

UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA AMBIENTAL



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS
CLINICOS Y AMBIENTALES DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

FERMIN MEJÍA

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL
GRADO DE MAESTRO EN MICROBIOLOGIA AMBIENTAL**

PANAMA REPUBLICA DE PANAMA

2009



Vicerrectoria de Investigacion y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnologia
Programa de Maestria en Microbiologia Ambiental

TESIS

Sometida por optar al titulo de Maestria en Microbiologia Ambiental

el Estudiante Fernan Mejia Cedula 8 452 696

Titulo de la Tesis

“CARACTERIZACION FENOTIPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE
Pseudomonas aeruginosa”

APROBADO POR

Doctora Nora de Moreno
Presidenta

Doctora Oris Sanjur
Miembro

Profesora Margarita Cornejo
Miembro

REFRENDADO POR.

REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FECHA

INDICE GENERAL	I
INDICE DE CUADROS	IV
INDICE DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
AGRADECIMIENTO	VIII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
CAPITULO I (Revisión Bibliográfica)	11
1 1 Generalidades de las <i>Pseudomonas</i>	12
1 1 1 Características Morfológicas del Genero <i>Pseudomonas</i>	12
1 1 2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
a) Estructura celular y metabolismo	15
b) Estructura del genoma y variabilidad genética	18
c) Ecología	21
d) Patogenicidad y factores de virulencia	23
e) Sistema sensor de quorum	24
f) Sistemas de dos componentes	25
g) Aplicaciones biotecnológicas	26
1 2 Antibióticos Utilizados en el Estudio	27
1 2 1 Antibióticos β lactámicos	27
a) Penicilinas	27
b) Cefalosporinas	28
c) Monobactams	28
d) Carbapenemas	28
e) Inhibidores de beta lactamasas	29
1 2 2 Antibióticos Producidos por Procarionotas	30
a) Aminoglicosidos	30

b) Tetraciclinas	30
1 2 3 Antibioticos Sinteticos	31
a) Quinolonas	31
1 3 Mecanismos de Resistencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1 3 1 β lactamasas	32
1 3 2 Bombas de expulsion	34
1 3 3 Porinas de membrana	36
1 3 4 Otros mecanismos	37
1 3 5 Resistencia Natural	38
1 3 6 Fuentes de los Antibioticos en el Ambiente	41
a) Aguas servidas	41
b) Desechos medicos y produccion	42
c) Productos caseros	42
d) Agricultura y produccion animal	42
1 3 7 Mecanismos de Dispersion de la Resistencia a Antibioticos	43
a) Conjugacion	44
b) Transduccion	44
c) Transformacion	44
1 4 Secuencias Repetitivas y Caracterizacion Molecular	45
CAPITULO II (Materiales y Metodos)	49
2 1 Origen y Aislamiento de las Cepas	50
2 1 1 Cepas clinicas	50
2 1 2 Cepas ambientales	50
2 2 Metodos de Conservacion	51
2 2 1 Conservacion a corto plazo	51
2 2 2 Conservacion a largo plazo	51
2 3 Identificacion Bioquimica a Nivel de Especie	51
2 4 Sensibilidad a Agentes Antimicrobianos	52
2 5 Indice de Resistencia Multiple	53

26	Técnicas de Tipado	54
261	<i>Enterobactenal repetitive intergenic concensus</i> (ERIC PCR)	54
262	Electroforesis	55
263	Análisis de geles	55
27	Análisis Estadístico	56
CAPITULO III (Resultados y Discusión)		62
31	Resultados	63
311	Análisis de resistencia a antibióticos	63
312	Comparación de los diámetros de inhibición	64
313	Índice de resistencia múltiple a antibióticos (IRMA)	66
314	Divergencia genética	67
32	Discusión	87
CAPITULO IV (Conclusiones y Recomendaciones)		95
41	Conclusiones	96
42	Recomendaciones	98
BIBLIOGRAFÍA		100
ANEXOS		112

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 1	Propiedades fenotípicas útiles para la identificación de <i>P aeruginosa</i>	14
Cuadro 1 2	Factores de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
Cuadro 1 3	Características de los antibióticos usados en este estudio	33
Cuadro 3 1	Fenotipos de resistencia de 50 cepas de <i>P aeruginosa</i> frente a 8 diferentes clases de antibióticos	70
Cuadro 3 2	Porcentaje de cepas <i>P aeruginosa</i> resistentes a 8 clases de antibióticos según la fuente de los aislamientos	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 1	Mapa genómico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	19
Figura 1 2	Quorum sensing en <i>P. aeruginosa</i>	29
Figura 1 3	Esquema del mecanismo de las bombas de expulsión	37
Figura 1 4	Esquema porina OprD en la membrana externa de <i>P. aeruginosa</i>	38
Figura 1 5	La secuencia ERIC	47
Figura 1 6	Los cebadores ERIC 1R y ERIC 2	48
Figura 1 7	Patrón de bandas generado por la amplificación de secuencias repetitivas	48
Figura 2 1	Crecimiento sobre membrana filtrante en el medio m PA c (a) Prueba de hidrólisis de la caseína (b)	58
Figura 2 2	Hidrólisis de la acetamida	59
Figura 2 3	Protocolo de identificación mediante API 20NE	60
Figura 2 4	Sistema de identificación bioquímica API 20NE	61
Figura 3 1	Distribución del porcentaje de aislamientos resistentes de cepas ambientales y clínicas según el número de antibióticos	71
Figura 3 2	Comparación de los diámetros de inhibición de las cepas ambientales y clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiótico Ciprofloxacina	72
Figura 3 3	Comparación de los diámetros de inhibición de las cepas ambientales y clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiótico Gentamicina	73
Figura 3 4	Comparación de los diámetros de inhibición de las cepas ambientales y clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiótico Carbenicilina	74
Figura 3 5	Comparación de los diámetros de inhibición de las cepas	

