
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS AMBIENTALES ACUÁTICOS DE *Pseudomonas spp*

Martínez Silvia y Suárez Paula
Universidad Simón Bolívar
psuarez@usb.ve

Resumen

Los antibióticos constituyen mecanismos naturales usados por las bacterias para cumplir funciones de defensa y señalización. Sin embargo, se conoce poco sobre la resistencia a antibióticos en la gran mayoría de las bacterias en ambientes acuáticos. En esta investigación se presentan los resultados de la identificación bioquímica y el patrón de resistencia a antibióticos en trece aislados ambientales de muestras de agua. Los aislados se sembraron en agar Cetrimide y MacConkey para observar las características morfológicas de las colonias presuntivas de *Pseudomonas spp*. Cada aislado se identificó por pruebas bioquímicas usando el sistema semiautomatizado con antibiograma por el método de mínima concentración inhibitoria (MicroScan® DADE Behring). De trece aislados estudiados, ocho fueron identificados como *Pseudomonas aeruginosa* (96.72 a 99.99%), otros dos aislados fueron identificados como *Pseudomonas fluorescens/putida* (63.35 a 99.99%) y uno como *Escherichia coli* (99.58%). Los aislados fueron probados con 23 antibióticos utilizados frecuentemente para el tratamiento de patógenos clínicos representando un amplio espectro de aminoglucosidos, β -lactámicos, fluoroquinolonas y cefalosporinas. Los aislados identificados como *P. aeruginosa* resultaron sensibles a los aminoglucosidos, fluoroquinolonas y dos β -lactámicos (imipenem y meropenem), mientras que cinco de estos aislados mostraron tener beta-lactamasas inducibles (resistentes). Los dos aislados identificados como *P. fluorescens/putida* presentaron un 100% de sensibilidad a todos los antibióticos probados. Se ha reportado que la resistencia a los β -lactámicos en *p aeruginosa*, dependerá de la expresión de genes cromosomales que codifican para β -lactamasas y esta resistencia se ha encontrado en cinco de los trece aislados ambientales acuáticos aquí reportados.

Palabras clave: ambientes acuáticos, *Pseudomonas spp.*, resistencia a antibióticos, *beta-lactamasas* inducibles.

Introducción

Los antibióticos constituyen mecanismos naturales usados por las bacterias en sus sistemas ecológicos para cumplir funciones de defensa y señalización. La abundancia de antibióticos naturales parece ser baja y restringida a sus ambientes más cercanos y aún se conoce poco sobre la resistencia a antibióticos en la gran mayoría de las bacterias en ambientes acuáticos y de suelos [Allen *et al.*, (2010)]. El origen de los genes asociados con la resistencia es importante para entender la evolución y diseminación de la resistencia en microorganismos patógenos.

Los antibióticos utilizados en medicina para el tratamiento de infecciones y aquellos utilizados en agricultura para aumentar el crecimiento de animales y en prevención de enfermedades son liberados sin metabolizar a los ambientes acuáticos vía sistema de aguas servidas (Kummerer, 2004). Las investigaciones para detectar si ocurre o no transferencia de genes que codifican enzimas que confieren resistencia son limitadas; sin embargo se han detectado bacterias resistentes en los siguientes ambientes: efluentes de hospitales, plantas de tratamientos de aguas, aguas de ríos y lagos, agua potable y sedimentos. El objetivo de esta investigación fue realizar el aislamiento, identificación bioquímica y patrón de resistencia de un grupo de bacterias pertenecientes al banco de aislados ambientales acuáticos del Laboratorio de Microbiología acuática de la Universidad Simón Bolívar.

Materiales y Métodos

Purificación de las colonias ambientales

Trece (13) aislados de la colección se repicaron dos veces en medio *Cetrimide* y en LB. Se sembraron en medio *Cetrimide* y MacConkey para observar el crecimiento, formación de pigmento y las características morfológicas de las colonias. Se tomaron muestras a partir del medio *Cetrimide* y se sembraron en medio líquido LB, a las 24 horas se procedió a realizar la purificación por medio de la técnica de diluciones seriadas dentro del rango 10⁻¹ – 10⁻⁷.

