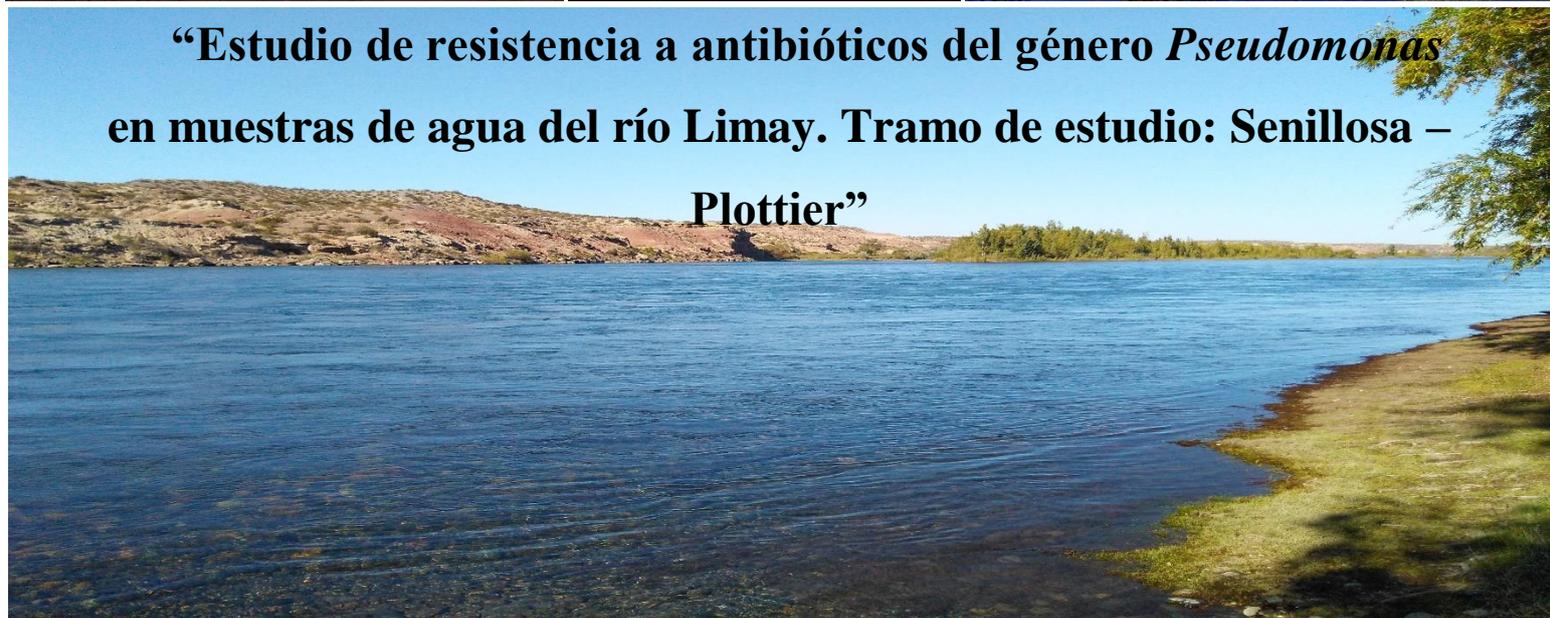


Trabajo de tesis para la obtención del título de:
Licenciatura en Saneamiento y Protección Ambiental



**“Estudio de resistencia a antibióticos del género *Pseudomonas*
en muestras de agua del río Limay. Tramo de estudio: Senillosa –
Plottier”**



Laura Lorena Sabathier
Neuquén, 2019

Directora de tesis: Lic. Desirée S. Pezzullo – FACIAS - UNCo
Codirectora de tesis: MSc. Marcela I. Schlenker – FACIAS - UNCo

Índice

Índice de Imágenes	4
Índice de Tablas	5
Índice de Gráficos	5
Agradecimientos.....	6
Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción	9
Objetivos.....	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
Antecedentes	13
Marco Teórico.....	15
Antimicrobiano - Antibiótico.....	15
Mecanismos de acción antibiótica	15
Antibióticos Betalactámicos	16
Carbapenemes	16
Resistencia antibiótica (RAM).....	17
Mecanismos de resistencia bacteriana.....	17
Género <i>Pseudomonas spp.</i>	18
Grupo Fluorescente	18
Reglamentación	19
Metodología	21
Área de estudio.....	21
Río Limay.....	21
Sitios de Muestreo	22
Diseño de Muestreo	28
Análisis de Laboratorio.....	28

Presencia/Ausencia de bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	28
Recuento de bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	28
Aislamiento de cepas del género <i>Pseudomonas</i>	29
Pruebas de identificación.....	29
Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos.....	30
Resultados y Discusión.....	31
Presencia/Ausencia de bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	31
Recuento de bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	32
Aislamiento de cepas del género <i>Pseudomonas</i>	34
Pruebas de identificación	35
Coloración de Gram	35
Prueba de la Catalasa.....	35
Prueba de fluorescencia.....	36
Evaluación de susceptibilidad a Carbapenemes	36
Conclusiones y Recomendaciones	42
Bibliografía	44
Anexos	48
Anexo I: Parámetros en aguas dulces recreativas.....	48
Anexo II: Comunicado de prensa de la OMS.....	49

Índice de Imágenes

Imagen 1: Ubicación del área de estudio en la cuenca del río Limay. (Fuente:AIC).....	21
Imagen 2: Puntos de muestreo en el área de estudio, río Limay. (Fuente: Google Earth 2019)..	22
Imagen 3: Imagen satelital del punto 1 de muestreo, Balneario Municipal Senillosa (Fuente: Google Earth 2019).....	23
Imagen 4: Balneario Municipal Senillosa (Fuente: Elaboración propia)	23
Imagen 5: Imagen satelital del punto 2 de muestreo, pasando el antiguo camping municipal (Fuente: Google Earth 2019).....	24
Imagen 6: Camping viejo Senillosa (Fuente: Elaboración propia)	24
Imagen 7: Imagen satelital del punto 3 de muestreo, cerca del circuito del Paseo de la Costa Plottier (Fuente: Google Earth 2019).....	25
Imagen 8: Paseo de la Costa Plottier (Fuente: Elaboración propia).....	25
Imagen 9: Imagen satelital del punto 4 de muestreo, Balneario Municipal Plottier (Fuente: Google Earth 2019).....	26
Imagen 10: Balneario Plottier (Fuente: Elaboración propia).....	26
Imagen 11: Sitio de muestreo en el Balneario Plottier (Fuente: Elaboración propia).....	26
Imagen 12: Imagen satelital del punto 5 de muestreo, playa La Herradura (Fuente: Google Earth 2019)	27
Imagen 13: Sitio de muestreo en La Herradura (Fuente: Elaboración propia)	27
Imagen 14: Monodiscos de Imipenem y Meropenem utilizados (Fuente: Elaboración propia) ..	30
Imagen 15: Botellas con desarrollo y fluorescencia expuestas a la luz UV. (Fuente: Elaboración propia)	32
Imagen 16: Tubos de ensayo bajo luz ultravioleta. (Fuente: Elaboración propia).....	33
Imagen 17: Colonias fluorescentes del género Pseudomonas. (Fuente: Elaboración propia)	34
Imagen 18: Colonias fluorescentes del género Pseudomonas. (Fuente: Elaboración propia)	34
Imagen 19: Colonias fluorescentes del género Pseudomonas. (Fuente: Elaboración propia)	34
Imagen 20: Vista en microscopio óptico de bacterias del género Pseudomonas, haciendo zoom en un recorte para distinguir los bacilos (Fuente: Elaboración propia)	35
Imagen 21: A) y B) Rápida producción sostenida de burbujas de oxígeno sobre el extendido (Fuente: Elaboración propia).....	36
Imagen 22: Antibiograma del aislamiento 8 (Fuente: Elaboración propia).....	37
Imagen 23: Antibiograma del aislamiento 13 (Fuente: Elaboración propia).....	37
Imagen 24: Antibiograma del aislamiento 14 (Fuente: Elaboración propia).....	37
Imagen 25: Antibiograma del aislamiento 17 (Fuente: Elaboración propia).....	37

Índice de Tablas

Tabla 1: Puntos de corte frente a Carbapenems (CLSI, 2018)	30
Tabla 2: Resultados de bacterias Pseudomonas	31
Tabla 3: Recuento de bacterias Pseudomonas del grupo fluorescente	33
Tabla 4: Medición de halos de inhibición para Imipenem y Meropenem	38
Tabla 5: Valores guía de indicadores en aguas dulces recreativas en distintos países y organizaciones	48

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Resultados de susceptibilidad de los aislamientos frente a Imipenem.	39
Gráfico 2: Resultados de susceptibilidad de los aislamientos frente a Meropenem.	39
Gráfico 3: Resultados de susceptibilidad de los aislamientos frente a Imipenem y Meropenem.....	40

Agradecimientos

A mi mamá, por su ayuda incondicional y sostén durante toda la carrera.

A mi compañero y padre de mis hijos, por el aguante y la ayuda en el último tramo.

A mi directora y co-directora, Desirée y Marcela, por aceptarme como tesista y por su asistencia en el trabajo de laboratorio y redacción.

A Gerardo por su buena predisposición en el laboratorio.

Resumen

Uno de los problemas aparejados a la contaminación de los ríos es la presencia en el agua de bacterias patógenas o no, las cuales poseen resistencia a antibióticos. En el presente trabajo se investigó sobre la resistencia a antibióticos en cepas del género *Pseudomonas* que habitan en el curso de agua del río Limay, tramo comprendido entre las localidades de Senillosa y Plottier.

Dentro del género *Pseudomonas*, se encuentra el grupo fluorescente conformado por las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*. Hasta el momento, casi todos los estudios de resistencia a antimicrobianos de estas bacterias son de ambientes hospitalarios.

Para lograr el objetivo del trabajo se muestreó en cinco lugares en dos campañas durante marzo y abril. Los análisis microbiológicos realizados consistieron en pruebas de presencia-ausencia, recuento, aislamiento y pruebas de identificación de bacterias del género *Pseudomonas*. Por último se evaluó la susceptibilidad frente a los antibióticos del grupo Carbapenemes mediante la técnica de difusión en agar.

Se confirmó la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* que presentan fluorescencia en los cinco sitios de muestreo estudiados. La evaluación de susceptibilidad de las cepas aisladas frente al antibiótico Imipenem dio un 50% de resistencia y frente a Meropenem dio un 20% de resistencia. Asimismo, los resultados de susceptibilidad a los dos antibióticos juntos revelaron resistencia en un 20% de las cepas aisladas, y sensibilidad disminuida en un 25% de las cepas.

La exposición humana ya sea por contacto directo o indirecto con bacterias del grupo *Pseudomonas* fluorescente y con genes de resistencia antibiótica en el tramo de estudio del río Limay son un hecho comprobable.

Palabras clave: *Pseudomonas*, grupo fluorescente, resistencia a Imipenem y resistencia a Meropenem.

Abstract

One of the problems associated with river pollution is the presence in the water of pathogenic bacteria or not, which have antibiotic resistance. In this work, we investigated the resistance to antibiotics in strains of the genus *Pseudomonas* that inhabit the water course of the Limay River, a section between the towns of Senillosa and Plottier.

