

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN ACINETOBACTER BAUMANNII BIOTIPOS 9 Y 8 AISLADOS DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS EN CHILE

Dres. María Angélica Martínez T *, Carlos Muñoz-Astete **, Luis Strozzi V. **, María Eugenia Pinto C *.

* Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Microbiología.

** Hospital José Joaquín Aguirre, Departamento de Oftalmología, Laboratorio de Patología ocular, Unidad de Microscopía Electrónica.

Correspondencia :

Dr. Carlos Muñoz-Astete

Hospital José Joaquín Aguirre

Laboratorio de Patología Ocular

Financiamiento: Proyecto Fondecyt N° 1951044

SUMMARY

ELECTRON MICROSCOPY ON ACINETOBACTER BAUMANNII BIOTYPES 9 AND 8 ISOLATED FROM NOSOCOMIAL INFECTIONS IN CHILE

Acinetobacter baumannii has emerged in the last years as an important nosocomial agent. Of the nineteen biotypes constituting this species, biotypes 9 and 8 represent approximately 90% of the isolates in our country. The factors that contribute to its greater virulence and prevalence are at present not known. In this study we have investigated by electron microscopy the presence of capsule in two strains of *A. baumannii* biotypes 9 and 8, isolated from patients during 1995 at the Hospital San Juan de Dios. Overnight cultures were stained with Alcian blue and incubated with homologous biotype specific antisera. The strains were also studied for the presence of capsule by light microscope and for surface hydrophobicity. Both isolates showed a dense polysaccharide capsular layer electronmicroscopically. The isolates were highly

hydrophilic and showed a distinct halo compatible with a capsule by light microscopy. The capsule could confer prevalent isolates greater virulence which could explain its higher prevalence in Chilean hospitals.

RESUMEN

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN ACINETOBACTER BAUMANNII BIOTIPOS 9 Y 8 AISLADOS DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS EN CHILE

Acinetobacter baumannii ha emergido en los últimos años como una etiología importante de Infecciones intrahospitalarias (IIH). De los 19 biotipos que conforman la especie, los biotipos 9 y 8 constituyen aproximadamente el 90% de las cepas aisladas en nuestro país, desconociéndose los factores que favorecen su mayor prevalencia. En el presente estudio hemos investigado mediante microscopía electrónica, la presencia de cápsula en dos cepas de *A. baumannii*, biotipos 9 y 8 aislados de IIH durante 1995 en el Hospital San Juan de Dios. Cultivos por la noche en agar sangre fueron teñidos con azul de Alscia y tratados con antiseros específicos. Se estudió igualmente las características de hidrofobicidad de las bacterias y la presencia de cápsula al microscopio de luz. Se observó al microscopio electrónico una capa densa de material capsular en ambas cepas. Las cepas se caracterizaron asimismo por ser hidrofílicas y presentar un halo compatible con una cápsula al microscopio de luz. Es probable que la cápsula otorgue a estos microorganismos una superficie hidrofílica y contribuya a su mayor virulencia y prevalencia en los hospitales chilenos.

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter Baumannii ha emergido en los últimos años como una causa importante de Infecciones intrahospitalarias (IIH), destacándose su rol como agente de neumonía y bacteremia⁽¹⁻³⁾. Las infecciones producidas suelen ser difíciles de tratar debido a la multiresistencia de las cepas⁽⁴⁻⁶⁾. De los 19 biotipos que constituyen la especie, los biotipos 9 y 8 representan el 90% de los aislamientos efectuados en Chile, desconociéndose los factores que favorecen la mayor prevalencia y virulencia de estas cepas^(7,8). En un estudio anterior hemos observado que la mayoría de las cepas pertenecientes a los biotipos 9 y 8 presentan un halo compatible con una cápsula al microscopio de luz y una superficie hidrofílica. Por el contrario, hemos encontrado que la mayoría de las cepas pertenecientes a los otros biotipos, de menor prevalencia en el país, exhiben superficie hidrofóbica y ausencia de cápsula⁽⁹⁾. El objetivo de este estudio fue comprobar mediante microscopía electrónica, la existencia de cápsula en cepas hidrofílicas de *A. Baumannii*.

