

Resultados preliminares de caracterización y evaluación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas, a partir de infecciones de fuente nosocomial, comunitaria, de animales y del ambiente

Linzitto OR, Gatti EMM, Del Curto BE, Oliva D, Ibar M, Ávila MS, Martínez Zagazua M, Costa R, Molina Aristizábal M, Conte A, Vázquez A, Taborcia JA, Stanchi NO.

° Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. Departamento de Microbiología. Cátedra de Microbiología Especial. Carrera de Microbiología Clínica e Industrial y Laboratorio de Investigación y Diagnóstico. Fénix Linzay. La Plata.

linzay1953@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa, es conocida desde mediados del siglo XIX gracias a los pigmentos que produce y que aparecían en los apósitos quirúrgicos sin que se supiera su origen, hasta que en 1882, Gessard la aisló en cultivo puro determinando así su origen específico. A ella se le adjudica ser el agente patógeno principal en muchas de las patologías anteriormente mencionadas, mientras que en otros aparece como un simple oportunista. Esta bacteria, actualmente clasificada como Rna Grupo I, es un bacilo gramnegativo, móvil por flagelos polares, aerobio y no exigente para desarrollar. Los cultivos producen un típico aroma a uvas y usualmente se forman colonias verdosas que básicamente pueden ser lisas (S), rugosas (R) y mucoides (M) o bien presentar otras variedades, a partir de las cuales se puede observar la producción de pigmentos (piocianina, pioverdina, ocasionalmente piorrubina y está en discusión la producción de piomelanina), capaces de difundir por el medio de cultivo otorgándole color.

Bioquímicamente *P. aeruginosa* se caracteriza por ser oxidasa y catalasa positiva, hemolítica, oxidativa para los carbohidratos (sin producción de gas y con formación débil de ácidos) y de acción variable en reducción de nitratos y para hidrolizar la gelatina. Su estructura antigénica incluye varios antígenos somáticos (O) y flagelares (H), lo que permitiría la diferenciación de un número variable de serotipos cuya identificación puede ser llevada a cabo principalmente en cepas de origen humano. Además, puede realizarse la tipificación por producción de piocina por serología y por bacteriófagos. Como factores de virulencia de *P. aeruginosa* encontramos toxinas (exotoxina A, comúnmente denominada ExoA Pa) y enterotoxina, enzimas (neuraminidasa, elastasa, leucocidina, proteasas, exoenzima S y fosfolipasa C, lipopolisacáridos (LPS), capa o estrato mucoso extracelular, piocianina y factores de adherencia (alginato y pilis). Además se encuentran metabolitos que ejercen acción inhibitoria sobre otros microorganismos facilitando así la colonización del hospedador por parte de *P. aeruginosa* mediante el antagonismo bacteriano. En cuanto a la inmunidad producida por *P. aeruginosa*, algunos autores sostienen que los títulos de anticuerpos protectores son elevados en pacientes de todas las edades y la eficacia del suero inmune en el tratamiento y/o prevención de la septicemia a pseudomonas fue informada oportunamente por Feingold y Oski en 1965. A partir del estrato mucoso extracelular de la bacteria se han obtenido fracciones inductoras de protección en animales.

El microorganismo se transmite por contacto directo o por colonización de portadores en sangre, órganos infectados o indirectamente (exposición a ambientes contaminados) con el consecuente impacto epidemiológico. En animales, a partir de patologías habituales de cada especie. En bovinos