Within the genus *Pseudomonas*, there is the fluorescent group consisting of the species *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. So far, almost all studies of antimicrobial resistance of these bacteria are from hospital settings.

To achieve the objective of the work, it was sampled in five places in two campaigns during March and April. The microbiological analyzes performed consisted of presence-absence tests, counting, isolation and identification tests of bacteria of the genus *Pseudomonas*. Finally, susceptibility to antibiotics of the Carbapenems group was evaluated by agar diffusion technique.

The presence of bacteria of the genus *Pseudomonas* that show fluorescence in the five sampling sites studied was confirmed. The susceptibility assessment of the isolated strains against the antibiotic Imipenem gave 50% resistance and against Meropenem gave a 20% resistance. Likewise, the results of susceptibility to the two antibiotics together revealed resistance in 20% of the isolated strains, and decreased sensitivity in 25% of the strains.

Human exposure either by direct or indirect contact with bacteria of the fluorescent *Pseudomonas* group and with antibiotic resistance genes in the study section of the Limay River are a testable fact.

Keywords: *Pseudomonas*, fluorescent group, resistance to Imipenem and resistance to Meropenem.

Introducción

Las localidades de Senillosa y Plottier están ubicadas en el departamento Confluencia de la provincia de Neuquén, ubicadas sobre la Ruta Nacional N° 22 a unos 33 y 15 Km de la capital provincial respectivamente. Según el Censo 2010, el municipio de Senillosa cuenta con una población de 8.130 habitantes y Plottier con unos 33.600 habitantes. El mayor atractivo turístico de ambas localidades está dado por el río Limay y las actividades que el mismo brinda (INDEC, 2010).

El río Limay se extiende a lo largo de 430 Km de noroeste a sudeste, tiene su nacimiento en el lago Nahuel Huapi y fluye hasta la unión con el río Neuquén, para dar nacimiento al río Negro. Posee un caudal anual medio de 630 m³/s y drena un área de 56.000 Km² (AIC, 2019).

Uno de los problemas aparejados a la contaminación de los ríos es la presencia en el agua de bacterias que poseen resistencia a antibióticos, ya sean bacterias patógenas o potencialmente patógenas. En esta investigación se evaluó la resistencia a antibióticos de algunas bacterias que habitan en el curso de agua del río Limay, en el tramo comprendido entre las localidades antes mencionadas.

Desde el descubrimiento de los antibióticos por Flemming en 1928, estos compuestos son probablemente la familia más exitosa de fármacos desarrollados hasta la fecha para mejorar la salud humana, prevenir y tratar infecciones de animales y plantas, y como promotores del crecimiento y suplemento alimenticio en la ganadería (Ayokunle & Ahmad, 2013).

Los antibióticos, sustancias químicas que detienen el crecimiento o destruyen una población bacteriana, pueden clasificarse según diversos criterios, de los cuales el más usado es según su estructura molecular. Bajo esta clasificación encontramos las siguientes familias de antibióticos: aminoglucósidos, betalactámicos, anfenícoles, glicopéptidos, lincosamidas, macrólidos, quinolonas, sulfamidas, tetraciclinas y miscelánea (Esparza Olcina, 2008). Dentro de los betalactámicos, los carbapenemes son los antimicrobianos de más amplio espectro, mayor actividad y con resistencia a las betalactamasas (enzimas que hidrolizan las moléculas de los betalactámicos) (Sociedad de Infectología Clínica del Uruguay [SICU], 2011).

La resistencia antimicrobiana (RAM) se produce cuando los microorganismos que provocan una infección sobreviven a la exposición de un antibiótico que en condiciones normales los hubiera matado o detenido su crecimiento. Aunque la resistencia es hasta

cierto punto un fenómeno que ocurre de forma natural, el incremento producido en el uso de los antibióticos en la segunda mitad del siglo XX, momento en el que se hace masiva su comercialización, ha creado una presión selectiva muy fuerte sobre las bacterias resistentes, lo que disminuye la eficiencia en los tratamientos médicos (Changing Markets & Ecostorm, 2016).

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno complejo de causas múltiples e interconectadas. Los antibióticos se utilizan tanto para el tratamiento de infecciones en humanos como en medicina veterinaria, en ganadería y en piscicultura. Generalmente, estos compuestos se metabolizan parcialmente por los organismos, por lo que el resto termina en los sistemas de agua municipales y aquellos derivados de actividades agropecuarias. Como consecuencia, se ha observado un incremento en la resistencia a los antibióticos por bacterias ambientales, lo que se ha tornado en un problema ecológico (Kümmerer, 2004).

El problema de la RAM en Argentina es acuciante. Desde el primer aislamiento de enterobacterias productoras de carbapenemasas de tipo KPC (Carbapenemasas del tipo *Klebsiella pneumoniae*) en 2006, el número de hospitales afectados por casos o brotes de enterobacterias multiresistentes o de resistencia extrema ascendió a 317 en 2015. En el período 2010-2014, en los hospitales de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, la tasa de infecciones causadas por bacterias productoras de KPC cada 10.000 egresos-año se ha incrementado diez veces (Lazovski *et al.*, 2017).

Debido a que los ríos constituyen una de las principales fuentes de agua para el consumo humano y animal, la contaminación de los mismos puede contribuir a mantener e incluso diseminar elementos de resistencia bacteriana (Lösch, Merino & Alonso, 2004).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son muy ubicuas y se encuentran tanto en agua, suelos, como formando parte de la flora nativa del intestino de varias especies animales. Algunas especies son patógenas de plantas y animales y sólo unas pocas se han encontrado en infecciones humanas. Dentro del género *Pseudomonas*, se encuentra el grupo fluorescente conformado por las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* (Cabello, 2007).

Hasta el momento, casi todos los estudios de resistencia a antimicrobianos de estas bacterias se realizaron en ambientes hospitalarios, con lo cual es importante investigar sobre la resistencia adquirida en diversos ambientes donde el ser humano pueda tener contacto en cualquier momento de su vida, ya sea a través de contacto directo o indirecto con el suelo, agua de río, mar, o el suministro de agua para consumo. Dado que una

persona que se enferme por bacterias resistentes verá disminuida la eficiencia de su tratamiento clínico (Acevedo Barrios *et al.*, 2015).

Las bacterias potencialmente patógenas se liberan constantemente en las aguas, muchas de ellas albergan genes de resistencia a antibióticos que se insertan en plataformas genéticas móviles (plásmidos, transposones e integrones) capaces de propagarse entre las comunidades bacterianas que viven en el agua y en el suelo. El agua constituye la ruta principal por la cual se introducen genes de resistencia bacterianos en los ecosistemas naturales, en donde las bacterias no patógenas pueden servir como reservorio de genes de resistencia (Gaze, 2017).

Las bacterias resistentes a los antibióticos presentes en la orina, heces y estiércol, usan como ruta principal las aguas residuales de los hospitales, de la industria ganadera y piscícola y efluentes municipales, para llegar a los cuerpos de agua. Esos efluentes constituyen probablemente las mayores fuentes de bacterias y de genes de resistencia a antibióticos que se liberan en el medio ambiente (Acevedo Barrios *et al.*, 2015).

El aumento mundial de las bacterias resistentes a los antibióticos en el medio ambiente hace que sea imperativo la vigilancia de la presencia y distribución de las bacterias y de genes de resistencia. Es por esto que se debe profundizar en el conocimiento sobre la ocurrencia, el destino y el transporte de antibióticos y sus metabolitos en los ecosistemas acuáticos, para comprender la relación existente entre los residuos de antibióticos después de su excreción, sus metabolitos y las poblaciones de bacterias resistentes a ellos (Rizzo *et al.*, 2013).

Este trabajo de investigación busca conocer el estado de la resistencia a antibióticos en aquellas bacterias del género *Pseudomonas* que habitan en el agua del río Limay, tramo comprendido entre Senillosa y Plottier. El estudio de esta temática contribuirá a:

- Visibilizar sobre el abuso de antibióticos ya sea por parte de la comunidad, como de los profesionales médicos, veterinarios, farmacéuticos y ganaderos entre otros.
- Poner en evidencia la necesidad de programas de vigilancia de esta bacteria en las fuentes hídricas.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar la resistencia a los antibióticos en cepas del grupo *Pseudomonas* aisladas de muestras de agua del río Limay en el tramo situado entre las localidades de Senillosa y Plottier.

Objetivos Específicos

- Cuantificar a través de la técnica de NMP (Número Más Probable) bacterias del género *Pseudomonas*.
- Aislar cepas del género *Pseudomonas* del medio acuático del río Limay en el tramo de estudio.
- Identificar mediante pruebas bioquímicas los diferentes géneros de bacterias encontradas.
- Evaluar la resistencia que presentan las cepas del género *Pseudomonas* a los antimicrobianos.

Antecedentes

En la etapa inicial de investigación de la tesis se tuvieron en cuenta los siguientes estudios a nivel local, nacional e internacional.

✓ **"Estudio de resistencia a antibióticos en Enterobacterias en aguas recreativas de balnearios del río Limay en la ciudad de Neuquén"**, presentada por Marcela Inés Schlenker en el año 2013, para obtener el título de Licenciada en Saneamiento y Protección Ambiental en la Universidad Nacional del Comahue.

El objetivo de la investigación es estudiar la presencia de Enterobacterias productoras de enzimas carbapenemasas en el ambiente acuático del río Limay, en sitios utilizados con fines recreativos en la época estival. Se tomaron muestras en balnearios que pertenecen al río Limay y además un balneario neuquino ubicado sobre el río Neuquén.

Dentro de las Enterobacterias se identificaron los siguientes géneros y especies: *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, presunta *Salmonella*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter sp.* Además, no enterobacterias como *Aeromonas sp.*, presunto *Vibrio* y *Pseudomonas sp.*

Se concluye en el trabajo que la identificación de las mismas representaría una evidencia de contaminación de origen fecal.

✓ **"Riesgo sanitario por presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el agua para consumo"**, tesis realizada por Irene Martín para obtener la Lic. en Ecología Urbana en el año 2004, en la Universidad Nacional de General Sarmiento.

Este trabajo plantea como objetivo general analizar la problemática asociada a la presencia de *P. aeruginosa* en el agua con que se abastecen los habitantes establecidos en la cuenca del arroyo Las Catonas, con el fin de producir aportes sobre la calidad del agua para consumo humano y uso doméstico que puedan contribuir con la planificación y gestión del recurso hídrico subterráneo.

El muestreo de la calidad del agua realizado en viviendas, viveros y escuelas establecidas en la cuenca reveló la presencia de esta especie bacteriana. En base a los resultados obtenidos se concluyó que la presencia de *P. aeruginosa* es una amenaza que afecta a un alto porcentaje de la población establecida en la cuenca Las Catonas (más del 50% de las muestras se detectó la presencia de esta especie

bacteriana), independientemente del sistema de captación de agua que utilicen (bomba manual o a motor). Por último, diferencia tres grupos de mayor o menor riesgo sanitario por presencia de dicha bacteria en el agua para consumo y uso doméstico.