ambientales y clinicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiotico Aztreonam	75
Figura 3 6 Comparacion de los diametros de inhibicion de las cepas ambientales y clinicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiotico Ticarcilina Ácido clavulanico	76
Figura 3 7 Comparación de los diametros de inhibición de las cepas ambientales y clinicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiotico Tetraciclina	77
Figura 3 8 Comparación de los diámetros de inhibicion de las cepas ambientales y clinicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiotico Ceftazidima	78
Figura 3 9 Comparacion de los diametros de inhibicion de las cepas ambientales y clinicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiotico Imipenem	79
Figura 3 10 Comparacion del indice de resistencia multiple entre los aislamientos clinicos y ambientales	81
Figura 3 11 Comparacion del indice de resistencia multiple entre los aislamientos de las diferentes fuentes ambientales	82
Figura 3 12 Comparación de los indices de resistencia multiple entre los aislamientos ambientales de playa La Angosta y las cepas de origen clinico	83
Figura 3 13 Patrón de bandas de cepas clinicas obtenidas mediante ERIC PCR	84
Figura 3 14 Patron de bandas de cepas ambientales obtenidas mediante ERIC PCR	84
Figura 3 15 Dendrograma tipo UPGMA de los resultados de ERIC PCR para todos los aislamientos ambientales y clinicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	85
Figura 3 16 Matriz de niveles de similitud de las diferentes cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
API	<i>Analytical Profile Index</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATM	aztreonam
BLEE	beta lactamasas de espectro extendido
CAZ	ceftazidima
CB	carbenicilina
CIM	concentración inhibitoria mínima
CIP	ciprofloxacina
CN	gentamicina
EDTA	<i>ethylene-diamine tetracetic acid</i>
ERIC	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
FM	filtro de membrana
HSL	homoserina lactona
IMP	imipenem
IRMA	índice de resistencia múltiple a antibióticos
LPS	lipopolisacárido
OprD	porina D
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBP	<i>peniciline binding protein</i>
PCR	<i>polimerase change reaction</i>
REP	<i>repetitive extragenic palindromic</i>
SOD	superóxido dismutasa
TBE	tris borato EDTA
TE	tetraciclina
TIM	ticarcilina/ácido clavulánico
UPGMA	<i>unweighted pair group method using arithmetic averages</i>

Agradezco en primer lugar a la Secretaria Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (SENACYT) por el financiamiento de este proyecto a través del Programa de Estimulo a las Actividades de Ciencia y Tecnología. También agradezco de manera muy particular a la Dra. Nora de Moreno, quien en su papel de tutora me brindó la orientación necesaria para la realización de este trabajo.

Asimismo agradezco a la Dra. Oris Sanjurjo del Instituto Smithsonian por su gran ayuda y orientación en el análisis de biología molecular, empujando en este proyecto al Profesor Ivan Luna por su ayuda en el análisis estadístico de los datos, y a las Profesoras Margarita Cornejo y Blanca de Hernández por su colaboración en la revisión del texto.

Finalmente agradezco a todas aquellas personas que de un modo u otro me brindaron su ayuda para hacer posible la culminación de esta tesis. A todos muchas gracias.