mastitis, caninos otitis y equinos infecciones respiratorias y urogenitales. Se ha hallado *Pseudomonas* sp. como agente etiológico en patologías de origen traumático tanto espontáneo como experimental (laceraciones, quemaduras, necrosis ulcerativa cutánea o ectima gangrenoso). También han sido detectadas en queratitis, úlceras corneales, en oftalmítis y abscesos que ocasiona desde disminución hasta pérdida total de la visión. Es posible encontrarlas en cuadros septicémicos y shock bacteriémico (ambos de elevada mortalidad), en procesos respiratorios graves (neumónicos y fibrosis quística) que pueden tener un desenlace fatal, en infecciones urinarias con o sin compromiso renal, en meningitis y en procesos contaminantes del líquido cefalorraquídeo, en heridas, abscesos e infecciones postraumáticas, en infecciones óticas en las que la exoenzima A, daña el oído interno y provoca degeneración de las células sensoriales con pérdida de la audición, en cuadros de osteomielitis crónica, en exudados de procesos endo y pericárdicos purulentos. En muchos casos la causa de la invasión por *Pseudomonas* sp. se debe a la inmunosupresión del paciente por factores diversos (administración de corticoides, drogadicción, traumas quirúrgicos, tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro, quemaduras severas, enfermedades graves de orígenes variados, etc.). En ocasiones, agentes integrantes de la microbiota normal exacerbada, por causas aún no determinadas y microorganismos naturalmente patógenos ante cuya acción *Pseudomonas* tendrían un papel totalmente secundario u oportunista. Este desacuerdo sobre la capacidad patógena u oportunista de *Pseudomonas* no reduce su importancia a nivel sanitario debido a que han sido detectadas con gran frecuencia en infecciones intrahospitalarias y en pacientes ambulatorios, de manera tal que se considera que a partir de la década del 60 ha despojado a *Staphylococcus aureus* de la supremacía como responsable de infecciones nosocomiales y de multirresistentes.

El género *Pseudomonas* está constituido por varias especies que en su mayoría se encuentran distribuidas en agua, suelo o sitios en donde hay materia orgánica en proceso de descomposición; pueden ser halladas en muy pequeña proporción en intestino y muy esporádicamente en zonas cutáneas húmedas como axilas e ingle. Algunos autores las consideran bacterias oportunistas, mientras que otros consideran que son patógenas tanto para el hombre y animales como para las plantas. Se las ha detectado sobreviviendo y multiplicándose tanto en elementos de variados orígenes (cremas de manos, maquillaje facial y ocular, equipos de limpieza de pisos, contaminando soluciones “estériles”, agua para higiene corporal, etc.) como en materiales de ambiente hospitalario (humidificadores, equipos de anestesiología y de inhalación, catéteres, botellas de drenaje, agua de equipos de hemodiálisis, etc.) y también en ambientes industriales en donde el género *Pseudomonas* interviene activamente en procesos de corrosión y percutido por formación de biofilms en superficies. En todos los casos se ha reconocido su capacidad de resistencia a muchos antibióticos y desinfectantes, aunque se ha detectado y estudiado su sensibilidad al veneno de ofidios del género *Bothrops*. No obstante, aún no se han determinado su prevalencia ni incidencia real en diversas patologías nosocomiales, en la comunidad, en animales domésticos ni en el ambiente.

Es un género bacteriano de creciente interés global en salud pública. Su indiscutible importancia en infecciones intra hospitalarias en las 48 y 72 horas siguientes a la internación (sin haber tenido síntomas previos ni encontrarse en etapa de incubación), o bien posteriormente a la alta médica. Es de destacar su frecuente hallazgo en profesionales del equipo de salud, pacientes ambulatorios y visitantes al establecimiento sanitario. Lo cual se considera debido a falencias en la aplicación de métodos sanitarios preventivos, transmisión por contacto directo (manos), indirecto (utensilios, instrumental contaminado, secreciones, excreciones), por medio de vehículos inanimados (agua, alimentos, medicamentos, microgotas de Flügge) y animados (moscas y cucarachas). *Pseudomonas aeruginosa* por su ubicuidad en ambientes permisivos potencia su posibilidad de diseminación y de ejecutar su arsenal patogénico, aún más cuando se relaja la bioseguridad. Sus características en cuanto a ubicuidad y oportunismo, en oposición a opiniones que le atribuyen definida acción patógena, su resistencia a antibióticos y desinfectantes, alto grado de morbilidad y mortalidad, tanto en humanos como en animales, domésticos y silvestres, hacen necesario investigar aspectos que brinden información científica, que

permita revelar aspectos inmunológicos y farmacológicos para la prevención o el diagnóstico. Es necesario obtener nuevos inmunógenos, detectar factores de virulencia incriminados en la etiopatogenia de la enfermedad, profundizar la aplicación de medidas de bioseguridad y ensayar nuevos fármacos para su control, disminuyendo así su morbi-mortalidad tanto en humanos como en animales.