✓ **“Resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas aisladas del regadío del río Chibunga. Mayo-Julio 2018”**, tesis realizada por Llibran M. Caicedo y Karen G. M. Valencia en 2018, para optar el título de Licenciados en Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico, en la Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Este estudio se basó en determinar la resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas aisladas del regadío del Río Chibunga, para mostrar patógenos causantes de infecciones importantes, que podrían ser de difícil tratamiento farmacológico.

Se recolectaron las muestras del río de siete estaciones diferentes, incluyendo la medición de altitud, temperatura y pH. Los resultados obtenidos muestran a 18 bacterias patógenas diferentes, correspondientes a 17 gramnegativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Salmonella enterica*, *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Vibrio* spp.; y tan solo una bacteria Gram-positiva: *Enterococcus* spp. La mayoría de las bacterias mostraron resistencia frente a las quinolonas y menor resistencia, a las cefalosporinas, glicopéptidos y aminoglucósidos, concluyendo que el Río Chibunga está contaminado por bacterias patógenas resistentes a antibióticos de uso clínico.

Marco Teórico

Antimicrobiano - Antibiótico

Antimicrobiano es toda sustancia de origen natural (producido por un organismo vivo, hongo o bacteria), semisintética o sintética que elimina microorganismos como las bacterias, los virus, los protozoos y los hongos o inhibe su crecimiento. Las sustancias antimicrobianas se utilizan en la forma de medicamentos (antibióticos, antirretrovíricos y antifúngicos) o de productos químicos como antisépticos, desinfectantes y esterilizantes (Gaze, 2017).

Hoy en día no se utilizan en terapéutica moléculas de origen natural por lo cual no se establece más la diferenciación con quimioterápicos, término usado anteriormente para referirse a las moléculas de origen sintético como las sulfas y sus derivados (Murray, 1995).

Antibiótico es una sustancia antimicrobiana producida de manera natural por bacterias u hongos capaz de destruir a otros microorganismos o inhibir su crecimiento. El ser humano utiliza numerosos tipos de antibióticos como medicamentos para prevenir y tratar infecciones originadas por bacterias patógenas, hongos y ciertos parásitos. La mayoría de los antibióticos se usan principalmente para combatir las bacterias. Dado que los antibióticos son un tipo de antimicrobiano, ambos términos suelen emplearse indistintamente (Gaze, 2017), por lo cual este criterio fue adoptado para la presente investigación.

Los agentes que destruyen o matan las bacterias se denominan bactericidas, mientras que los agentes que inhiben el crecimiento bacteriano se denominan bacteriostáticos (Aguiló, 2017).

Mecanismos de acción antibiótica

Un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana utilizando para tal fin diversos mecanismos. Generalmente son multifactoriales involucrando: inhibición de la síntesis de la pared celular, inhibición de la síntesis de proteínas, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de las vías metabólicas y permeabilidad en la membrana plasmática (Basualdo, 1996; Aguiló, 2017)

Antibióticos Betalactámicos

Dentro de la gran familia de antibióticos existe un conjunto que se caracteriza por presentar en su estructura un anillo betalactámico, denominándose de esta manera. Este anillo tiene la propiedad de presentar afinidad por las enzimas que catalizan la síntesis de la pared celular. Esta propiedad le confiere a estos antibióticos una baja toxicidad, con un alto índice terapéutico.

Se distinguen 4 grupos diferentes: las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenemes (Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae [CRE], 2015).

Carbapenemes

Como se mencionó arriba, dentro del conjunto de antibióticos betalactámicos se encuentran los carbapenemes. El anillo carbapenem es un azobicyclo (un anillo β -lactámico y otro pirrolidínico). Posee en posición 1 un átomo de carbono (*carba*) y un enlace no saturado entre 2 y 3 (*-em*). Los distintos carbapenemes son fruto de sustituciones en 1 y 2. Esto los diferencia en cuanto a su actividad frente a Gram-negativos y Gram-positivos, así como el efecto proconvulsante (SICU, 2011).

Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de la pared celular uniéndose a PBP (proteínas que fijan penicilinas) en la cara externa de la membrana citoplasmática. Producen la lisis bacteriana, por lo que son habitualmente bactericidas, siendo de acción rápida y dependiente del tiempo. Para actuar deben atravesar la pared celular accediendo a las PBP. En los Gram-negativos lo hacen a través de las porinas de la membrana externa. El espectro de afinidad por las PBP es similar aunque la preferencia por algunas de ellas determina diferencias de actividad intrínseca y potencia antimicrobiana de cada carbapenem.

El primero de este grupo en utilizarse fue imipenem asociado a la cilastatina y posteriormente fueron meropenem, ertapenem y doripenem. Poseen un amplio espectro por la alta afinidad por las PBP y la elevada resistencia a muchas β -lactamasas tanto de cocos Gram-positivos como de bacilos Gram-negativos (BGN). Los cuatro antimicrobianos son activos frente a anaerobios con ligeras variaciones. Ertapenem, sin actividad frente a BGN no fermentadores (BGNNF). Imipenem, meropenem y doripenem, con actividad frente a BGNNF (SICU, 2011).

Resistencia antibiótica (RAM)

Desde hace un tiempo, algunos antibióticos dejaron de ser efectivos debido a que las bacterias lograron evadir la acción bactericida o bacteriostática de los mismos (Rocha, Reynolds & Simons, 2015).

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano y se transmite de forma vertical de generación en generación. Por ejemplo, todos los gérmenes Gram-negativos son resistentes a la Vancomicina, y esta situación no es variable.

La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana mediante mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes (transferencia horizontal). Estos genes de resistencia pueden estar codificados en el material genético cromosómico o extracromosómico (plásmidos, transposones e integrones). Los plásmidos son moléculas circulares de ADN extracromosómico, que se pueden replicar en forma independiente del cromosoma bacteriano y que son transmisibles entre bacterias, aún no emparentadas entre sí, por medio del mecanismo de conjugación (Basualdo, 1996; Alós, 2015).

Mecanismos de resistencia bacteriana

Esta resistencia antimicrobiana se logra a través de distintos mecanismos, como pueden ser: hidrólisis enzimática, trastornos de permeabilidad y alteraciones del sitio blanco de acción (Mosquito *et al.*, 2011). En el caso de la hidrólisis enzimática, el antimicrobiano puede ser desactivado por cientos de diferentes enzimas producidas por bacterias resistentes, en el espacio periplásmico o fuera de la célula. El grupo más representativo de enzimas bacterianas son las denominadas Betalactamasas que tienen la capacidad de romper el anillo betalactámico e inactivar a diversos miembros del grupo de oxabetalactámicos. Asimismo, existen las enzimas que poseen una amplia gama de actividad, frente a todas las penicilinas y cefalosporinas y son capaces de inactivar la mayoría de los antibióticos β -lactámicos; estas β -lactamasas reciben la denominación de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

El segundo mecanismo de resistencia es aquel donde la célula bacteriana puede ser capaz de impedir que un antibiótico alcance una concentración adecuada en el sitio de acción, evitando su entrada al medio intracelular o promoviendo la salida de este hacia el medio extracelular mediante un mecanismo activo de flujo del antibiótico. Estas bombas

de flujo son alteraciones en las proteínas porinas, que funcionan alterando el tamaño del orificio del poro o la carga de estos canales, para dar lugar a la exclusión del antibiótico.

Las alteraciones del sitio blanco de acción impiden que el antibiótico sea reconocido y por lo tanto no es capaz de ejercer su efecto. Al ingresar los antimicrobianos en la célula, proceden a unirse e inactivar su blanco, que en forma característica es una enzima o sitio ribosómico esencial. Si el blanco se altera de algún modo, el efecto inhibitor disminuye de manera proporcional, sin afectar su función en la célula bacteriana (Conte, 1995; Moreno *et al.*, 2009).

Género *Pseudomonas* spp.

Las bacterias del género *Pseudomonas* pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae*, se encuentran presentes en la naturaleza (suelo, agua, vegetación) y en los ambientes húmedos de los hospitales (lavabos, cuartos de baño, respiradores y equipos de diálisis). Morfológicamente son bacilos Gram-negativos, aerobios y anaerobios facultativos, casi todos móviles, tienen bajos requerimientos nutritivos y la capacidad de soportar diversas condiciones ambientales adversas. Una de las características más importante es la capacidad de formar biopelículas (biofilm), que le permiten adherirse de manera muy eficaz a las superficies. Esta propiedad facilita la resistencia a diversos tratamientos, además de que ayuda a evadir las defensas del sistema inmune del paciente (Sandoval Guzmán, 2016).

La clasificación del género *Pseudomonas* fue cambiando con el correr de los años y actualmente se divide en varios géneros diferentes. La familia *Pseudomonadaceae* se clasifica en grupos del I al V sobre la base de su homología de ADN y ARNr, además de características de cultivo comunes. El grupo I se subdivide en grupo fluorescente y grupo no fluorescente (Cabello, 2007).

Grupo Fluorescente

Dentro del grupo fluorescente podemos encontrar a: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*. Todas las especies dentro de este grupo se caracterizan por la producción de un pigmento pioverdina hidrosoluble que da fluorescencia blanca a verde azulada bajo luz ultravioleta de longitud de onda larga (400 nm). La producción de pigmentos fluorescentes aumenta sobre todo en los medios con alta concentración de fosfatos. Aunque los tres miembros de este grupo producen

pioverdina, sólo *Pseudomonas aeruginosa* produce un pigmento azul hidrosoluble llamado piocianina (Koneman, 2008).

En cuanto a *Pseudomonas aeruginosa*, es la especie más importante ya que se encuentra en mayor proporción en los distintos ambientes (suelo, agua, vegetación, etc). Esta bacteria presenta innumerables factores de virulencia por lo que su patogenicidad es alta y es naturalmente resistente a muchos de los antibióticos utilizados ampliamente en la medicina. Esta propiedad se debe principalmente a que contiene plásmidos de resistencia cuyos genes codifican proteínas que inactivan el antibiótico o afectan su transporte hacia el interior de la célula (Madigan *et al.*, 1999).

En cuanto a *Pseudomonas putida*, su hábitat comúnmente es el suelo y zonas acuosas, no es común encontrarlo en pacientes en hospitales, asimismo, las cepas suelen ser resistentes a Betalactámicos.

En el caso de *Pseudomonas fluorescens*, la misma es saprófito de suelo y agua, es muy abundante en la rizósfera de las plantas.

La relevancia de aislar estos miembros del grupo *Pseudomonas* en fuentes hídricas radica en la capacidad de estos microorganismos para causar infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, con quemaduras, alteraciones metabólicas como diabetes y los cuales han sido sometidos a instrumentación o cateterismo (Guzmán Sandoval, 2016).

Reglamentación

Para mencionar las normas que establecen límites de microorganismos como los estudiados en cuerpos superficiales de agua, se debe hacer referencia a las aguas de uso recreativo. Las aguas costeras pueden ser el punto de contacto donde las personas están expuestas a bacterias resistentes a antibióticos, mientras participan en actividades deportivas o recreativas.

A nivel internacional (Canadá, Australia, OMS, U.S EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) y la Unión Europea) utilizan niveles guía, es decir límites provisorios que permiten evaluar la seguridad de un ambiente acuático recreacional, para coliformes totales, termotolerantes, *Escherichia coli* y *Enterococcus* (ver Anexo I).