RESUMEN

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que se comporta como un patógeno nosocomial oportunista y se caracteriza por tener resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos. En este estudio se comparó el patrón de susceptibilidad antimicrobiana de 50 aislamientos de *P. aeruginosa* (25 cepas clínicas y 25 ambientales) frente a ocho antibióticos por el método de difusión en agar. También se comparó el índice de resistencia múltiple a antibióticos para todas las cepas según la fuente de aislamiento. Además, los aislamientos fueron caracterizados molecularmente mediante la técnica de ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR) para obtener la huella digital genética y así determinar la divergencia entre los distintos aislamientos. En el análisis de resistencia se pudieron observar 24 antibióticos diferentes. Los aislamientos clínicos resultaron significativamente más resistentes que los ambientales, excepto a gentamicina ($P = 0.625$) y a ticarcilina/ácido clavulánico ($P = 0.648$). Además, se observó que todos los aislamientos ambientales fueron susceptibles a ciprofloxacina e imipenem. Por otro lado, el índice de resistencia múltiple también resultó significativamente más bajo para los aislamientos ambientales ($P = 0.003$). Sin embargo, esta herramienta mostró que los aislamientos ambientales provenientes de playa eran similares a los aislamientos clínicos ($P = 0.3699$) tal vez por ser una playa muy concurrida. Por otro lado, el análisis de ERIC-PCR permitió diferenciar 21 clones agrupados en 12 grupos clonales (similitud >90%) y tres aislamientos que presentaron patrones únicos de bandeo. Estos resultados muestran que no había relación entre el patrón de bandas obtenido por PCR y los perfiles de resistencia, pues dentro de un mismo grupo clonal se encontraban diferentes antibiótipos. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de los aislamientos clínicos (80%) no se encontraran entre las muestras ambientales parece indicar que la transferencia horizontal de genes y los rearrreglos a nivel del genoma son la principal causa de las diferencias fenotípicas observadas entre ambas poblaciones.

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is a rod that exhibits a nosocomial pathogenic opportunist pattern and characteristically has an intrinsic resistance to multiple antibiotics. With the underlying objective of comparing the antimicrobial sensitivity profiles of populations originating from clinical and environmental samples, this study was designed to analyze the sensitivity profiles of 50 *P. aeruginosa* isolates belonging to 25 clinical and 25 environmental strains respectively employing the agar diffusion method. Also the multiple antibiotic resistance index (MAR Index) for eight different antibiotics were obtained. PCR fingerprints were obtained using *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) PCR to determine the genetical divergence of the isolates obtained from both groups. Twenty four different antibiotypes were observed with the antibiotic resistance analysis. The clinical isolates were significantly more resistant to the antibiotics with the exception of gentamicine and the ticarcilene/clavulanic acid for which they had no significance difference ($P = 0.625$ and $P = 0.648$ respectively). Also sensitivity to ciprofloxacin and imipenem were observed in all the environmental isolates. MAR Index were significantly lower for that group ($P = 0.003$). However, this tool showed that the environmental isolates from a beach which is too visited had similarity with clinical ones ($P = 0.3699$). On the other hand, twenty one clones were clustered in twelve clonal groups (similarity >90%) using ERIC PCR analysis and three isolates exhibited unique bands pattern. This results show that it had no relation between the bands pattern and the resistance profile because they were found that different antibiotypes were belonging to the same clone. However, eighty percent of clinical isolates were not found in the environmental samples. This suggests that horizontal transfer of genes and genome level rearrange were the principal cause of the phenotypical difference observed in both environmental and clinical populations.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram negativo no fermentador ampliamente relacionado con la infección nosocomial. Este tipo de infecciones se presentan en pacientes severamente comprometidos hospitalizados especialmente en unidades de cuidado intensivo donde existe una alta presión de selección de resistencia por parte de los antibióticos. Es una de las bacterias más importantes en el ámbito de la multirresistencia a antibióticos. Las infecciones por *P. aeruginosa* son raras en pacientes inmunocompetentes sin embargo cuando se alteran las barreras normales de la piel y mucosas puede actuar como patógeno primario (Zambrano & Herrera 2004, Moya et al 2003).

P. aeruginosa es un bacilo recto gram negativo no esporulado que requiere oxígeno para su crecimiento. También puede respirar anaeróbicamente utilizando nitrato como aceptor alternativo de electrones. Perteneció a la clase *gamma* de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias (Woese 1987) pero a diferencia de estas su metabolismo es no fermentativo (Salyers & Whitt 1994).

Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. *P. aeruginosa* que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Hardalo & Edberg 1997). Se pueden aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, redes de distribución (Leclerc 2003, Geldreich 1996) así como de plantas y animales. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para su crecimiento. Tal capacidad le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros

organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de cepas de *P aeruginosa* en ambientes tan inhóspitos como lo son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y jabón (Hardalo & Edberg 1997).

P aeruginosa representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados (Moya *et al* 2003). Una vez que se establece la infección *P aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no solo daño tisular extenso sino que además interfieren con el funcionamiento del sistema inmune (Doring *et al* 1987, Nikas & Iglewski 1985). Entre las proteínas que intervienen en la infección de *P aeruginosa* encontramos toxinas como la exotoxina A que tiene un mecanismo similar a la toxina de la difteria y causa daño tisular, y la exotoxina S que es una exoenzima ribosilante del ADP cuyo efecto final como factor de virulencia consiste en prevenir la fagocitosis (Salyers & Whitt 1994). También posee enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones por *P aeruginosa* ya que debido a la baja permeabilidad de las porinas de su membrana externa presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes (Hardalo & Edberg 1997, Nikaido 1998).