No existen suficientes detalles descriptivos de las enfermedades en las cuales *P. aeruginosa* actúa como agente causal, asociado u oportunista. Para un mejor conocimiento y aplicando conceptos de Una Salud, como estrategia global en la tríada humana, animal y ambiental, se busca establecer la relación entre este microorganismo, el hospedador y el ambiente en un contexto epidemiológico holístico e integrador. *Pseudomonas aeruginosa* ocupa el 2.^{do} o 3.^{er} lugar en la casuística de las infecciones hospitalarias en un rango del 10 al 15 % según estadísticas existentes, con presentaciones esporádicas o brotes de distinta magnitud. Al presente no han sido identificados y notificados en la República Argentina algunos serovares o serotipos.

Objetivos: Caracterizar, cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y realizar el trazado epidemiológico, de contaminación, colonización e infección nosocomial, animal y ambiental. en la región, aplicando nuevos criterios y técnicas biomoleculares.

Materiales y métodos

Muestras En el marco del proyecto de investigación denominado “Caracterización y evaluación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de infecciones de fuente nosocomial, comunitaria, de animales y del ambiente” 11/V262. 2018-2022 del Programa de Incentivos para Docentes Investigadores.

Se recibieron *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con diferentes patologías de 2 nosocomios situados uno en la Ciudad de La Plata y otro en Berazategui. También se estudiaron cepas procedentes de animales enfermos y del ambiente aisladas del Servicio de Laboratorios de Análisis Bacteriológicos y Antimicrobianos FCV, UNLP, del laboratorio de diagnóstico e investigación “Fenix Linzay” y del Laboratorio de Asuntos Agrarios de la Prov. de Buenos Aires. Se procesó un total de 238 muestras. En todos los casos se confeccionó una ficha epidemiológica para pacientes humano o animal y para muestras ambientales. Se recolectaron diversos datos, edad, sexo, grupo etareo, datos clínicos, caracterización del paciente (colonizado o infectado), patología de base u otras. Para las muestras ambientales, origen de la muestra y características. Se construyó una base de datos a fin de analizar la prevalencia anual de la Infección en ambos nosocomios. Y en los distintos ambientes.

Procesamiento

Se tipificaron y retipificaron a través de estudios fenotípicos las cepas nosocomiales, las de origen comunitario, ambiental y animal a través de un protocolo de identificación y caracterización cultural, morfológico, tintorial, bioquímico y serológico.

La tipificación serológica, de cada cepa con identificación de serotipos o serovares serán realizadas empleando un panel completo de antisueros comerciales (anticuerpos específicos contra lipopolisacárido de la pared *P. aeruginosa*) aplicando el esquema internacional de tipificación serológica.

Las muestras de origen humano provenían de procesos neumónicos, heridas, abscesos, huesos, sangre y orina. Las de caninos fueron provenientes de heridas y oído, las de equinos de procesos neumónicos y dérmicos y la de bovino de leche.

Se estudió la sensibilidad y resistencia a determinados antimicrobianos por técnicas fenotípicas. La sensibilidad a las drogas se realizó mediante la aplicación *in vitro* por el método difusión de Kirby-Bauer, utilizando mono discos comerciales.

Se reservaron las cepas para su posterior análisis genómico, especialmente en bacterias portadoras de enzimas carbapenemasas, metalo carbapenemasas, betalactamasas de espectro extendido.

Los resultados obtenidos son informados a los centros de salud y a los profesionales actuantes en cada caso.

Con las cepas aisladas se conformó un cepario de conservación, a fin de disponer de ellas para futuros estudios.

Resultados

Hasta el presente se obtuvieron los siguientes resultados preliminares, se caracterizaron y tipificaron fenotípicamente 16 especímenes de *P. aeruginosa* de origen hospitalario, 9 cepas provenientes del nosocomio de Berazategui y 7 cepas del de La Plata. En nuestros centros de diagnóstico e investigación se aislaron 11 cepas de origen animal, 3 cepas de origen ambiental y 3 cepas de origen comunitario (Fig N°1, 2 y 3).

Se obtuvieron resultados de sensibilidad y resistencia de cepas de fuente humana, de ambos hospitales, de su análisis podemos destacar desde el punto de vista genérico que las cepas provenientes de fuente hospitalaria superan el 50 % de resistencia a: gentamicina, amikacina, ceftazidima, piperacilina y meropenem. No obstante, se observa una alta sensibilidad a la ciprofloxacina, colistina, cefepime, ceftazidima-ácido clavulánico, piperacilina+tazobactama e imipenem. Esta situación parece ser distinta con cepas provenientes de la comunidad, de fuente animal y ambiental, donde los porcentajes de resistencia observados fueron menores a los obtenidos de fuente nosocomial. No obstante el número de cepas estudiadas es reducido para sacar conclusiones definitivas. Las cepas provenientes de fuente animal y ambiental evidenciaron mayor sensibilidad a gentamicina, amikacina, ciprofloxacina, ceftazidima, ceftazidima+ácido clavulánico, piperacilina, piperacilina tazobactama, imipenem, meropenem y colistina.

