

## **INHIBICIÓN DE *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* POR METABOLITOS DE *Pseudomonas aeruginosa*.**

Oriani, D. S.; Garro A del C.; Staskevich, A.S.; Alvarez Rubianes N.

Cátedra Microbiología Especial y Virología. Cátedra Microbiología General e Inmunología Básica. Departamento de Epizootiología y Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPamp.

### **RESUMEN**

Nuestra experiencia en el procesamiento de muestras clínicas veterinarias, nos indica que cuando se aísla *Pseudomonas aeruginosa* este es el único organismo involucrado.

Los metabolitos que produce *P. aeruginosa* presentan actividad inhibitoria in vitro sobre otros microorganismos, comportándose algunos de ellos como factores de patogenicidad, debido a que favorecen su propia colonización por efecto de antagonismo microbiano. El objetivo del presente trabajo es comprobar la acción tanto in vitro como in vivo, de los metabolitos de *P. aeruginosa*, así como su inocuidad en ratones.

La acción inhibitoria in vitro se comprobó mediante la técnica de difusión en agar, previa obtención de los mismos por filtración del caldo Tripticasa Soya inoculado con la cepa de referencia ACTT 27853. Las cepas a ensayar fueron *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* aisladas a partir de leche de bovinos con mastitis resistentes a los tratamientos convencionales. La inocuidad en ratones se determinó comparando dos grupos de 20 animales de igual peso y edad, no registrándose diferencias significativas en el aumento de peso entre el grupo inoculado con el filtrado de cultivo y el grupo control (Test de Student  $p=0,84$ ). Se determinó la acción inhibitoria in vivo, inoculando en ratones la dosis letal y la dosis reactiva para las cepas de *S. agalactiae* y *S. aureus* respectivamente.

El porcentaje de mortalidad y de morbilidad de los animales inoculados con el filtrado fue del 20%, mientras que el grupo control fue del 80%. Los resultados sugieren que los productos metabólicos de *P. aeruginosa* impiden la proliferación de *S. aureus* y *S. agalactiae* tanto in vivo como in vitro, además de ser inocuos para los ratones en la dosis ensayada. Por lo expuesto consideramos que es posible su aplicación en la terapia de infecciones, a los microorganismos citados, resistentes a los tratamientos convencionales.

### **SUMMARY**

Our experience in the process of veterinary clinical samples shows that the sole microorganism involved in the majority of the infectious processes is the *Pseudomonas aeruginosa*.

The metabolites produced by *P. aeruginosa* present an inhibitory activity upon other microorganism in vitro, some of them behaving as pathogenicity factors as they favor the colonization by microbial antagonism. The aim of the present work is to verify the inhibitory action of metabolites in vivo and in vitro and its innocuous effect on mice as well.

The inhibitory action in vitro in the metabolic products of *P. aeruginosa* is verified by means of a usual technique the agar diffusion antibiogram, being these products previously obtained by Tripticasa Soya broth filtrate inoculated with ATCC 27853 strain. The strains to be tested were: *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, isolated from milk coming from cows suffering from conventional treatments.

The harmless effect on mice comparing two groups of 20 animals of same weight and age was fixed while no significant differences on gain weight between the group of mice inoculated with the culture filtrate and the control group (Student test  $p=0,84$ ) were recorded. To verify the inhibitory action in vivo on mice, a lethal and a reactive dose are

determined for the *S. agalactiae* and *S. aureus* strains respectively. The results seen to show that the metabolic products of *P. aeruginosa* hinder the proliferation of *S. aureus* and *S. agalactiae* in vivo as well as in vitro, being harmless for the mice treated with the tested dose. As a conclusion, we consider it possible to apply these metabolic products in the infection therapy in microorganisms resistant to commercial antibiotics.

## **INTRODUCCION**

En gran parte de los procesos infecciosos en los que se aísla *Pseudomonas aeruginosa* este, es el único microorganismo involucrado.