A nivel nacional, la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (SSRH) sugiere adoptar lo establecido por la EPA (1986) en lo que respecta a *E. coli* y *Enterococcus* (Ministerio de Salud, 2016).

*Estudio de resistencia a antibióticos del género Pseudomonas en muestras de agua del río Limay.
Tramo de estudio: Senillosa – Plottier*

Para la habilitación de zonas balnearias en la Provincia de Neuquén, la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas (AIC), realiza recuentos de *E. coli* para determinar la aptitud microbiológica del agua.

Metodología

Área de estudio

El trabajo de investigación se llevó a cabo en un tramo del río Limay comprendido entre Senillosa y Plottier, el cual abarca unos 15 km de longitud aproximadamente. En la Imagen 1 se puede observar el área de estudio ubicada en la cuenca del río Limay.



Imagen 1: Ubicación del área de estudio en la cuenca del río Limay. (Fuente:AIC)

Río Limay

El curso superior del río Limay tiene un régimen hidrológico de origen pluvionival atenuado por la presencia de lagos naturales ubicados en las nacientes de casi todos sus tributarios importantes. El régimen hidrológico natural se caracteriza por poseer una doble onda de crecida. La primera durante el invierno (junio-agosto), época en que se producen las principales lluvias sobre la cuenca. Las precipitaciones níveas se acumulan hasta fines de la primavera (octubre-noviembre), en que se origina el deshielo provocando

la segunda onda de crecida. Los estiajes, habituales hacia fines del verano, se extienden hasta el comienzo de las lluvias otoñales. (AIC, 2019)

Sitios de Muestreo

La toma de muestras se llevó a cabo en cinco puntos distintos del río Limay, los cuales fueron georreferenciados con GPS y se muestran en la Imagen 2.

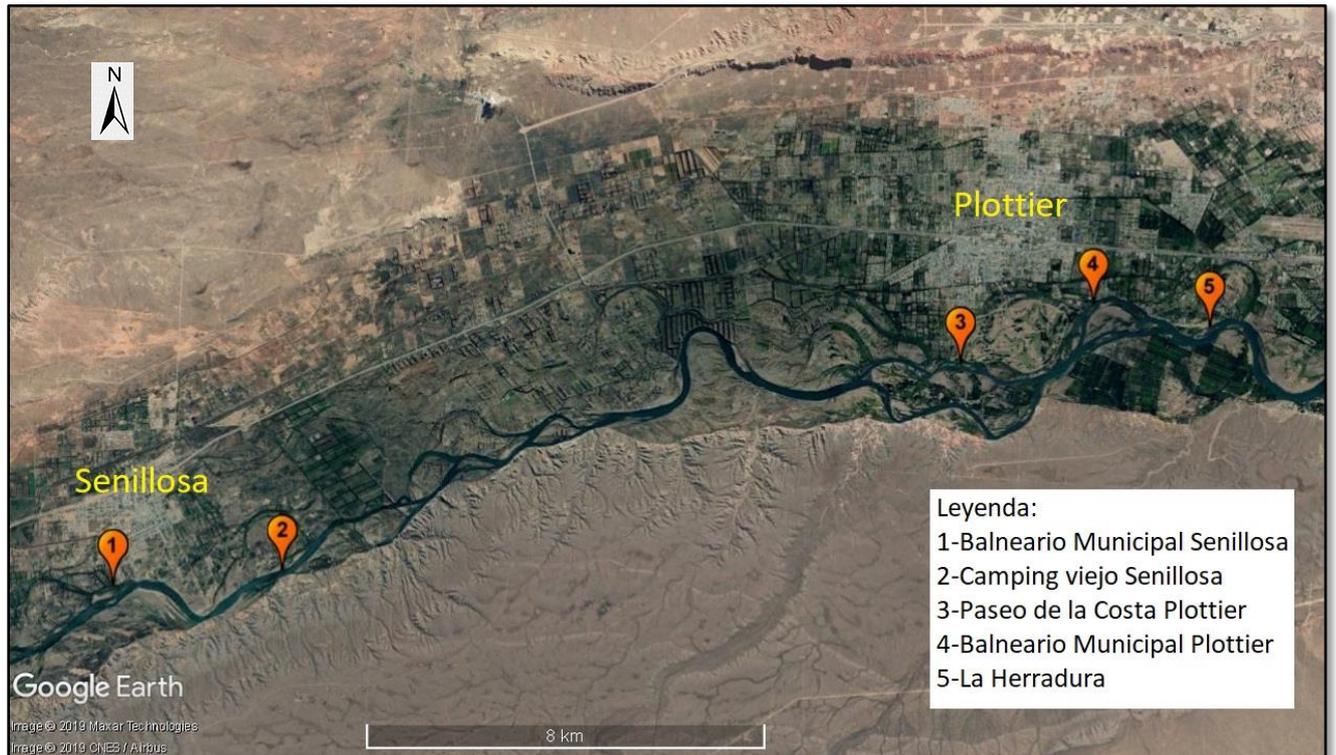


Imagen 2: Puntos de muestreo en el área de estudio, río Limay. (Fuente: Google Earth 2019)

I. Balneario Municipal Senillosa (Zona I):

Este sitio se encuentra en la localidad de Senillosa, accediendo por Ruta Nacional 22 y calle Chubut. Sus coordenadas geográficas son: (S) 39° 1'44.23"; (O) 68°25'59.74".

El lugar donde se recolectó la muestra pertenece a un pequeño brazo del río, donde se evidencia una disminución en la velocidad del río.



Imagen 3: Imagen satelital del punto 1 de muestreo, Balneario Municipal Senillosa (Fuente: Google Earth 2019)



Imagen 4: Balneario Municipal Senillosa (Fuente: Elaboración propia)

II. Camping viejo Senillosa (Zona II):

Este sitio de muestreo también corresponde a la localidad de Senillosa y se encuentra aguas abajo del antiguo camping municipal. Sus coordenadas geográficas son: (S) 39° 1'26.88"; (O) 68°23'39.72".

En este sector del río la corriente viene con mayor velocidad, es un tramo recto y sin ramificaciones.



Imagen 5: Imagen satelital del punto 2 de muestreo, pasando el antiguo camping municipal (Fuente: Google Earth 2019)



Imagen 6: Camping viejo Senillosa (Fuente: Elaboración propia)

III. Paseo de la Costa Plottier (Zona III):

Esta zona de muestreo se encuentra en la localidad de Plottier, dentro del complejo Los Canales y se accede por Avenida Plottier desde Ruta Nacional 22. Sus coordenadas geográficas son: (S) 38°58'41.05"; (O) 68°14'25.78".

La toma de muestra se realizó en una zona de meandros donde la velocidad de la corriente disminuye con respecto al centro del río.



*Imagen 7: Imagen satelital del punto 3 de muestreo, cerca del circuito del Paseo de la Costa Plottier
(Fuente: Google Earth 2019)*



Imagen 8: Paseo de la Costa Plottier (Fuente: Elaboración propia)

IV. Balneario Municipal Plottier (Zona IV):

Este punto de muestreo se localiza dentro de la zona establecida como balneario de la Ciudad de Plottier y sus coordenadas geográficas son: (S) 38°57'57.00"; (O) 68°12'38.22".

La muestra se recolectó en cercanías de un caño de toma de agua y donde la velocidad de la corriente disminuye respecto del centro del río debido a la presencia de meandros.



Imagen 9: Imagen satelital del punto 4 de muestreo, Balneario Municipal Plottier (Fuente: Google Earth 2019)



Imagen 10: Balneario Plottier (Fuente: Elaboración propia)



Imagen 11: Sitio de muestreo en el Balneario Plottier (Fuente: Elaboración propia)

V. La Herradura (Zona V):

Este sitio utilizado como balneario pertenece al ejido de Plottier y se accede por Ruta Nacional 22, en el kilómetro 1230 de dicha ruta. Sus coordenadas geográficas son: (S) 38°58'6.25"; (O) 68°10'59.68".

Este tramo del río no presenta ramificaciones o bifurcaciones y es una zona de poca profundidad en cercanías a la orilla.



Imagen 12: Imagen satelital del punto 5 de muestreo, playa La Herradura (Fuente: Google Earth 2019)

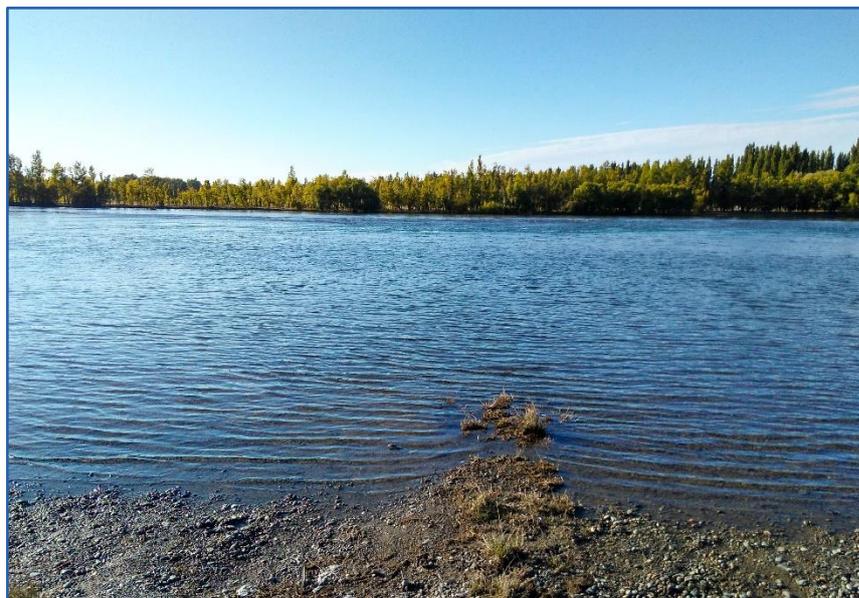


Imagen 13: Sitio de muestreo en La Herradura (Fuente: Elaboración propia)

Diseño de Muestreo

Para el estudio microbiológico del agua se procedió a tomar una muestra en cada uno de los cinco sitios antes mencionados, iniciando en la Zona I Balneario Municipal Senillosa y continuando según el cauce del río. El procedimiento de toma de muestra se realizó acorde con la metodología de Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales (American Public Health Association [APHA], 1992).

Una vez finalizado el muestreo, las muestras se transportaron en conservadora al Laboratorio de la Facultad de Ciencias del Ambiente y Salud de la Universidad Nacional del Comahue, para su posterior análisis.

Los muestreos se realizaron en dos campañas, la primera el 10 de Marzo y la segunda el 20 de Abril, asimismo se registraron los valores de temperatura ambiental para cada campaña.

Análisis de Laboratorio

Las muestras recolectadas se sometieron a diversos análisis microbiológicos con la finalidad de obtener cepas del género *Pseudomonas*, a las cuales se evaluó su susceptibilidad frente a los antibióticos. Estos análisis consistieron en pruebas de presencia-ausencia, recuento, aislamiento y pruebas de identificación de bacterias del género *Pseudomonas*.