MATERIAL Y MÉTODO

BACTERIAS

Se seleccionaron dos cepas de *A. Baumannii* pertenecientes a los biotipos 9 y 8 de la especie, de una colección de cepas aisladas de IIH en el Hospital San Juan de Dios durante 1995. Ambas cepas fueron aisladas de muestras respiratorias de pacientes con neumonía. Las cepas fueron identificadas como *A. Baumannii* de acuerdo a sus propiedades bioquímicas⁽⁴⁾ y biotipificadas según su patrón de asimilación de fuentes de carbono⁽⁷⁾.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Las bacterias fueron preparadas para microscopía electrónica de acuerdo al procedimiento de Hendley y cols. modificado por el empleo de antisueros específicos⁽¹⁰⁾. Cultivos por la noche en Agar Tripticosa Soya (Difco) con 5% de sangre de caballo fueron cubiertos con una solución de glutaraldehído 3% y azul

de Alscacia al 0.5% en solución salina buffer fosfato (PBS), e incubados a temperatura ambiente por 2 h. La superficie de los cultivos fue posteriormente lavada con PBS, recolectada y centrifugada a 2.000 rpm por 10 min. Los pellets bacterianos fueron suspendidos en PBS conteniendo 10% de suero inmune de conejo para los biotipos 9 y 8 según la cepa e incubados por 30 min a temperatura ambiente. Las suspensiones bacterianas fueron luego centrifugadas a 8.000 g x 5 min. Los pellets fueron conservados a 4°C por 16 h en glutaraldehído al 4% en PBS, lavados y luego fijados por 1 h con osmio al 4% (sol ac.). Posteriormente, fueron deshidratados en una batería de concentraciones crecientes de etanol, finalizando con óxido de etileno. Finalmente fueron incluidos en resina (Epoxi araldita 502), cortados en micrótopo (Reichard UM U2) y contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes fueron observados en un Microscopio electrónico Phillips EOL.

PREPARACIÓN DE LOS ANTISUEROS

Los antisueros fueron preparados de acuerdo al procedimiento de Das y Ayliffe⁽¹¹⁾. Cultivos por la noche en agar sangre fueron suspendidos en PBS en concentración de 10⁶ a 10⁸ bacterias por ml. Las suspensiones bacterianas fueron luego calentadas a 100°C en BM y conservadas a 4°C. Para la preparación de los antisueros se inocularon conejos neozelandeses adultos, en días sucesivos, de acuerdo al siguiente esquema: 0.6 ml subcutáneo, 0.5 ml intramuscular, 0.4 ml en ambas almohadillas plantares traseras, 0.4 ml en ambas almohadillas plantares delanteras, 0.5 ml endovenoso, 1 ml subcutáneo y 0.5 ml endovenoso. Los conejos fueron dejados descansar por 10 días, para finalmente extraer 20 ml de sangre y luego los sueros inmunes correspondientes.

TINCIÓN DE CÁPSULAS PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Para la observación de cápsulas al microscopio de luz se efectuó la tinción de Hendriksen⁽¹²⁾. Extendidos bacterianos en suero humano normal fueron secados al ambiente y teñidos por un min con solución ácida de cristal violeta al 1%, calentando la preparación hasta la emisión de vapor. Las preparaciones fueron luego lavadas con solución

ácida de sulfato de cobre al 20% y secadas al ambiente. Este procedimiento tiñe las bacterias de color azul con un halo capsular púrpura.

HIDROFOBICIDAD

El estudio de la hidrofobicidad de las cepas fue efectuado midiendo el porcentaje de adherencia a n-hexadecano ⁽¹³⁾. Para ello, una suspensión bacteriana conteniendo 10^8 bacterias en buffer fosfato de sodio fue mezclada con 0.8 ml de n-hexadecano (Sigma) y agitada en vórtex por 30 seg. Luego de la separación de fases, se midió la absorvencia (A_{540}) de la fase acuosa comparándola con la de la suspensión control no tratada de bacterias. La hidrofobicidad fue calculada según la fórmula:

$$\% \text{ Hidrofobicidad} = \frac{A_{540} \text{ inicial} - A_{540} \text{ hexadecano}}{A_{540} \text{ inicial}} \times 100.$$

RESULTADOS

El tratamiento de las dos cepas de *A. Baumannii* biotipos 9 y 8 con antiseros específicos y Azul de Alsacia permitió la demostración mediante microscopía electrónica de una capa densa de material polisacárido capsular alrededor de las bacterias de ambos biotipos. Las dos cepas presentaron asimismo un gran halo compatible con una cápsula al microscopio de luz. No fue posible determinar el porcentaje de bacterias que presentaban cápsula en una preparación microscópica. En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se observa una microfotografía de una de las cepas analizadas donde se observa el halo capsular alrededor de las bacterias y en las Figuras 5 y 6, un área de la misma preparación microscópica donde se observan bacterias acapsuladas. Ambas cepas se caracterizaron por ser muy hidrofílicas con 0% de adherencia a hexadecano.

DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos demostrado la presencia de cápsula mediante microscopía electrónica en dos cepas pertenecientes a los biotipos altamente prevalentes en nuestro país de *A. Baumannii*, lo que

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE UNA CEPA ACINETOBACTER BAUMANNII BIOTIPO 9, MOSTRANDO BACTERIAS CON HALO CÁPSULAR Y ACÁPSULAR

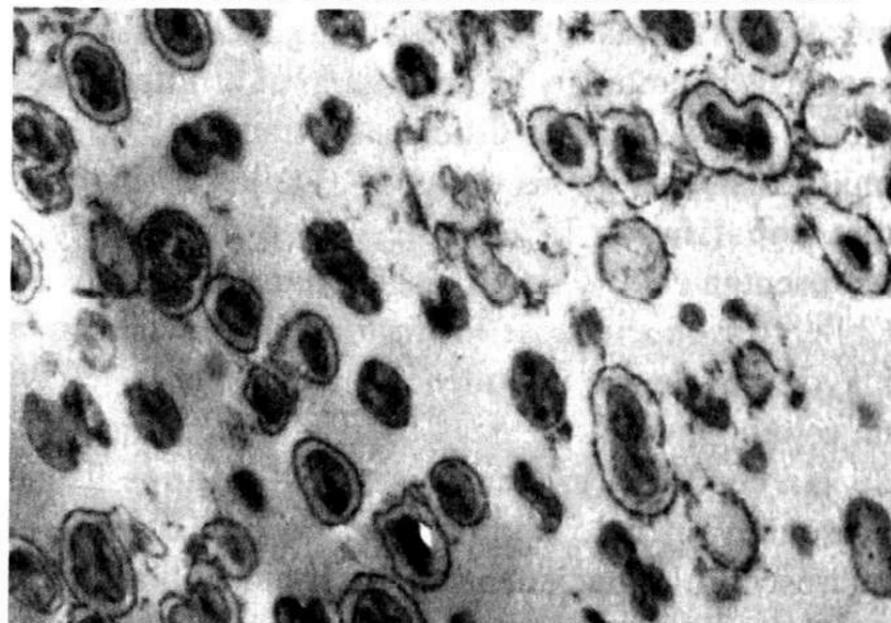


Figura 1 Aumento 9.000x



Figura 2 Aumento 25.000 x

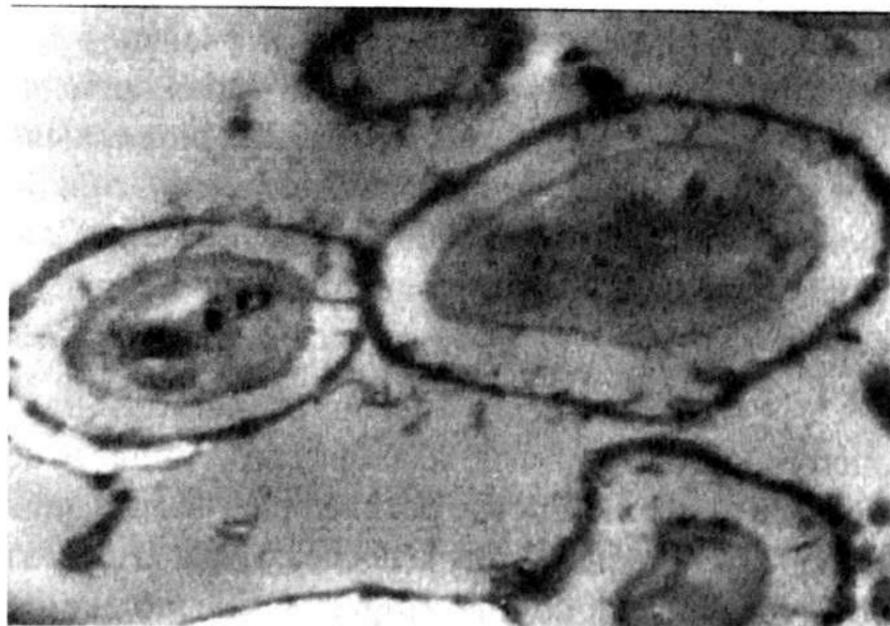


Figura 3 Aumento 37.000 x