*P. aeruginosa* es un bacilo Gram(-), oxidasa (-), requiere oxígeno o algún otro aceptor inorgánico de electrones, crece en anaerobiosis en presencia de nitratos u otro compuesto similar, presenta metabolismo no fermentativo, es móvil por sus flagelos polares, no esporulado, no capsulado. Son organismos ubicuos, ecológicamente importantes en suelo y agua por su capacidad para degradar aerobicamente compuestos solubles provenientes de animales y vegetales. Además se lo aísla de tierra como un agente denitrificador. Su poder patógeno para los animales radica en la capacidad de formar microcolonias, la presencia del lipopolisacárido (LPS) o endotoxina de la pared celular, la liberación de exotoxinas, entre ellas la exotoxina A que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, hemolisisnas, fosfolipasas y elastasas, que contribuyen a la invasividad del microorganismo.

*P. aeruginosa* produce metabolitos secundarios entre ellos la piocianina que presenta actividad bactericida in vitro siendo este un factor de patogenicidad, debido a que favorece la colonización al evitar la competencia microbiana.

El presente trabajo pretende buscar apoyo empírico para la siguiente **hipótesis**:

Los metabolitos secundarios de *P. aeruginosa* inhiben el desarrollo in vitro e in vivo de *S. aureus* y *S. agalactiae* aislados de leche de bovinos con mastitis resistentes a antibióticos comerciales.

## **OBJETIVOS**

- Comprobar la acción bactericida de los productos metabólicos de *P. aeruginosa* tanto in vitro e in vivo.
- Comprobar su inocuidad en ratones.

## **MATERIALES Y METODO.**

- **OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS IN VITRO:** Se cultivo una cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en caldo Trypticasa Soya durante 48-96 h a 37°C, posteriormente se expusieron los cultivos a la luz y se agitaron durante 24 h. Los metabolitos secundarios se producen cuando el organismo alcanza la fase estacionaria de crecimiento. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos, y el sobrenadante se esterilizó por filtración usando membranas 0,45 um y 0,2 um. Se efectuaron controles de esterilidad en aerobiosis con agar Trypticasa Soya; en anaerobiosis con agar Tioglicolato en jarra Gas Pak y medio de Saboureaux en aerobiosis.
- **COMPROBACION DE LA ACCIÓN BACTERICIDA IN VITRO:**  
Método 1: según el esquema clásico de siembra por estría de Flemming. Contrastando con las bacterias más comúnmente aisladas en mastitis bovina resistente: *S. aureus*, *S. agalactiae*.

Método 2: Técnica de Kirby Bauer de difusión en placa con agar Müeller Hinton, se embebieron discos de papel de filtro watman N1 en el filtrado de cultivo previamente obtenido, y se ensayaron las mismas bacterias. A las 24 h de incubación se efectuó la lectura de los halos de inhibición.

- COMPROBACIÓN DE LA ACCIÓN BACTERICIDA IN VIVO:

1) Determinación de la dosis letal 50% para *Streptococcus agalactiae*.

Se formaron 4 grupos de ratones de igual peso y edad, de 20 animales cada uno, a cada uno de ellos se les inoculó por vía subcutánea 0,5 ml de suspensiones de cultivo joven de 24 h equivalentes a nº 7, 8,9,10 de Mc. Farland. La dosis letal resultó el número 10 de la escala de MC. Farland. Murieron 16 de los 20 animales inoculados entre las 24 y 48 h posteriores a la inoculación, presentando previamente a la muerte los siguientes síntomas: deshidratación, pérdida de apetito, conjuntivitis, diarrea, falta de respuesta a estímulos externos. En la necropsia, presentaron: edema en subcutáneo, intestino con gas y sin contenido, hígado friable y con petequias en la superficie, vesícula biliar pletórica. En los cuatro ratones sacrificados a las 72 h se observan las mismas lesiones con menor severidad y en el sitio de inoculación se observó un pequeño absceso(5 mm).