Presencia/Ausencia de bacterias del género *Pseudomonas*

Este análisis permitió evaluar la presencia/ausencia de bacterias del género *Pseudomonas* en cada uno de los sitios de muestreo. Se inocularon 100 ml de caldo de cultivo Asparagina a doble concentración con 50 ml de muestra. Las botellas inoculadas se llevaron a estufa a 35 °C por 48 horas. El resultado positivo está dado por presencia de turbidez y fluorescencia bajo luz ultravioleta.

Recuento de bacterias del género *Pseudomonas*

Simultáneamente, a la técnica de Presencia/Ausencia, se realizó el Recuento de Bacterias *Pseudomonas* a través de la técnica de fermentación en tubo múltiple según Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales (APHA, 1992).

El resultado, luego de la incubación en estufa a 35-37 °C por 48 horas, es positivo por presencia de turbidez y fluorescencia bajo luz ultravioleta.

Aislamiento de cepas del género *Pseudomonas*

A partir de cada botellón y tubo de ensayo positivo, se sembró en un medio selectivo agarizado a través de la técnica por agotamiento en superficie en una sola placa para obtener colonias aisladas. Luego de su incubación en estufa a 35 °C por 48 horas, se observó la fluorescencia de las colonias bajo luz ultravioleta.

Los medios sólidos utilizados fueron “Cetrimida Agar Base” y “Pseudomona Agar P”, ambos usados para el aislamiento y diferenciación de especies de *Pseudomonas spp* en base a la producción de pigmentos como la piocianina, pioverdina, piomelanina o piorrubina (Britania, 2019).

Aquellas colonias que presentaron fluorescencia se aislaron a tubos en pico de flauta con el mismo medio sólido, estableciéndose los correspondientes cultivos puros.

Pruebas de identificación

Como procedimiento de verificación de las bacterias del género *Pseudomonas* se realizaron: tinción de Gram, prueba de la Catalasa y prueba de fluorescencia.

➤ Coloración de Gram

La tinción de Gram es una de las tinciones diferenciales con más uso en bacteriología, donde el efecto de la combinación de colorantes, mordiente y disolventes sobre los microorganismos está relacionado con la composición química de su pared celular. De esta manera distingue bacterias Gram (+) de aquellas Gram (-).

➤ Prueba de la Catalasa

La prueba de la Catalasa se realizó transfiriendo una ansada de cultivo puro en un portaobjeto con una gota de agua, para luego agregar unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la producción de burbujas de oxígeno como resultado positivo. La Catalasa es una enzima que convierte el peróxido de hidrógeno, que es letal cuando se acumula, en agua y oxígeno molecular en aquellos organismos que tienen un metabolismo oxidativo aeróbico de los hidratos de carbono.

➤ Prueba de Fluorescencia

Todos los cultivos y aislamientos fueron sometidos bajo luz ultravioleta para corroborar la existencia de pigmentos que fluorescen. Una fluorescencia positiva da el

indicio de un conjunto de especies del género *Pseudomonas* que poseen esta característica, como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*.

Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos

Se determinó el grado de susceptibilidad del grupo de *Pseudomonas* aisladas que presentaron fluorescencia bajo luz UV frente a los antibióticos Imipenem y Meropenem, del grupo Carbapenemes, mediante el método de difusión en agar (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2012). Se usaron monodiscos de 10 µg de concentración de cada antibiótico, de la marca Britania (ver Imagen 14).



Imagen 14: Monodiscos de Imipenem y Meropenem utilizados (Fuente: Elaboración propia)

Una vez transcurrida la incubación de las placas, se observaron las zonas de inhibición y se realizó la interpretación de los resultados a través de los puntos de corte establecidos por la CLSI. Los resultados de los halos de inhibición se correlacionan con tres categorías: “sensible”, “intermedio” y “resistente”.

A continuación se presenta la tabla 1 con los puntos de corte publicados en el documento M100 del CLSI, 2018.

Tabla 1: Puntos de corte frente a Carbapenems (CLSI, 2018)

Antibiótico	Contenido del disco	Categorías de interpretación y diámetros de zonas de inhibición en mm		
		Sensible	Intermedio	Resistente
IMIPENEM	10 µg	≥19	16 - 18	≤15
MEROPENEM	10 µg	≥19	16 - 18	≤15

Resultados y Discusión

Presencia/Ausencia de bacterias del género

Pseudomonas

Los resultados obtenidos en ambas campañas de muestreo para las pruebas de presencia/ausencia se muestran a continuación en la tabla 2.

Tabla 2: Resultados de bacterias *Pseudomonas*

1° CAMPAÑA DE MUESTREO	Sitios	Presencia/Ausencia	
		Desarrollo (turbidez)	Fluorescencia
	Zona I	<i>desarrollo</i>	(+)
	Zona II	<i>desarrollo</i>	(+)
	Zona III	<i>desarrollo</i>	(+)
	Zona IV	<i>desarrollo</i>	(+)
	Zona V	<i>desarrollo</i>	(+)
2° CAMPAÑA DE MUESTREO	Sitios	Presencia/Ausencia	
		Desarrollo (turbidez)	Fluorescencia
	Zona I	<i>sin desarrollo</i>	NC
	Zona II	<i>sin desarrollo</i>	NC
	Zona III	<i>desarrollo</i>	(+)
	Zona IV	<i>desarrollo</i>	(+)
	Zona V	<i>desarrollo</i>	(-)

NC = No Corresponde

La primer campaña de muestreo evidenció desarrollo de bacterias del género *Pseudomonas* en todos los sitios; situación que fue determinada por el desarrollo bacteriano (turbidez) y fluorescencia en los botellones (ver Imagen 15). Esto se condice con la bibliografía sobre este género de bacterias que está ampliamente distribuido en la naturaleza. Según Sánchez Bermúdez (2013) el género *Pseudomonas* abarca diferentes hábitats, colonizando aguas, suelos, plantas y animales, debido a su importante grado de adaptabilidad fisiológica y genética.

Asimismo, según Ruiz Martínez (2007) cualquier hábitat con un rango de temperatura entre 4-42 °C, un pH entre 4-8 y que contenga compuestos orgánicos simples o complejos es un hábitat potencial para *Pseudomonas*, condiciones ambientales propias del medio acuático donde se muestreó.

Por otro lado, en la segunda campaña la Zona I y II, no presentaron desarrollo de bacterias del género *Pseudomonas*, y la Zona V, evidenció desarrollo pero sin fluorescencia con lo cual no estaríamos en presencia de este grupo de bacterias.



Imagen 15: Botellas con desarrollo y fluorescencia expuestas a la luz UV. (Fuente: Elaboración propia)

Según la Guía Canadiense (2012) para agua recreativa y la OMS (2005), *E. coli* es el microorganismo indicador utilizado para evaluar la aptitud del agua; y además no recomienda realizar pruebas para detectar la presencia de microorganismos patógenos (bacterias, virus, protozoos). Sin embargo, mencionan que en ciertas circunstancias, como durante las investigaciones de posibles brotes de enfermedades transmitidas por el agua, se justifica realizar pruebas de presencia a ciertos organismos patógenos como es el caso de *Pseudomonas*.

Recuento de bacterias del género *Pseudomonas*

En la tabla 3 se presentan los resultados del recuento de bacterias del género *Pseudomonas* mediante la técnica del Número Más Probable (NMP).

Tabla 3: Recuento de bacterias *Pseudomonas* del grupo fluorescente

Campaña de Muestreo	NMP bact. /100 ml				
	Zona I	Zona II	Zona III	Zona IV	Zona V
1°	23	23	23	23	43
2°	-	-	23	23	-

Es importante aclarar nuevamente, que los resultados están dados en función de la turbidez y fluorescencia con lo cual deben darse ambas condiciones. Una fluorescencia positiva nos habla de la presencia de especies del grupo Fluorescente, es decir *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* (ver Imagen 16).

Como era de esperarse, se pudo observar una correlación entre los valores de presencia/ausencia y los valores de recuento. Los sitios que evidenciaron en ambas campañas valores de 23 NMP de bacterias por cada 100 ml de muestra fueron las zonas III y IV como se muestra en la tabla 3.

Según Barahona Castillo *et al.* (2017) los valores de recuento de miembros del grupo *Pseudomonas* en cursos de agua puede deberse al vertido de líquidos cloacales ya que la frecuencia de este género de bacterias, y en especial *Pseudomonas aeruginosa*, en aguas de ríos está directamente relacionada con el grado de contaminación fecal derivada de aguas residuales.



Imagen 16: Tubos de ensayo bajo luz ultravioleta. (Fuente: Elaboración propia)

Si bien la calidad del agua de uso recreativo no es tan exigente como la de agua para consumo debería tenerse en cuenta la presencia del género *Pseudomonas* debido a su

patogenicidad, relación con la contaminación fecal y su capacidad de resistencia antibiótica. Según Ríos-Tobón *et al.* (2017) la característica más importante de *Pseudomonas* es su capacidad de inhibir coliformes, los indicadores de contaminación de agua más usados en el mundo, y esta situación podría dar una falsa impresión de seguridad o calidad del agua. Es por esto que se debería contemplar dentro de los monitoreos que se realizan en las aguas recreativas a este grupo de bacterias.

En cuanto a las zonas que no registraron presencia ni recuento en la segunda campaña, no se encontraron estudios previos en ambientes similares que puedan explicar la ausencia de este grupo de bacterias.

Aislamiento de cepas del género *Pseudomonas*

Para el aislamiento se utilizaron sólo los caldos provenientes de las anteriores pruebas que resultaron positivas a la luz UV, lográndose un total de 20 aislamientos con dichas características.

A continuación en las Imágenes 17, 18 y 19 se muestran distintas morfologías de las colonias que se aislaron, pudiendo ser lisas, rugosas, mucoides o gelatinoides (Cabello, 2007).



Imagen 17: Colonias fluorescentes del género *Pseudomonas*. (Fuente: Elaboración propia)

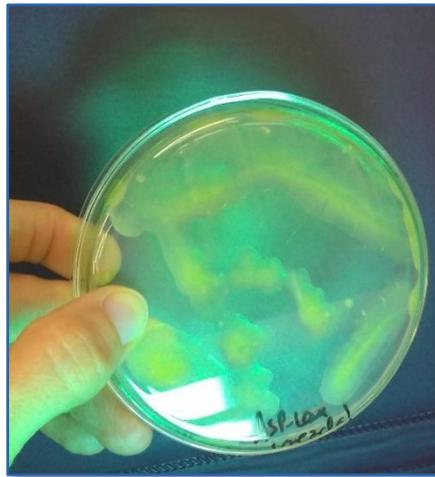


Imagen 18: Colonias fluorescentes del género *Pseudomonas*. (Fuente: Elaboración propia)



Imagen 19: Colonias fluorescentes del género *Pseudomonas*. (Fuente: Elaboración propia)

Según Britania (2019) los medios Cetrimida Agar Base y *Pseudomonas* Agar P son los más adecuados para la selección de bacterias del grupo Fluorescente de *Pseudomonas* ya que el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio estimulan la producción de pigmentos, razón por la cual se utilizaron estos medios sólidos selectivos.

Pruebas de identificación

Coloración de Gram

Esta prueba dio como resultado una coloración rosada de las colonias aisladas, propio de aquellas bacterias Gram-negativas. La observación al microscopio (ver Imagen 20) constató la presencia de bacilos alargados Gram-negativos.