Se aislaron cepas polirresistentes en ambos centros hospitalarios. El cepario contiene al momento 33 cepas de *P. aeruginosa* identificadas todas pigmentadas y caracterizadas. La identificación y características de las mismas al igual que los datos clínicos, epidemiológicos se encuentran registrados en una base de datos.

Discusión

Según resultados obtenidos por el grupo de trabajo en años anteriores en muestras obtenidas a partir de humanos, animales de compañía y de producción, la aparición de esta noxa implica riesgo sanitario y pérdidas a nivel productivo y de performance. Es, por ende, de importancia en Salud Pública y en la Sanidad Animal. No debe olvidarse que la fuente de infección clásica es la contaminación del ambiente, el agua, utensilios o personas y animales portadores sanos o enfermos, que tienen la par-

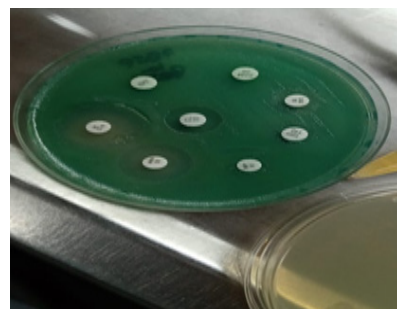
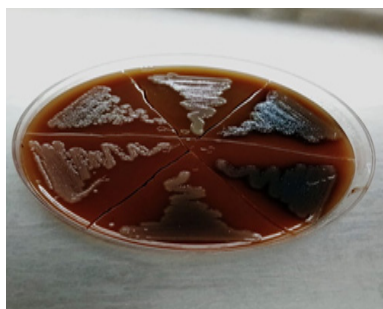
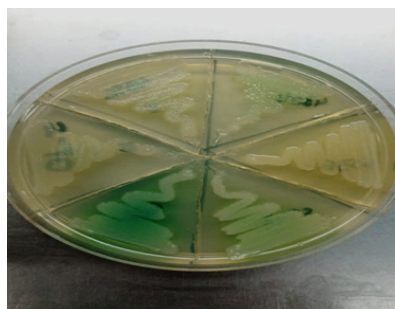


Figura 1. Cepas pigmentadas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 2. Varias cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Sangre.

ticularidad de transmitirla por vía directa. La contaminación alcanza la tierra, los alimentos y el agua, diseminándose luego a los hospedadores susceptibles a través del contacto cutáneo o por ingestas. Los microorganismos del género *Pseudomonas* pueden provenir de fuente humana o animal, lo que los define como agentes zoonóticos, de distribución mundial. No ha habido suficientes investigaciones que demuestran trazabilidad etiológica de la infección hospitalaria o ambulatoria, animal ni ambiental. Puede originar cuadros graves, agudos o hiperagudos con fiebre, septicemia meningitis e incluso mortalidad o cuadros crónicos cuya única sintomatología aparente es a nivel reproductivo. El diagnóstico de la enfermedad no es complejo. Debido a su fácil aislamiento, sus efectos sobre la producción del rebaño y por determinar enfermedad zoonótica, su control merece especial atención. Se hace necesaria la utilización de medidas complementarias, como tratamiento con antibióticos, elaboración de autovacunas y profilaxis higiénico-sanitaria, para evitar pérdidas de vida humana, animal y económicas.

Las cepas aisladas se caracterizaron fenotípicamente, los estudios complementarios epidemiológicos, y genómicos permitirán valorar aspectos genéticos - antigénicos serológicos y el comportamiento ante antimicrobianos de uso frecuente o nuevos útiles para proponer metodologías farmacológicas e inmunológicas que puedan dar respuesta a la salud pública y a la sanidad animal. Las cepas multi resistentes serán analizadas mediante métodos genómicos de detección específica y el conjunto de las cepas obtenidas por métodos genómicos y serológicos.