Por otra parte, en ambientes acuosos esta bacteria se adhiere a superficies produciendo una biopelícula (Leclerc 2003). La formación de estos cúmulos de bacterias y material extracelular representa un problema de salud pues contamina dispositivos que se implantan dentro del cuerpo como por

ejemplo dispositivos intrauterinos catéteres o valvulas cardiacas (Costerton 1980) Las biopelículas tambien representan un problema en el proceso de produccion de diversas industrias pues provocan taponamiento y corrosion de conexiones y filtros Ademas proveen un ambiente protector adicional a la bacteria ya que se constituyen en barreras contra los antibioticos y otros agentes antimicrobianos (Madigan *et al* 2006) Asimismo *P aeruginosa* presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeracion (Hardalo & Edberg 1997)

Una de las características de las bacterias del genero *Pseudomonas* es su gran capacidad para catabolizar distintos hidrocarburos aromaticos y alifáticos Esta característica generalmente esta codificada en plasmidos llamados catabólicos que casi siempre se encuentran en cepas de *P putida* y rara vez en *P aeruginosa* En el caso de esta ultima bacteria su enorme versatilidad metabolica parece deberse al gran numero de genes cromosomales que codifican enzimas con actividades novedosas (Stover *et al* 2000) Los plasmidos que se presentan en *P aeruginosa* codifican para resistencias a antibioticos (Haas & Holloway 1976) o a metales y su extensa distribucion representa un problema clinico

Todo esto aunado al hecho del uso indiscriminado de antibioticos en diversas practicas incluyendo las medicas veterinarias y agricolas ha resultado en una presión selectiva sobre las bacterias contribuyendo a la seleccion de microorganismos con patrones de resistencia a antibioticos (Al Jebouri 1985 Andersson & Levin 1999 Aarestrup & Wegener 1999 van den Bogaard &

Stobbergh 1999 Wolff 2004) es decir la capacidad adquirida por un microorganismo para resistir los efectos de un antibiotico ante el que normalmente es susceptible La presencia y persistencia de bacterias resistentes a antibioticos ha sido descrita en diferentes ambientes incluyendo suelos (Galland *et al* 2001) agua superficial y potable (Gallardo *et al* 1999 Sayah *et al* 2005) y alimentos (Saldar & Armstrong 2003) y representa un creciente problema de Salud Publica La alarma se esta haciendo cada vez mas generalizada sobre todo desde que se han aislado varias cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina en hospitales de distintos lugares del planeta (Mella 2002 Tiwari & Sen 2006) Tambien se han aislado cepas de *Enterococcus faecalis* *Mycobacterium tuberculosis* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a todos los antibioticos disponibles en clinica (Levy 1998)

La incidencia de cepas de *P aeruginosa* resistentes a diferentes antibioticos es muy variable en America Latina Un estudio revelo una incidencia de 7% en casos de bacteremia 25% en neumonia 12% en casos de herida quirurgica y 8% en casos de infecciones del tracto urinario entre 1997 y 1999 (Sader 2002) Ademas un informe de la OPS con porcentajes que van desde menos del 10% a mas del 80% en pacientes hospitalizados y ambulatorios (OPS 2006) Sin embargo dicho informe aun no incluye a Panama ya que aunque las pruebas de sensibilidad se hacen de manera rutinaria en los centros hospitalarios aun se carece de una base de datos completa que revele como es la incidencia de cepas resistentes en este pais Y mas aun no existen datos de

cepas aisladas del ambiente extrahospitalario. De modo que no se conoce como se comporta el patrón de susceptibilidad antimicrobiana de *P. aeruginosa* en cepas de origen ambiental ni que relación tienen estas con las de ambiente intrahospitalario.

Con la finalidad de conocer la posible presencia de cepas resistentes y la magnitud de este problema, se propone en esta investigación determinar la sensibilidad antimicrobiana en una población de cepas de *P. aeruginosa* tanto de origen clínico como de origen ambiental, y si existe relación entre la divergencia genética de las cepas ambientales con las cepas hospitalarias, lo cual permitiría obtener una información muy importante para las entidades de salud responsables de la vigilancia epidemiológica tanto a nivel local como regional.

OBJETIVOS

A Objetivos Generales

- 1 Comparar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de *P aeruginosa* en cepas provenientes de muestras ambientales y de origen clínico
- 2 Determinar el nivel de divergencia genética que existe entre las cepas mediante caracterización molecular por ERIC PCR

B Objetivos Específicos

- 1 Obtener aislamientos ambientales de *P aeruginosa*
- 2 Caracterizar bioquímicamente los aislamientos mediante API 20NE
- 3 Realizar la prueba de susceptibilidad a antibióticos por difusión en agar (Kirby Bauer) a los diferentes aislamientos
- 4 Analizar los resultados de los patrones de susceptibilidad de los diferentes grupos estudiados
- 5 Determinar el índice de resistencia múltiple a antibióticos para cada aislamiento y compararlos según la fuente del aislamiento
- 6 Obtener una huella digital molecular de las cepas mediante el uso de cebadores para la secuencia ERIC de 124-127 pares de bases
- 7 Analizar los resultados de la amplificación
- 8 Comparar el análisis de susceptibilidad antimicrobiana con la caracterización molecular de las cepas

1 1 2 *Pseudomonas aeruginosa*

Es un bacilo gram negativo aerobio productor de oxidasa y catalasa móvil gracias a la existencia de un flagelo polar. Produce varios tipos de pigmentos hidrosolubles siendo los más frecuentes la piocianina y la pioverdina. También puede llevar a cabo respiración anaeróbica utilizando nitrato como aceptor alternativo de electrones. Pertenece a la clase *gamma* de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias (Woese 1987) pero a diferencia de estas su metabolismo es no fermentativo (Salyers & Whitt 1994).