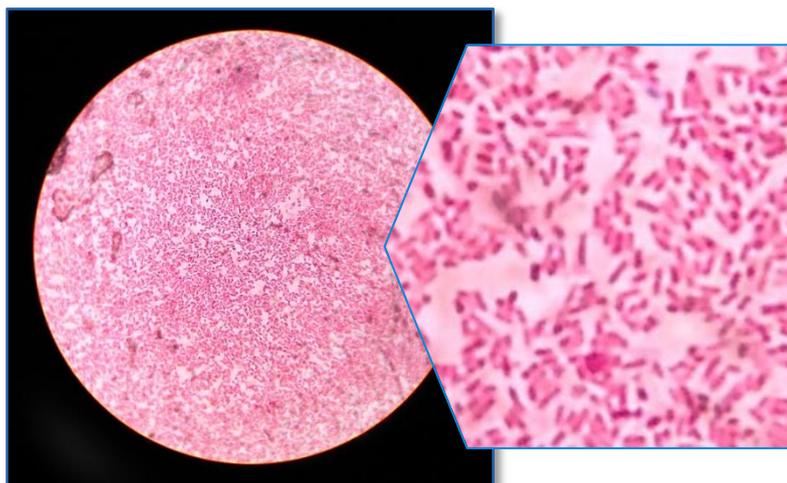


Imagen 20: Vista en microscopio óptico de bacterias del género Pseudomonas, haciendo zoom en un recorte para distinguir los bacilos (Fuente: Elaboración propia)

Esta prueba es, tal como lo indican Salazar y Echeverría (2000), un método diferencial porque divide a las bacterias en dos clases, Gram-negativas y Gram-positivas de acuerdo a los componentes predominantes de su pared celular, y permite así mismo la observación microscópica de la morfología, el tamaño y la agrupación.

Prueba de la Catalasa

Los resultados para la prueba de la Catalasa fueron positivos para los 20 aislamientos, observándose el burbujeo del oxígeno (ver Imagen 21).

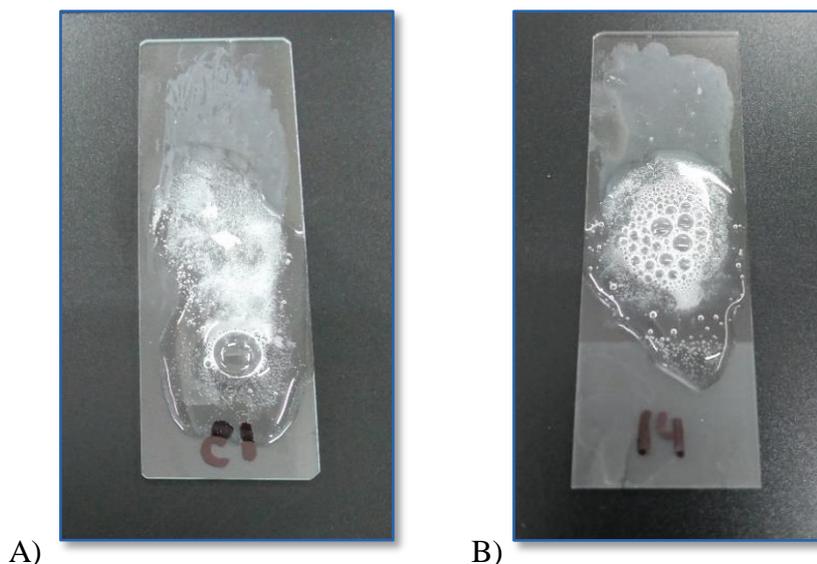


Imagen 21: A) y B) Rápida producción sostenida de burbujas de oxígeno sobre el extendido (Fuente: Elaboración propia)

Se evidenció el metabolismo oxidativo aeróbico de carbohidratos de estas bacterias a través del burbujeo con el peróxido de hidrógeno, como lo expresa Sánchez Bermúdez (2013), prueba positiva para este grupo de microorganismos que poseen citocromos.

Prueba de fluorescencia

Los 20 aislamientos presentaron fluorescencia al exponerlos a la luz ultravioleta, esto permitió constatar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* en los aislamientos, tal como es indicado por Cabello (2007).

Evaluación de susceptibilidad a Carbapenemes

Luego de la incubación de las placas se procedió a examinarlas y medir los diámetros de los halos de inhibición, como se observa en las imágenes 22, 23, 24 y 25.



Imagen 22: Antibiograma del aislamiento 8 (Fuente: Elaboración propia)

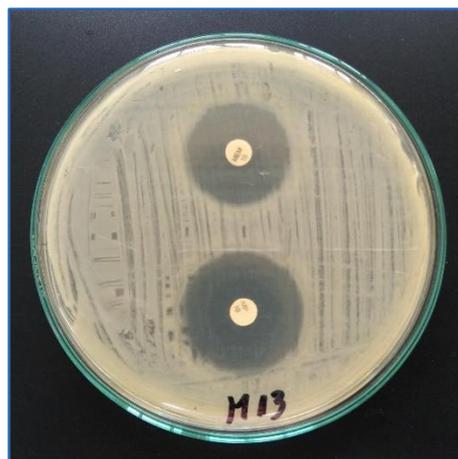


Imagen 23: Antibiograma del aislamiento 13 (Fuente: Elaboración propia)

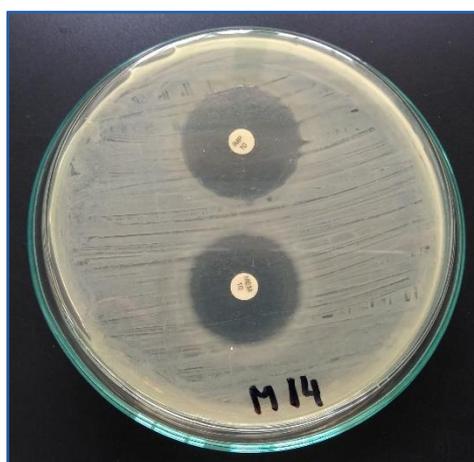


Imagen 24: Antibiograma del aislamiento 14 (Fuente: Elaboración propia)

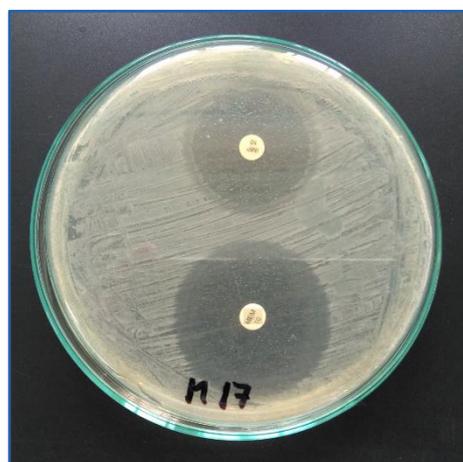


Imagen 25: Antibiograma del aislamiento 17 (Fuente: Elaboración propia)

A continuación, en la tabla 4 se presentan las mediciones de los halos de inhibición para Imipenem y Meropenem de los 20 aislamientos obtenidos.

Tabla 4: Medición de halos de inhibición para Imipenem y Meropenem

Cepas fluorescentes de <i>Pseudomonas</i>	IMIPENEM	MEROPENEM
	Diámetro de inhibición (mm)	Diámetro de inhibición (mm)
Aislamiento 1	19	17
Aislamiento 2	13	13
Aislamiento 3	16	18
Aislamiento 4	15	17
Aislamiento 5	16	17
Aislamiento 6	16	17
Aislamiento 7	16	18
Aislamiento 8	14	16
Aislamiento 9	20	18
Aislamiento 10	20	17
Aislamiento 11	21	17
Aislamiento 12	20	17
Aislamiento 13	15	12
Aislamiento 14	14	12
Aislamiento 15	15	16
Aislamiento 16	14	18
Aislamiento 17	15	19
Aislamiento 18	16	18
Aislamiento 19	8	6
Aislamiento 20	15	17

Respecto al antibiótico Imipenem se hallaron 10 (50%) cepas con resistencia, 5 (25%) cepas tuvieron sensibilidad intermedia y otras 5 (25%) fueron sensibles, esta información se puede observar en el Gráfico 1. Estos resultados son distintos a los encontrados por Pulido Beltrán *et al.* (2017) en un estudio de resistencia antimicrobiana realizado en muestras hídricas de fuentes naturales y artificiales, donde *Pseudomonas spp.* no presentó resistencia a Imipenem. Asimismo, Gutiérrez Cárdenas *et al.* (2017) halló que *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de agua de uso agrícola presentó sensibilidad a este antibiótico.

La existencia de resistencia a Imipenem puede deberse a que éste es capaz de inducir los mecanismos de resistencia que un aislamiento tiene latentes. Según Gómez Álvarez *et al.* (2005) Imipenem tiene el más alto riesgo de inducir resistencia en bacterias clínicas previamente sensibles a este antibiótico.

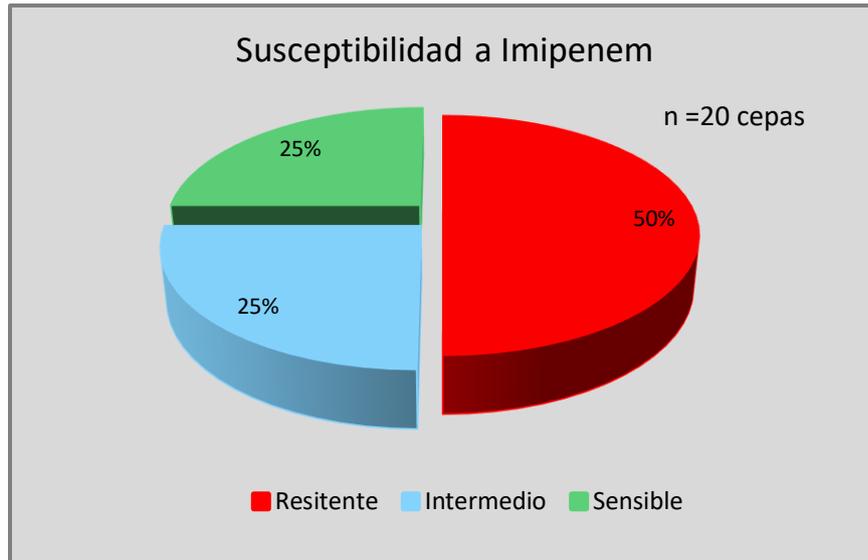


Gráfico 1: Resultados de susceptibilidad de los aislamientos frente a Imipenem.

En cuanto al antibiótico Meropenem se observó que 4 (20%) aislamientos tenían resistencia, 15 (75%) aislamientos presentaron sensibilidad intermedia y sólo 1 (5%) cepa demostró ser sensible (ver Gráfico 2). Según Ruíz Martínez (2007) la resistencia hallada en estos aislamientos podría deberse a la alteración en las bombas de reflujo MexAB-oprM presentes en estas bacterias, lo cual modifica la susceptibilidad de estas cepas frente a este antibiótico.