2) Determinación de la dosis reactiva para *Staphylococcus aureus*:

Se inocularon 20 ratones de 20-30 g con 0,5 ml de una suspensión de *St.aureus* que corresponde a una opacidad de 10 UI del patrón internacional.. Cuatro de los ratones murieron a las 24 h, al resto de los animales se los sacrificó al décimo día pos inoculación, observándose abscesos purulentos que comprometieron todo el miembro inoculado y se extendió al subcutáneo de la región abdominal ( 2cm x 2 cm).

3) Una vez establecida la dosis reactiva y letal. Se formaron dos grupos de animales (20 animales de igual peso y edad) por cada cepa a ensayar. El grupo control se inoculó con 0,5 ml vía SC de solución estéril de Cl Na 0,85 %; el grupo problema se lo inoculó con el filtrado de cultivo, utilizando igual dosis y vía de administración. A las 48 h se efectuó la descarga de los microorganismos en las dosis predeterminadas.

- COMPROBACION DE LA INOCUIDAD EN RATONES:

Se formaron dos grupos de 20 ratones cada uno de la misma edad y con pesos entre 24 y 32 g distribuidos en cajas de 5 ratones cada uno. A uno de los grupos se le inoculó en forma subcutánea 0,5 ml del filtrado de cultivo y al grupo control 0,5 ml solución de Cl Na 0,85 % estéril. Se registró el peso cada dos días, se controló el alimento y agua consumidos. Los ratones inoculados con el filtrado de cultivo no registraron diferencias significativas de peso, respecto al grupo control ( Test de Student  $p= 0,84$ ).

## RESULTADOS

Las cepas de *S. aureus* y *S. agalactie* consideradas en el experimento mostraron ser sensibles a los metabolitos de *P. aeruginosa* Observándose en el método de Kirby Bauer un halo de inhibición de 20 mm.

No hubo diferencias significativas en el peso de los animales inoculados con el placebo y con el filtrado del cultivo de *P. aeruginosa* con un  $p= 0,84$ . Los animales previamente

inoculados con el filtrado de cultivo de *P. aeruginosa*, no mostraron síntomas de enfermedad hasta 30 días posteriores a la descarga de la dosis reactiva y letal de *S. aureus* y *S. agalactiae* respectivamente, siendo el porcentaje de morbilidad y mortalidad del 20% en los grupos protegidos por el filtrado del cultivo de *P. aeruginosa*, mientras que en el grupo control fue de 80%.

### Conclusiones

Los metabolitos de *Pseudomonas aeruginosa* inhiben el desarrollo de *S. aureus* y *S. agalactiae* tanto in vivo como in vitro, demostraron además ser inocuos, para el modelo animal seleccionado, en las condiciones del ensayo.

Por lo expuesto consideramos que es posible su aplicación en la terapia de infecciones a estos microorganismos, resistentes a los tratamientos convencionales.

### BIBLIOGRAFIA.

1. Johansen, H.K., F. Espersen, S. J. Cryz Jr., H.P.Hougen, A. Fomsgaard, J. Rygaard and N. Hoiby. 1994. Inmunización with *Pseudomonas aeruginosa* vaccines and adjuvant can modulate the type of inflammatory response subsequent to infection. *Infect.Immun.* 62: 3146-3155.
2. Döring, G., M. Maier, E. Müller, Z. Bibi, B. Tümmler, and A. Kharazmi. 1987. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. In G. Döring, I.A. Holder, and K. Botzenhart, editors. *Basic research and clinical aspects of Pseudomonas aeruginosa*, Vol.39. Karger, Basel. 136-148.
3. Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A.1996. In *Microbiology Third Edition*. Wm. C. Brown Publishers.
4. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. 1995.Editors Roth, J.A; Bolin, C.A.; Brogden, K.A.; Minion, F.C. & Wannemuehler, M.J. Second Edition . ASM Press.