P. aeruginosa es una bacteria ubicua presentando especial afinidad por los humedos. Se pueden aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, redes de distribución (Leclerc 2003, Geldreich 1996) así como de plantas y animales. En seres humanos, los pliegues de la piel donde la humedad es más frecuente y el conducto auditivo externo son las regiones donde la colonización por esta bacteria es más común. Requiere mínimas condiciones y resiste elevadas concentraciones de sal, colorantes, antisépticos poco activos y a muchos de los antibióticos utilizados habitualmente (Gobernado 1998). Con estas características es comprensible que *P. aeruginosa* sea una causa importante de infección nosocomial (Cao *et al* 2004).

Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para su crecimiento (Ohkawa *et al* 1979, Nawas & Chapatwala 1991, Kim *et al* 2003). Tal capacidad le permite colonizar nichos en

los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y jabón (Hardalo & Edberg 1997). El cuadro 1.1 resume las principales características fenotípicas de *P. aeruginosa*.

Cuadro 1.1 Propiedades fenotípicas útiles para la identificación de *P. aeruginosa*

Característica	Resultado	Comentario
Flagelación	monotrico	
Crecimiento a 41 C	+	
Pirocianina	+	no es universal
Pigmento fluorescente	+	no es universal
Desnitrificación	+	
Gelatinasa	+	
Lecitinasa		
Hidrólisis de tween 80	+	débil y retardada
Crecimiento en acetamida	+	
Crecimiento en geraniol	+	lento

Tomado de Palleroni 1992

Las manifestaciones cutáneas de las infecciones por *P. aeruginosa* abarcan un gran número de procesos de muy diverso pronóstico. En personas sanas no es frecuente que invadan tejidos, a no ser que penetren en la piel a través de una herida o fisura donde se den condiciones de humedad y/o maceración. La foliculitis por *P. aeruginosa* en personas jóvenes sanas se ha descrito entre los que frecuentan baños en aguas contaminadas (saunas, baños

termales jacuzzis piscinas etc) (Berger & Seifert 1990) emplean esponjas colonizadas y también casos tras una depilación ya que la dilatación de los poros facilita la penetración de la bacteria en la piel (Gimenez Garcia *et al* 2005) También se han reportado casos de absceso corneal por uso de lentes de contacto (Fernandez del Coto *et al* 2005)

Por su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas se comporta como un patógeno oportunista eficaz. Su papel como patógeno responsable de infecciones comunitarias y nosocomiales está plenamente reconocido y resulta problemática la elección del antimicrobiano más adecuado. Esto se debe a que posee una elevada resistencia intrínseca a múltiples antibióticos y a una extraordinaria capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia principalmente por mutaciones (Losch *et al* 2004)

a) Estructura Celular y Metabolismo Ya que *P. aeruginosa* es una bacteria gram negativa tiene una membrana externa que contiene una proteína conocida como Proteína F o OprF. Esta funciona como una porina que permite a ciertas moléculas y iones entrar a la célula y como proteína estructural que mantiene la forma de la célula bacteriana. Debido a su límite de exclusión de 500 Da OprF reduce la permeabilidad de la membrana externa una propiedad muy beneficiosa pues reduce la asimilación de sustancias peligrosas dentro de la célula y le da a *P. aeruginosa* una alta resistencia a antibióticos (Gotoh *et al* 1989 Woodruff & Hancock 1989)

P. aeruginosa usa un simple flagelo polar que le permite moverse en los alrededores y exhibir quimiotaxis. Las cepas tienen flagelo tipo A o tipo B, una clasificación basada en el tamaño y la antigenicidad de la subunidad de flagelina. El flagelo es muy importante durante los estadios tempranos de la infección para poder anclarse e invadir el tejido del hospedero. De manera similar, el pili contribuye grandemente a su habilidad para adherirse a las superficies mucosas y epitelio celular. Específicamente es la punta del pili la que es responsable de la adherencia a la superficie de la célula del hospedero. *P. aeruginosa* tiene N metil fenilalanina (NmePhe) o pili tipo IV (Lederberg 2000). Los pili se caracterizan por ser largos filamentos polares constituidos de homopolímeros de una proteína llamada pilina que es codificada por el gen *pilA*. Por consiguiente se puede afirmar que el flagelo y el pili de *P. aeruginosa* tienen similitud tanto de manera funcional (para anclarse) como estructural (ambos son estructuras filamentosas en la superficie de la célula) (Lederberg 2000).