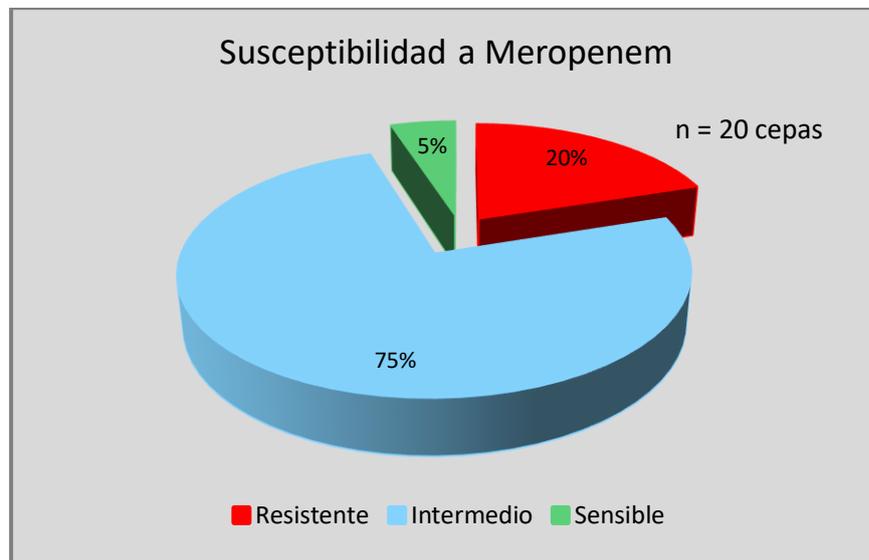


Gráfico 2: Resultados de susceptibilidad de los aislamientos frente a Meropenem.

Se observó también, que del comportamiento de los aislamientos frente a los dos antibióticos 4 (20%) cepas presentaron resistencia y sólo 5 (25%) mostraron una sensibilidad intermedia (ver Gráfico 3). El resto de los aislamientos presentaron

condiciones variadas como sensibilidad a Imipenem y sensibilidad intermedia a Meropenem, o resistencia a Imipenem y sensibilidad intermedia a Meropenem.

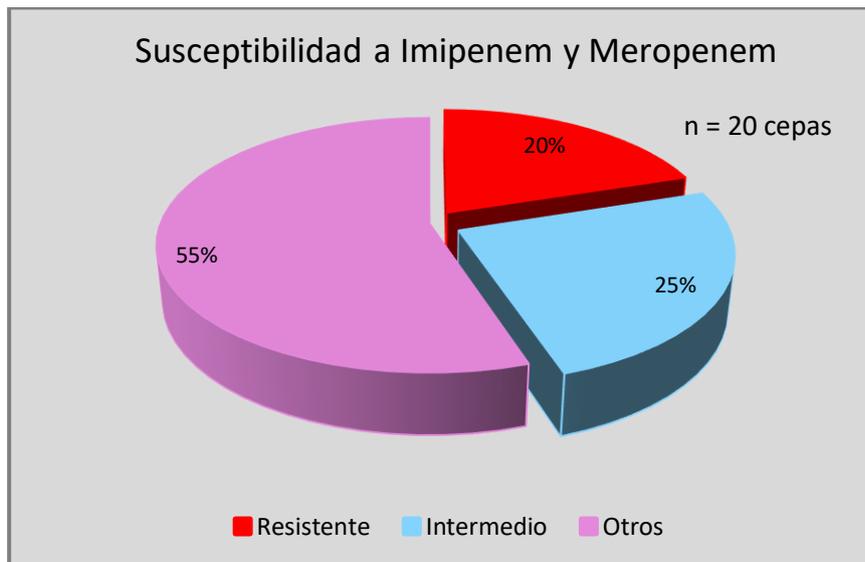


Gráfico 3: Resultados de susceptibilidad de los aislamientos frente a Imipenem y Meropenem.

Según Nicolau & Oliver (2010), el 20% de los aislamientos que resultaron resistentes a los dos antibióticos, mostrados en el gráfico 3, podría estar relacionado con la represión o inactivación de la porina OprD que se encuentra en la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*, la que es utilizada específicamente por los carbapenemes para ingresar a la célula bacteriana. Estos autores resaltan la importancia de hallar resultados como estos debido a que brindan una idea del potencial riesgo para la salud que representan las cepas ambientales con resistencia antibiótica.

A su vez estos resultados se acercan a los obtenidos por Santella *et al.* (2011) en un trabajo donde se analizó la contribución de distintos mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenemes (Imipenem y Meropenem) en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* caracterizados como productores de metalcarbapenemasas; en el cual se comprobó que 5 de los 20 aislamientos estudiados fueron resistentes a los dos carbapenemes y el resto fue sensible según los puntos de corte del CLSI.

La importancia de los valores hallados respecto al grupo de bacterias estudiadas nos alertan sobre la existencia de genes de resistencia en un ambiente natural y la posibilidad de transferirse a otras bacterias. Nicolau & Oliver (2010) explican que si bien *Pseudomonas aeruginosa* es la de mayor importancia clínica debido a las infecciones nosocomiales y su resistencia natural a una gran variedad de antibióticos, las otras especies del género, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, también pueden causar problemas epidemiológicos y, aún más importante, ser un reservorio ambiental de

determinantes de resistencia que pueden ser transmitidos a otras especies de mayor relevancia. Según Gaze (2017) la contaminación del ambiente con bacterias patógenas resistentes a los agentes antimicrobianos plantea un riesgo real no solamente como fuente de infección sino como fuente de plásmidos de resistencia que pueden ser fácilmente diseminados a otras bacterias patógenas de diversos orígenes.

Por otro lado, los valores de resistencia frente a los dos antibióticos nos confirman la presencia de bacterias multirresistentes del grupo *Pseudomonas*, lo que es de suma relevancia ya que estas bacterias tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes. La Organización Mundial de la Salud en 2017 elaboró una lista con los “patógenos prioritarios” resistentes a antibióticos, donde *Pseudomonas* se encuentra dentro de la categoría de “prioridad crítica” por ser bacterias multirresistentes (ver Anexo II). Según Serra Valdés (2017) esta multirresistencia hallada podría deberse a la presencia de más de una bomba de expulsión de la familia de resistencia división nodular (RND) en las cepas aisladas.

Conclusiones y Recomendaciones

En función a los objetivos fijados para esta tesis se confirmó la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* que presentan fluorescencia, en el tramo del río Limay comprendido entre las localidades de Senillosa y de Plottier.

Los valores de presencia/ausencia se correlacionaron con los valores de recuento. Los sitios que evidenciaron en ambas campañas valores de 23 NMP de bacterias por cada 100 ml de muestra fueron las zonas III y IV. Estos valores de recuento de miembros del grupo *Pseudomonas* en cursos de agua podrían estar relacionados al vertido de líquidos cloacales y por lo tanto con el grado de contaminación fecal. Por esta razón y por su capacidad de inhibir coliformes también se consideró importante la necesidad de incorporar este género dentro de los monitoreos realizados a las aguas de uso recreativo. Si bien la Guía Canadiense para la calidad del agua recreativa y la OMS toma a *Escherichia coli* como microorganismo indicador de la aptitud del agua, establece que en ciertas circunstancias debe analizarse la presencia de *Pseudomonas*.

Se logró el aislamiento de cepas de cada muestra de agua correspondiente a las distintas zonas de muestreo, verificando posteriormente a través de la tinción de Gram, la prueba de la catalasa y de la fluorescencia que se trataba del grupo fluorescente del género *Pseudomonas*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*.

La evaluación de susceptibilidad de las cepas aisladas frente al antibiótico Imipenem arrojó un 50 % de resistencia, lo que puede deberse a que este antibiótico es capaz de inducir los mecanismos de resistencia que una cepa tiene latentes en sus genes.

Por otro lado, los resultados de susceptibilidad para Meropenem mostraron que un 20% de los aislamientos eran resistentes, lo que podría deberse a la alteración en las bombas de reflujo MexAB-oprM de estas bacterias.

Los resultados de susceptibilidad a los dos antibióticos del grupo Carbapenemes mostraron una multiresistencia del 20% de las cepas aisladas. Esto podría estar relacionado con la represión o inactivación de la porina OprD que se encuentra en la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*. A su vez, podría estar relacionado a la presencia de bombas de expulsión de la familia RND según Serra Valdés (2017). Estos resultados son importantes debido a que brindan una idea del potencial riesgo para la salud que representan las cepas ambientales con resistencia antibiótica.

Nicolau & Oliver (2010) y Gaze (2017) destacan la importancia de este grupo de bacterias ya que tanto *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* plantean un riesgo real como fuente de infección y fuente de plásmidos de resistencia que pueden ser fácilmente diseminados a otras bacterias patógenas de diversos orígenes.

Asimismo, la presencia de bacterias multirresistentes del grupo *Pseudomonas*, es de suma relevancia ya que estas bacterias tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos. La Organización Mundial de la Salud en 2017 elaboró una lista con los “patógenos prioritarios” resistentes a antibióticos, donde *Pseudomonas* se encuentra dentro de la categoría de “prioridad crítica” por ser bacterias multirresistentes.

La exposición humana ya sea por contacto directo o indirecto a bacterias del grupo *Pseudomonas* fluorescente y con genes de resistencia antibiótica en el tramo de estudio del río Limay son un hecho comprobable. Es por ello que se recomienda:

- ✓ Continuar el estudio de bacterias ambientales resistentes y su capacidad de transferir horizontalmente los genes de resistencia.
- ✓ Estudiar la influencia de las variables fisicoquímicas con respecto a este grupo de bacterias.
- ✓ Realizar monitoreos microbiológicos y de susceptibilidad en zonas de descargas puntuales cercanas a plantas de tratamiento.
- ✓ Establecer un sistema de vigilancia que incluya al grupo *Pseudomonas* dentro de los monitoreos ambientales.
- ✓ Continuar con este tipo investigación a fin de poder establecer puntos de corte propios para estas cepas aisladas del ambiente.
- ✓ Incorporar en los monitoreos que realiza la autoridad de aplicación para la habilitación de zonas recreativas el análisis de estas cepas.

Bibliografía

- Acevedo Barrios R L, Severiche Sierra C A & Jaimes Morales J C (2015). Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. Artículo de revisión. Producción + limpia. Vol 10, N°2.
- Aguiló I P (2017). Las bacterias contraatacan. Biol. on-line: Vol. 6, N° 2.
- Alós J I (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. 33, Suplemento 10.
- APHA (American Public Health Association) (1992). Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. Editorial Díaz de Santos, Madrid, España.
- Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro (AIC). Límites de la cuenca del río Limay. Publicado por Secretaría de Planificación y Desarrollo el 18/01/2017. Recuperado de: <http://www.aic.gob.ar/sitio/publicaciones-ver?a=40&z=113245710>
- Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro (AIC) (2019). Registros de caudales medios diarios del 09/03/2019 al 13/03/2019 y del 13/04/2019 al 22/04/2019. Información solicitada vía e-mail.
- Ayokunle C & Ahmad A (2013). Speciation and antimicrobial resistance of Enterococci isolated from recreational beaches in Malaysia. Env. Mon. Ass.
- Barahona Castillo Y M, Luna Fontalvo J A, Romero Borja I M (2017). Calidad bacteriológica del agua de los ríos Manaure y Casacará, Departamento del Cesar, Colombia.
- Basualdo J A, Coto C E, de Torres R A (1996). Microbiología Biomédica. Editorial Atlantis.
- Cabello R R (2007). Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial Médica Panamericana.
- Changing Markets & Ecostorm (2016). Resistencia a los antibióticos: Cómo la contaminación de las fábricas de medicamentos en India y China está disparando la aparición de las superbacterias. Recuperado de: <https://www.ecologistasenaccion.org>
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2012) M2-A11: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test: Approved Standard- Eleventh Edition. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

-CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2018) M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

-Conte J E (1995). Manual of Antibiotics and Infectious Diseases. 8ª edición.