Pruebas presuntivas

A las cepas purificadas se le hizo el test de la oxidasa con los discos Taxo Oxidasa (BBL) y las pruebas bioquímicas presuntivas de Kligler (fermentación de glucosa y lactosa) y los aminoácidos arginina, ornitina y lisina (Tabla 1).

Identificación y resistencia a antibióticos

Trece aislados fueron identificados por medio del sistema MicroScan® Dade Behring (Dadebehrig, 2005), semiautomatizado en el laboratorio clínico Hemalab de Caracas, el cual además de la identificación por género y especie arrojó el antibiograma del microorganismo por medio del método de mínima concentración inhibitoria (Figura 1; Tablas 1 y 2).

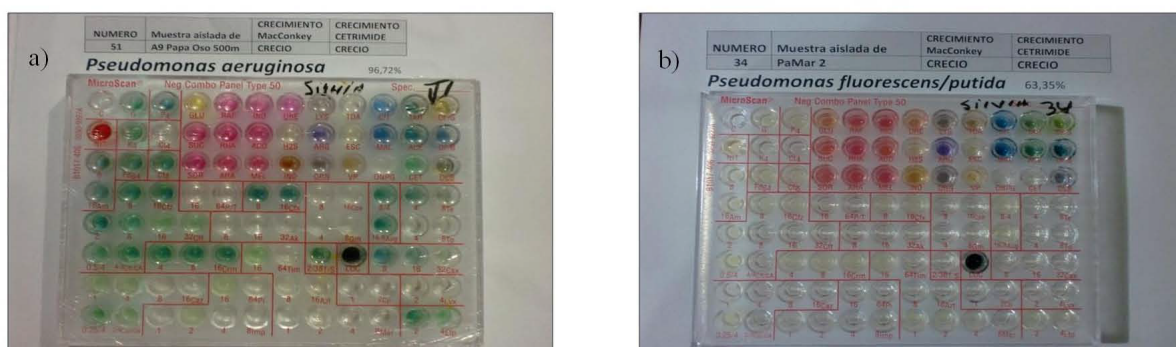


Figura 1. Panel de identificación para a) *Pseudomonas aeruginosa*; y b) *Pseudomonas fluorescens/pulida* por el método MicroScan® Dade Behring.

Resultados y Discusión

De trece (13) aislados estudiados, ocho (8) fueron identificados como *Pseudomonas aeruginosa* (96.72 a 99.99%), otros dos (2) aislados fueron identificados como *Pseudomonas fluorescens/putida* (63.35 a 99.99%) y uno (1) como *Escherichia coli* (99.58%), (Tabla 1). Dos (2) aislados no pudieron ser identificados con un porcentaje de confiabilidad aceptable (mayor a 95%). En la Figura 1, se muestran los paneles de identificación por el método MicroScan para dos (2) de los aislados identificados como pertenecientes al género *Pseudomonas*. Los aislados fueron probados con 23 antibióticos utilizados frecuentemente para el tratamiento de patógenos clínicos representando un amplio espectro de *aminoglucosidos*, β -*lactámicos*, *fluoroquinolonas* y *cefalosporinas*. En particular, los aislados identificados como *P. Aeruginosa*, dieron resultados contundentes para 11 antibióticos

(Tabla 2), resultando sensibles a los *aminoglucosidos*, *fluoroquinolonas* y dos β -*lactámicos* (*imipenem* y *meropenem*), mientras que cinco (5) de estos aislados mostraron tener *beta-lactamasas* inducibles (resistentes). Los dos (2) aislados identificados como *P. Fluorescens/putida* presentaron un 100% de sensibilidad a todos los antibióticos probados.

Tabla 1.- Identificación de aislados ambientales del Laboratorio de Microbiología Acuática por pruebas bioquímicas presuntivas y el método MicroScan® Dade Behring.