Cuando *P. aeruginosa* se infecta el tejido del hospedero, sufre privación del hierro por parte de este último como un mecanismo de defensa. Para superar esto, *P. aeruginosa* sintetiza dos sideróforos: pioquelina y procianina (Salyers & Whitt 1994; Coxt et al 1981). *P. aeruginosa* secreta entonces estos sideróforos al exterior de la célula, en donde se adhieren al hierro y lo traen de vuelta al interior de la célula. Adicionalmente, *P. aeruginosa* puede también utilizar hierro a partir de enterobactina, un sideróforo especial producido por *E.*

coli para transporte de hierro para satisfacer esta necesidad (Rutz *et al* 1991 Fischbach *et al* 2006)

Como ya se menciona *P aeruginosa* es un anaerobio no estricto Gana energía mediante transferir electrones a partir de glucosa un sustrato reducido a oxígeno el aceptor final de electrones El desdoblamiento de la glucosa requiere su oxidación a gluconato en el periplasma entonces será traído al interior de la membrana interna por un sistema de asimilación de gluconato dependiente de energía Una vez dentro el gluconato es fosforilado a 6 P gluconato el cual entrara en el metabolismo central para producir energía para la célula Cuando *P aeruginosa* esta en condiciones anaerobias usa nitrato como aceptor terminal de electrones (Madigan *et al* 2006) Bajo condiciones de baja tensión de oxígeno sintetiza la enzima superóxido dismutasa (SOD) que contiene hierro o manganeso que cataliza el muy reactivo O_2^- a H_2O_2 y O_2 También detoxifica el H_2O_2 a O_2 y H_2O mediante la enzima catalasa (Lederberg 2000)

En contraste con su limitada habilidad para crecer en azúcares *P aeruginosa* puede utilizar una amplia variedad de otros compuestos orgánicos y su genoma contiene las bases moleculares de su versatilidad metabólica Además de las conocidas enzimas y vías oxidativas se encuentra un sustancial número de otros genes que codifican para enzimas putativas características de beta oxidación tales como acil CoA deshidrogenasa (25 genes) y enoil CoA hidratasa/isomerasa (16 genes) En contraste *E coli* contiene cuatro genes para acil CoA deshidrogenasa y siete para enoil CoA hidratasa/isomerasa Con

excepción de *M tuberculosis* ningun otro genoma secuenciado contiene un numero tan grande de estas enzimas. Los genes *beta*-oxidativos están organizados con otros genes que codifican para proteínas que podrian tener funciones relacionadas tales como acil CoA tiolasas, deshidrogenasas de cadena corta, flavin monooxigenasas u otras oxidoreductasas (Stover *et al* 2000)

b) Estructura del Genoma y Variabilidad Genética En el año 2000 se completo el secuenciamiento del genoma de la cepa PA01. El tamaño aproximado del unico cromosoma circular que forma el genoma de esta bacteria es de cerca de 6.3 millones de pares de bases (Figura 1.1). Este genoma es grande comparado con otros genomas bacterianos. La cepa PA01 que fue secuenciada no contiene plásmidos al igual que muchos otros aislamientos de *P aeruginosa* (Stover *et al* 2000)

Más de la mitad de los genes de *P aeruginosa* PA01 presentan una homología cercana y un arreglo transcripcional en operones similar a los de *Escherichia coli*. También es aparente que *P aeruginosa* presenta homología en la secuencia y en la organización genética con bacterias ambientales (Nelson *et al* 2002) incluso con bacterias gram positivas. El 32% de los genes predichos a partir de la secuencia del genoma de esta bacteria no tienen homología con las secuencias depositadas en los bancos de datos lo que sugiere que se trata de genes que codifican para actividades enzimáticas novedosas. Del análisis del genoma de esta bacteria es notorio la gran

abundancia de genes que parecen codificar para bombas que sacan compuestos de la célula (Stover *et al*, 2000). La abundancia de estos transportadores pudiera estar relacionada con su alta resistencia a distintos compuestos tóxicos (Nikaido, 2003) y, en última instancia, con su extraordinaria versatilidad.