- Esparza Olcina M J (2008). Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos. Guía-ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico [en línea] [actualizado el 22/11/2008; Disponible en <http://www.guia-abe.es>

-Gaze W (2017). Informe del PNUMA. Fronteras. Recuperado de: <https://wedocs.unep.org>

- Gómez Álvarez C A, Leal Castro A L, Pérez de Gonzalez M J, Navarrete Jiménez M L (2005). Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. Revista Facultad Medicina Universidad Nacional Colombia Vol. 53 N° 1.

-Gutiérrez Cárdenas, Navarro Ibarra, Loeza Lara, del Río Rodríguez, Jiménez Mejía (2017). Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola. Nova scientia Vol.9 N°19.

-Junco Díaz R A, Suárez Pita M, Weng Alemán Z, *et al.* (2006). Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. Higiene y Sanidad Ambiental.

-Koneman E, Allen S (2008). Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color. Editorial Médica Panamericana.

-Kümmerer K. (2004). Resistance in the environment. Journal of Antimicrobial Chemother.

-Laboratorios Britania S.A. (2019). En: www.britanialab.com

-Larrosa Nieves (2011). Lectura interpretada del antibiograma: Visión microbiológica. Barcelona. Recuperado de: <https://www.academia.cat/files/425-2432-DOCUMENT/Larrosa-23-4Oct11.pdf>

-Lazovski J, Corso A, Pasteran F, Monsalvo M, Frenkel J, Cornistein W *et al.* (2017). Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. Revista Panamericana Salud Pública.

-Lösch L S, Merino L A & Alonso J M (2004). Resistencia antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de fuentes de agua de la provincia del Chaco

(Argentina). Informe preliminar. Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste.

-Ministerio de Salud, Resolución 125/2016. Directrices sanitarias para uso seguro de aguas recreativas.

-Moreno C, González R, Beltrán C. (2009). Artículo de revisión. Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello.

-Mosquito S, Ruiz J, Bauer J L & Ochoa T J (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública

-Murray P R *et al.* (1995). Manual of Clinical Microbiology. 6ª edición. American Society for Microbiology.

-National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Division of Healthcare Quality Promotion. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). Noviembre 2015 Update – CRE Toolkit.

-Nicolau C J & Oliver A (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. 28, Supplement 1.

-Pulido Beltrán J A, Rodríguez X A, Méndez I A (2017). Perfil de resistencia antimicrobiana en bacilos Gram negativos no fermentadores aislados en fuentes hídricas. Revista Médica.

-Ríos-Tobón S, Agudelo-Cadavid R M, Gutiérrez-Builes L A (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Revista Facultad Nacional Salud Pública.

-Rizzo L, Manaia C, Fatta D (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into environment: A review. Sci. Tot. Env.

-Rocha C, Reynolds N D, Simons M P (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública

-Ruiz Martínez L (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. España.

- Salazar F M del R, Echeverría C, Pilar E. (2000) Manual de Bacteriología Veterinaria. UADY. Mérida Yucatán, México.

-Sánchez Bermúdez D (2013). Estudio molecular de poblaciones de *Pseudomonas* ambientales. Tesis doctoral. Departamento de Biología. Universitat de les Illes Balears. España.

-Sandoval Guzmán A B (2016). Identificación de *Pseudomona aeruginosa* en el equipo de anestesia inhalatoria en 20 clínicas y hospitales veterinarios de la ciudad de Quito mediante estudios microbiológicos. Trabajo de tesis. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de las Américas .Ecuador.

-Santella G, Pollini S, Docquier J, Almuzara M, Gutkind G, Rossolini G M, *et al.* (2011). Resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos. Revista Panamericana Salud Pública.

-Schlenker M I (2013). Estudio de resistencia a antibióticos en enterobacterias en aguas recreativas de balnearios del Río Limay en la ciudad de Neuquén. Neuquén Capital, Universidad Nacional del Comahue, Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud.

- Serra Valdés M A (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Revista Habanera de Ciencias Médicas [revista en Internet]. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2013>

-SICU, Sociedad de Infectología Clínica del Uruguay (2011). Uso de antimicrobianos en infecciones por microorganismos multi y panresistentes y Guías para el tratamiento de bacterias productoras de KPC.

- Servicio Meteorológico Nacional (SMN). Registros de temperaturas mínimas y máximas diarias en la estación meteorológica Neuquén Aero para los meses de marzo y abril de 2019. Recuperado de: <https://www.smn.gob.ar/descarga-de-datos>

Anexos

Anexo I: Parámetros en aguas dulces recreativas

Tabla 5: Valores guía de indicadores en aguas dulces recreativas en distintos países y organizaciones

País/ organización	Indicador para agua dulce	Formato y valores guía	Referencias
U.S. EPA ^a	<i>E. coli</i>	Media geométrica concentración: 126/100 mL Muestra simple concentración máxima: ^b 235/100 mL	U.S EPA, 2002
	<i>Enterococos</i>	Media geométrica concentración: 33/100 mL Muestra simple concentración máxima: ^b 62/100 mL	
OMS	Enterococos intestinales ^c	95th percentil/100 mL: A: ≤40 B: 41-200 C: 201-500 D: >500	OMS, 2003 ^a
Australia	Enterococos intestinales ^c	95th percentil/100 mL: A: ≤40 B: 41-200 C: 201-500 D: >500	NHMRC, 2008
Unión Europea	Enterococos intestinales	95th percentil/100 mL: Excelente: 200 /100 mL Bueno: 400/100 mL 90th percentil/100 mL: Suficiente: 330/100 mL	UE, 2006
	<i>E. coli</i>	95th percentil/100 mL: Excelente: 500 /100 mL Bueno 1000/100 mL 90th percentil/100 mL: Suficiente: 900/100 mL	
Canadá	<i>E. coli</i>	Media geométrica concentración: ≤ 200/100 mL Muestra simple concentración máxima: ≤ 400/100 mL	Canadá, 2012
	<i>Enterococos</i>	Media geométrica concentración: ≤ 35/100 mL Muestra simple concentración máxima: ≤ 70/100 mL	

Adaptado de Guías para calidad de aguas recreativas Canadá 2012.

a - Tenga en cuenta que en la actualidad se están elaborando nuevos criterios que podrían estar disponibles en 2012.

b - Zona de playa designada (nivel de confianza del 75%).

c - Recomienda que se utilicen directrices para las aguas costeras hasta que se disponga de más datos sobre el agua dulce.

Anexo II: Comunicado de prensa de la OMS

La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos

27 de febrero de 2017 | Comunicado de prensa | GINEBRA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publica hoy su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana.

La lista se ha elaborado para tratar de guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, como parte de las actividades de la OMS para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos.

En la lista se pone de relieve especialmente la amenaza que suponen las bacterias gramnegativas resistentes a múltiples antibióticos. Estas bacterias tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes.

«Esta lista es una nueva herramienta para garantizar que la I+D responda a necesidades urgentes de salud pública», señala la Dra. Marie-Paule Kieny, Subdirectora General de la OMS para Sistemas de Salud e Innovación. «La resistencia a los antibióticos va en aumento y estamos agotando muy deprisa las opciones terapéuticas. Si dejamos el problema a merced de las fuerzas de mercado exclusivamente, los nuevos antibióticos que con mayor urgencia necesitamos no estarán listos a tiempo».

La lista de la OMS se divide en tres categorías con arreglo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media.

El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre tales bacterias se incluyen las siguientes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus*. Son bacterias que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías.

Estas bacterias han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (los mejores antibióticos disponibles para tratar las bacterias multirresistentes).

Los niveles segundo y tercero de la lista –las categorías de prioridad alta y media– contienen otras bacterias que exhiben una farmacoresistencia creciente y provocan enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias por salmonela.

Esta semana se reúnen en Berlín los expertos en salud del G20. En palabras del Sr. Hermann Gröhe, Ministro Federal de Salud de Alemania, «necesitamos antibióticos eficaces para nuestros sistemas de salud. Debemos actuar unidos hoy para un mañana más sano. Así pues, examinaremos y señalaremos a la atención del G20 la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos. La primera lista mundial de la OMS de patógenos prioritarios es una nueva herramienta importante para garantizar y guiar la investigación y el desarrollo que permita lograr nuevos antibióticos».

La lista tiene por objeto animar a los gobiernos a que establezcan políticas que incentiven la investigación científica básica y la I+D avanzada tanto a través de organismos financiados con fondos públicos como del sector privado que inviertan en el descubrimiento de nuevos antibióticos. Asimismo proporcionará orientaciones a nuevas iniciativas de I+D como la Alianza mundial de I+D OMS/DNDi para los antibióticos, que está comprometida con el desarrollo de nuevos antibióticos sin ánimo de lucro.

El bacilo de la tuberculosis, cuya resistencia al tratamiento tradicional ha ido en aumento en los últimos años, no fue incluido en la lista porque es objeto de otros programas específicos. Otras bacterias que no fueron incluidas, como los estreptococos de los grupos A y B y *Chlamydia*, tienen bajos niveles de resistencia a los tratamientos existentes y no representan actualmente una amenaza significativa para la salud pública.

La lista se elaboró en colaboración con la División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Tübingen (Alemania), mediante una técnica de análisis de decisiones de múltiples criterios desarrollada por un grupo de expertos internacionales. Los criterios para incluir patógenos en la lista fueron los siguientes: el grado de letalidad de las infecciones que provocan; el hecho de que el tratamiento requiera o no una hospitalización larga; la frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes cuando infectan a las personas de las comunidades; la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas; si las infecciones que provocan pueden o no prevenirse (por ejemplo, mediante una buena higiene y

vacunación); cuántas opciones terapéuticas quedan; y si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan.

«Los nuevos antibióticos desarrollados contra los patógenos prioritarios que figuran en esta lista contribuirán a reducir las muertes debidas a infecciones resistentes en todo el mundo», dice la profesora Evelina Tacconelli, Jefa de la División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Tübingen y una de las personas que más han contribuido a la elaboración de la lista. «Esperar más producirá problemas adicionales de salud pública y repercutirá enormemente en la atención a los pacientes».

Aunque es esencial aumentar la I+D, esta solo no basta para solucionar el problema. Para luchar contra la resistencia, tiene que haber también una mejor prevención de las infecciones y un uso apropiado de los antibióticos existentes en la medicina humana y veterinaria, así como un uso racional de cualquier nuevo antibiótico que se desarrolle en el futuro.

Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos

Prioridad 1: CRÍTICA

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
- Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL

Prioridad 2: ELEVADA

- *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
- *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
- *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina
- *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas
- *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas

Prioridad 3: MEDIA

- *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina
- *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
- *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas

Publicado en: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>