Identificación	Crecimiento en			Pruebas Bioquímicas				IDENTIFICACION MICROSCAN
	MacConkey	Cetrinide	Oxidasa	Kliger	L-Lisina	L-Arginina	L-Ornitina	
Sisipa	+	+	+	ALK/ALK	-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 96,72%
PaMar 2	+	+	ND	ALK/ALK	-	+	-	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> 63,35%
Pozo 2 Hig Dil 1	+	+	+	ALK/ALK	-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 96,72%
A3 285m	+	+	+	ND	-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 96,72%
A9 500m	+	+	+	ND	-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 96,72%
B521C71	+	+	+	ALK/ALK	-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 96,72%
B521C71 -Mn	+	+	+	ALK/ALK	-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99,99%
B521C71.2	+	+	+	ALK/ALK	-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99,99%
SB4	+	+	+	ALK/ALK	ND	ND	ND	<i>Vibrio fluvialis</i> 46,64%/ <i>Chromobacterium violaceum</i> 38,98%/ <i>V. damsela</i> 14,78 %
BPSPw1	+	+	+	ALK/ALK	ND	ND	ND	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99,99%
BPSPw2	+	+	+	ND	-	+	-	<i>Vibrio fluvialis</i> 46,64%/ <i>Chromobacterium violaceum</i> 38,98%/ <i>V. damsela</i> 14,78 %
ΔPhZ ½	+	+	+	ALK/ALK	ND	ND	ND	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> 99,99%
E3 Amigo	+	+	ND	ALK/ACID ⁺ 8	ND	ND	ND	<i>Escherichia coli</i> 99,58%

Tabla 2.- Resistencia a antibióticos de aislados ambientales identificados como *Pseudomonas* por el método MicroScan® Dade Behring.

Antibióticos	PA14 (CIM en mg/L)	Sisipa	Pozo 2 Hig Dil 1	A3 285m	A9 500m	B521C71	B521C7-mn	B521C7.2	BPSP w1
Amikacina	≤8	S	S	S	S	S	S	S	S
Aztreonam	≤8	IB	IB	IB	IB	IB	IB	IB	IB
Cefepima	≤8	S	S	S	S	S	S	S	S
Ceftazidima	4	IB	IB (<1)	IB (<1)	IB (<8)	IB (<4)	IB	IB (<1)	IB
Ciprofloxacina	≤1	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	≤4	S	S	S	S	S	S	S	I
Imipenem	≤1	S	S	S	S (<4)	S (<2)	S	S (<4)	S (2)
Levofloxacina	≤2	S	S	S	S	S	S	S	S
Meropenem	≤1	S	S	S	S	S	S	S	S
Piperacilina/ Tazobactam	≤16	IB	IB	IB	IB	IB	IB	IB	IB
Tobramicina	≤4	S	S	S	S	S	S	S	S

S: Sensible; R: Resistente; IB: Betalactamasa Inducible; I: Intermedio

Las *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de ambientes acuáticos, pueden desarrollar mecanismos de resistencia antibióticos por adquisición de genes de resistencia que se encuentran en elementos móviles como los plásmidos, o a través de un proceso mutacional que altera la expresión y/o función de mecanismos de defensa codificados por cromosomas [Lister *et al.*, (2009)].

Los aislados identificados como *P. aeruginosa* (Tabla 1) mostraron sensibilidad a la mayoría de los antibióticos a los que fueron expuestos; no obstante, presentan resistencia los β -lactámicos (Tabla 2). Probablemente el mecanismo de resistencia a estos antibióticos dependerá de la expresión de los genes *cromosomales* que codifican para β -lactamasas. De acuerdo con Martínez (2009) “todas las especies de *P. aeruginosa* contienen genes *cromosomales* que codifican para las enzimas β -lactamasas para que los β -lactámicos no sean capaces de cumplir su acción principal que es la de interrumpir la síntesis de la pared bacteriana. Es interesante observar que

aun cuando se trata de cepas recogidas en sitios geográficamente dispersos, las mismas presentan los mismos patrones de antibiograma”, (Tablas 1 y 2).

Referencias Bibliográficas

- Allen, Donato, J.; Huimi, H.; Cloud-Hansen, K.; Davies, J.; Handelsman, J. (2010). Call of the Wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature reviews Microbiology*. 8:251-259.
- DadeBehring. (2005). Manual de Procedimiento MicroScan®.
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 311-320.
- Lister, P.; Wolter, D.; Hanson, N. (2009). Antibacterial resistant *P. aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Review*. 22(4): 582-610.
- Martínez, J. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society*. 276:2521-2530.