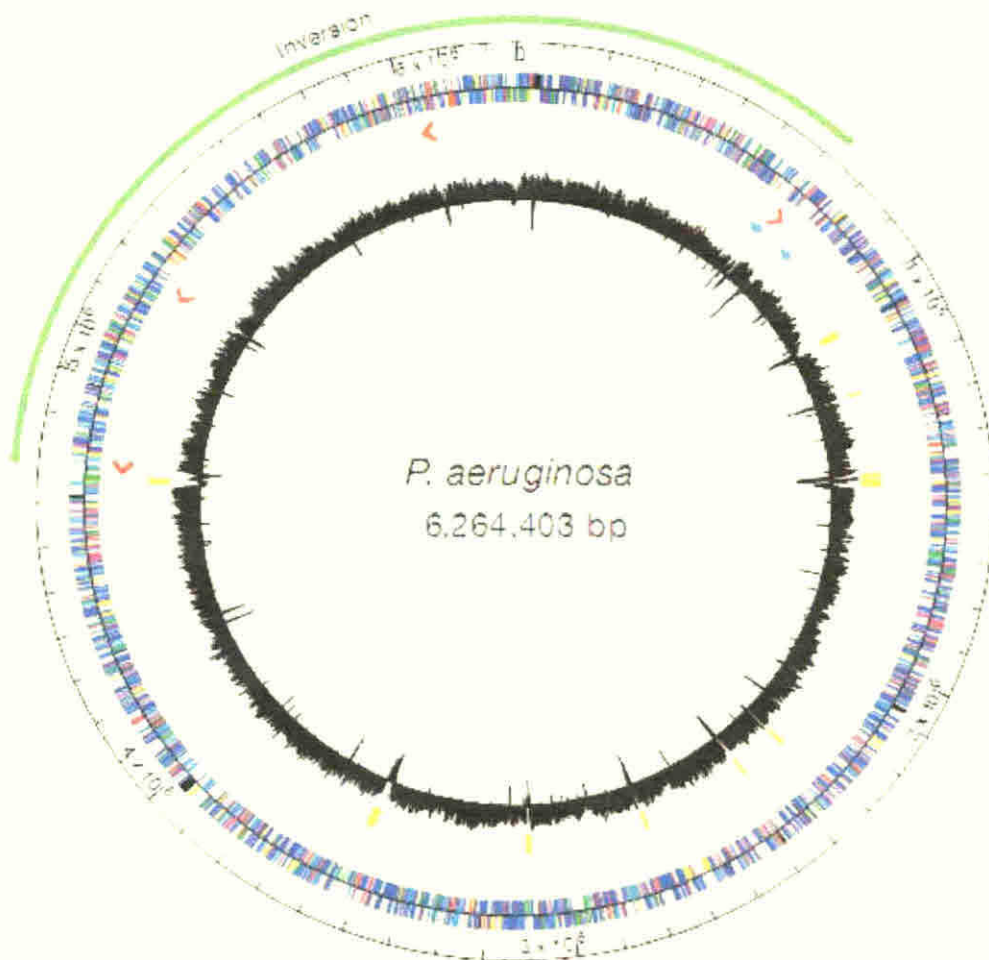


Fig. 1.1. Mapa genómico de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (tomado de Stover *et al*, 2000).

A diferencia de lo que ocurre con otras bacterias patógenas no existen clones de *P. aeruginosa* asociados con el desarrollo de una enfermedad en particular por lo que la frecuencia de los distintos clones es la misma entre los aislamientos ambientales y clínicos (Romling *et al* 1994) Sin embargo existe una gran variabilidad genética entre distintos aislamientos de esta bacteria aun aisladas en la misma región y se ha encontrado una alta frecuencia de rearrreglos genéticos (Romling *et al* 1997)

El tamaño del genoma de distintas cepas de *P. aeruginosa* varía entre 5 y 7 millones de pares de bases y comprende un mosaico de genes específicos de la especie que va del 70 al 90% de la secuencia de ADN de una cepa. Esta proporción varía de acuerdo con la cantidad de información accesoria que cada cepa tiene pero el orden de los genes propios de la especie está conservado entre todos los aislamientos. Estos bloques de ADN se interrumpen por secuencias específicas de cada cepa que pueden ser de entre 1 a 200 kb. La secuencia de los genes comunes está altamente conservada entre los distintos aislamientos de esta bacteria a excepción del gene *pilA* que codifica para la fimbria tipo IV y que presenta un gran polimorfismo. De hecho la variabilidad de las secuencias específicas de *P. aeruginosa* es 10 veces menor que la que presentan distintas cepas de *E. coli* o *Salmonella* lo que sugiere una alta tasa de recombinación entre la población de esta bacteria (Kiewitz & Tummler 2000 Pirnay *et al* 2002). La alta frecuencia de recombinación entre los distintos clones comparada con la relativamente menor tasa de mutación espontánea mantiene una información genética común

a toda la especie. De este modo *P. aeruginosa* tiene una parte de su genoma altamente conservada y una proporción menor pero significativa que es distinta en cada clon de esta bacteria (Liang *et al* 2001)

c) Ecología Esta bacteria ha sido caracterizada como un microorganismo cosmopolita. Esta versatilidad se debe en gran medida por la gran cantidad de enzimas que le permiten usar una diversidad de sustancias como nutrientes. Una de las características de las bacterias del género *Pseudomonas* es su gran capacidad para catabolizar distintos hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Nawas & Chaptawala 1991). Esta característica generalmente está codificada en plasmidos llamados catabólicos que casi siempre se encuentran en cepas de *P. putida* y rara vez en *P. aeruginosa*. En el caso de esta última, su enorme versatilidad metabólica parece deberse al gran número de genes cromosomales que codifican enzimas con actividades novedosas (Stover *et al* 2000). Los plasmidos que se presentan en *P. aeruginosa* codifican además para resistencias a antibióticos o a metales (Haas & Holloway 1976). Se ha reportado su capacidad para acumular intracelularmente o en matrices mucilaginosas metales como la plata, cobre, cadmio e incluso uranio (Roane *et al* 1996).