Al completar el estudio los resultados obtenidos permitirán analizar comparativamente los dos nosocomios. Así como las *P. aeruginosa* provenientes de la comunidad, de animales y del ambiente. Esto permitirá verificar las coincidencias o diferencias, de perfiles antimicrobianos fenotípicos y genotípicos. Así como detectar los serotipos o serovares actuantes en nuestro medio y promover la posibilidad de cotejar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos en pacientes enfermos. (información inédita en nuestro medio, que puede dar nuevas pautas para el abordaje inmunoproláctico preventivo de las infecciones nosocomiales y comunitarias). Este estudio además permitirá conocer la prevalencia de *P. aeruginosa* humana, canina, equina y bovina en los partidos de La Plata y Berazategui y establecer si existen diferencias significativas entre la cepas de origen humanos, animal y ambiental y a su vez conocer los factores epidemiológicos asociados en los casos a investigar.

Agradecimientos

A Analía Conte por las fotografías.

Bibliografía

Cagliada, María del Pilar; Ayala, Miguel Ángel; Carbone, Cecilia; Yamasaki, T. Control de *Pseudomonas aeruginosa* en una unidad productora de ratas y ratones SPF (Specific Pathogen Free) *Analecta Veterinaria*; 1995 vol. 15, no. 1-2 <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11067>

Linzitto O, Tunes M. Breve actualización sobre la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a diversos antimicrobianos. *REIE*.2014.9: 26 <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/90748>

Linzitto O, Tunes M. Infecciones Intrahospitalarias por *Pseudomonas aeruginosa* y resistencia antimicrobiana. *REIE* 2015, 10:7-8. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/92889>

Mariazzi, Aldo Amílcar; Prio, M.; Aguirre, Walter Gerardo; Dorta, Gleyre T.; Tobía, Marta B.; Gómez, Carlos Aislamiento y estudio de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de distinto origen. *Analecta Veterinaria*; 1971 vol. 3, no. 1-3 <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/10995>

Pantozzi, Florencia Laura; Copes, Julio Alberto; Martino, Pablo Eduardo; Stanchi, Néstor Oscar. Susceptibilidad antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de visones enfermos 2000 *Analecta Veterinaria*; vol. 20, no. 1 <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11110>

Tunes M., Sorgentini M, Perez S, Linzitto O. *Pseudomonas aeruginosa* en infecciones intrahospitalarias. I Congreso Panamericano de Zoonosis 2006-2007. *Magazine* 2008, 1.: 25-26

Tunes M, Sorgentini M, Pérez S, Linzitto OR. Incidencia de *Pseudomonas aeruginosa* en diversas patologías hospitalarias . REIE. 2008, 3:42. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/92070>

Tunes M, Pérez S, Sorgentini M, Linzitto OR. Evaluación de la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a antimicrobianos no carbapenemes. REIE. 2008, 3:43. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/92074>

Tunes M, Sorgentini M, Pérez S, Pacha A. Caracterización de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de infecciones intrahospitalarias. Jornada científico tecnológica 2009. FCV-UNLP. La Plata. Bs.As. Argentina.<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/77838>

Tunes M del L, Linzitto OR. Diferentes características de sensibilidad antimicrobiana e incidencia en patologías hospitalarias. III Congreso Internacional sobre Cambio Climático y Desarrollo Sustentable. ABCL 2012, Suplemento 1:75-76. <https://core.ac.uk/download/pdf/301091926.pdf>

Tunes M, Perez S, Sorgentini M, Pacha A, Linzitto O. Caracterización de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de infecciones. III Congreso Internacional sobre Cambio Climático y Desarrollo Sustentable. ABCL 2012, Suplemento 1:77.http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/92109/Educaci%C3%B3n_en_las_Enfermedades_Infecciosas_Emergentes_y_Reemergentes.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Tunes M, Pacha A, Fonrouge R, Linzitto O. Análisis comparativos de sensibilidad a los antibacterianos entre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de infecciones humanas y animales. III Congreso Internacional sobre Cambio Climático y Desarrollo Sustentable.. ABCL 2012, Suplemento 1:78-79. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/77840>

Tunes M, Linzitto O. *Pseudomonas aeruginosa*: análisis de diferentes características de sensibilidad antimicrobiana e incidencia en patologías hospitalarias. REIE. 2012,7: 23-25.<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/77835>