 cepas de P. aeruginosa.

	<u>Sensible (%)</u>	<u>Intermedio (%)</u>	<u>Resistente (%)</u>
Fosfomicina	5,5	2,6	91,9
Tobramicina	92,6	1,4	6,0
Carbenicilina	31,7	18,2	50,1
Gentamicina	80,9	1,4	17,7
Tetraciclina	0,9	1,6	97,5
Colistina	87,3	4,0	8,7
Sulfadiazina	18,1	21,2	60,7
Cloranfenicol	0	0	100
Nitrofurantoína	0	0	100
Neomicina	6,5	34,4	59,1
Ac. Nalidíxico	0	0	100
Estreptomina	0,5	4,3	95,2
Kanamicina	0,5	0,7	98,8
Cefalotina	0	0	100
Ampicilina	0	0	100

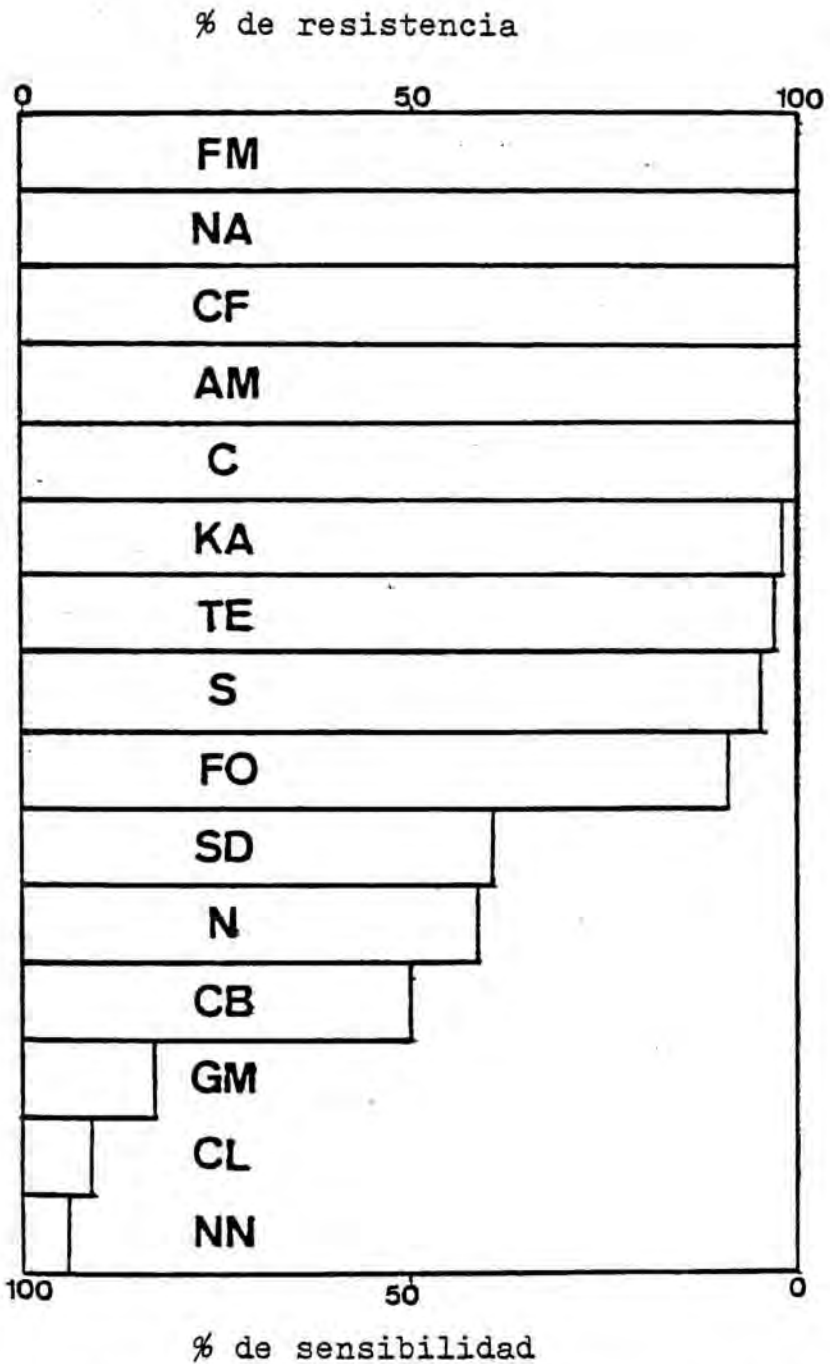


FIGURA 23 Resistencia y sensibilidad de 565 cepas de P. aeruginosa a los 15 agentes antimicrobianos estudiados.