Usualmente se le detecta en reservorios de agua contaminada de fuentes animales y humanas. De hecho, se le considera un indicador complementario a coliformes totales y fecales en aguas y está más asociado, en comparación con los coliformes, a residuos fecales humanos más que de animales. Su hallazgo

en balones de agua destilada y su presencia en reservorios de agua potable incluso en concentraciones más altas que las detectadas en las redes de distribución ha sido atribuido a la posible multiplicación y mayor supervivencia en comparación con las demás bacterias comúnmente encontradas en el agua. Se ha demostrado que *P. aeruginosa* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en aguas tratadas ya que es capaz de resistir los efectos del cloro residual por lo que su presencia en el agua potable es de alto riesgo para la salud y es indicativo del deterioro de la calidad de la misma (Marchand 2002).

Además cabe señalar que en ambientes acuosos esta bacteria se adhiere a superficies produciendo una biopelícula (Leclerc 2003) que consisten en comunidades bacterianas complejas que se adhieren a una variedad de superficies que incluyen metales, plásticos, materiales de implante médico y tejidos. Las biopelículas se caracterizan por ser anclajes para supervivencia pues una vez formadas son muy difíciles de destruir. La formación de estos cumulos de bacterias y material extracelular representa un problema de salud pues contamina dispositivos que se implantan dentro del cuerpo como por ejemplo dispositivos intrauterinos, cateteres o válvulas cardíacas (Costerton 1980). Las biopelículas también representan un problema en el proceso de producción de diversas industrias pues provocan taponamiento y corrosión de conexiones y filtros. Además proveen un ambiente protector adicional a la bacteria ya que se constituyen en barreras contra los antibióticos y otros agentes antimicrobianos (Cernohorska & Votava 2008, Madigan *et al* 2006).

Por otro lado las biopelículas también pueden jugar un papel importante en el ecosistema. Por ejemplo, las halladas en las rocas o guijarros en el fondo de lagos o estanques constituyen una importante fuente de alimento para muchos organismos acuáticos (McGraw 2003)

d) Patogenicidad y Factores de Virulencia *P. aeruginosa* es una bacteria invasiva y toxigénica. Su amplia variedad de factores de virulencia que produce incide directamente sobre su elevada tasa de mortalidad. Se ha demostrado que estos determinantes de virulencia participan en la etapa de colonización y supervivencia bacteriana: la invasión tisular, la intoxicación y daño de los tejidos del huésped infectado y en la inhibición de su respuesta inmune (Esnard *et al* 2004)

Esta bacteria tiene un flagelo único que permite su motilidad y puede mediar las interacciones iniciales de superficie. También tiene múltiples cilias en la superficie celular que son responsables de la adherencia a las membranas celulares y otras superficies. En las vías respiratorias, el glucolípido asialo gangliosido M1 (aGM1) es uno de los blancos para la unión a la superficie epitelial celular (Driscoll *et al* 2007). El cuadro 1.2 presenta un resumen de los principales factores de virulencia.

Cuadro 1.2. Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

Factor	Ejemplo
Adhesinas	<ul style="list-style-type: none"> • fimbria (pili N-methyl-phenylalanina) • alginato (biopelículas)
Invasinas	<ul style="list-style-type: none"> • elastasa • proteasa alcalina • hemolisinas (fosfolipasa y lecitinasa) • sideróforos • citotoxinas (leucocidina)
Motilidad/quimiotaxis	<ul style="list-style-type: none"> • flagelos
Toxinas	<ul style="list-style-type: none"> • Exoenzima S • Exotoxina A • Lipopolisacárido
Superficie con propiedades antifagocíticas	<ul style="list-style-type: none"> • cápsulas, capas mucosas • LPS • Biopelículas
Defensa contra respuesta immune	<ul style="list-style-type: none"> • cápsulas, capas mucosas • LPS • biopelículas • enzimas proteolíticas
Atributos genéticos	<ul style="list-style-type: none"> • intercambio genético por transducción y conjugación • resistencia inherente (natural) a drogas • factor R y plásmidos de resistencia
Criterios ecológicas	<ul style="list-style-type: none"> • adaptabilidad a requerimientos nutricionales mínimos • diversidad metabólica • amplia ocurrencia en una variedad de hábitats

Tomado de (<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>) con algunas modificaciones.

e) Sistema Sensor de Quórum: En *P. aeruginosa* existen dos sistemas “sensores de quórum” que actúan en serie: LasI-LasR y RhII-RhIR; ambos dependientes de acil-HSL (Figura 1.2). A una alta densidad celular, la