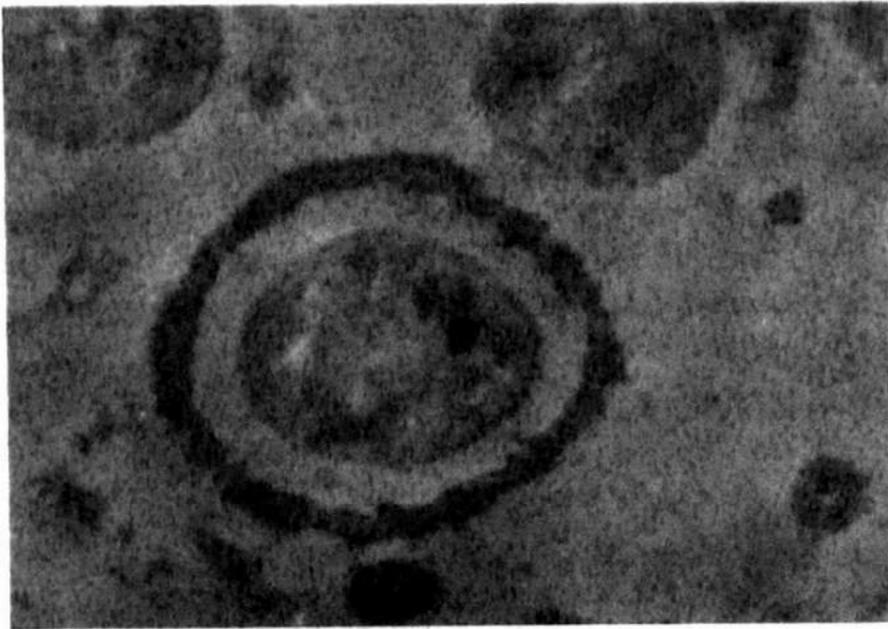


Figura 4 Aumento 60.000x

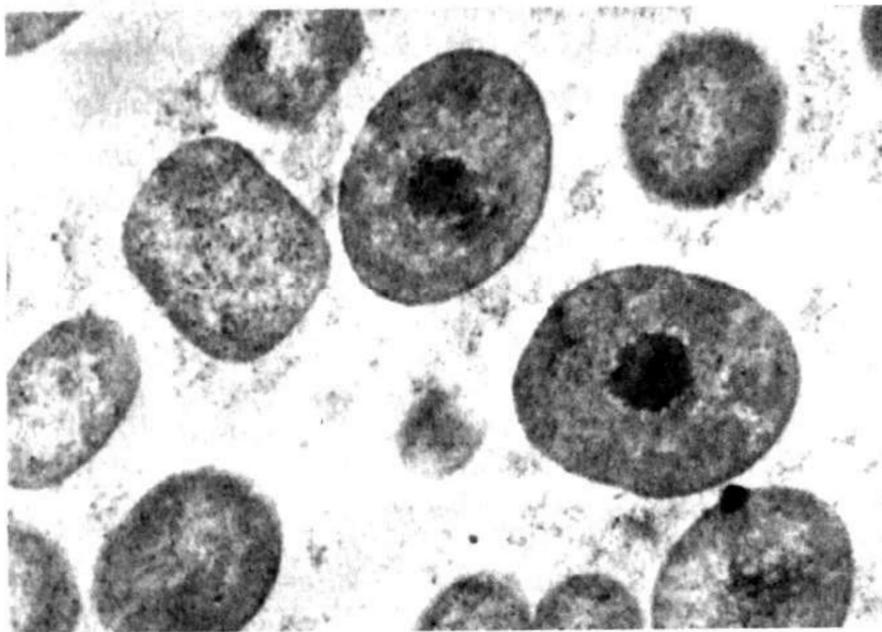


Figura 5 Aumento 30.000 x

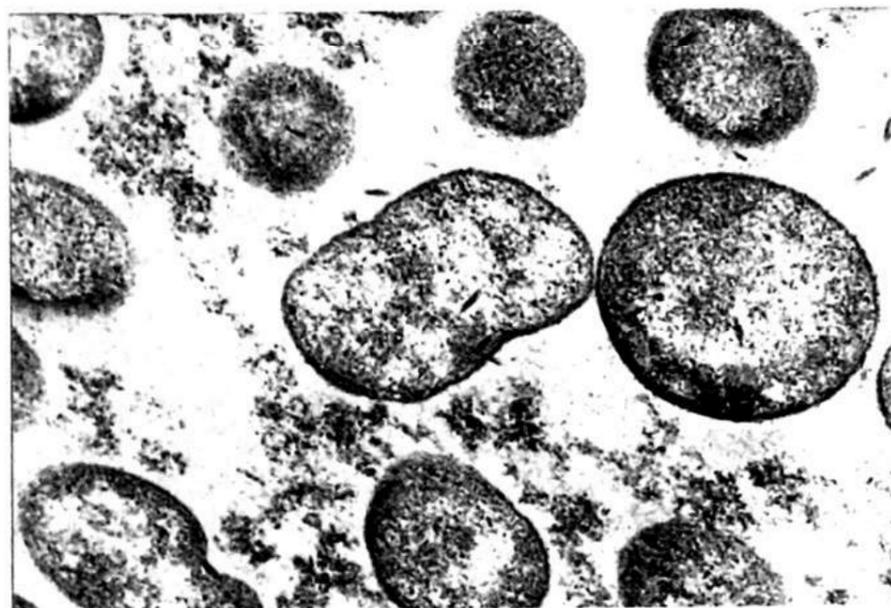


Figura 6 Aumento 30.000 x 14

confirma hallazgos anteriores con microscopía de luz. Numerosos estudios han demostrado que las cápsulas contribuyen significativamente a la virulencia de las bacterias patógenas, debido a su acción antifagocitaria y protectora de la acción bactericida normal del suero mediada por el complemento ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Por otra parte, la mayoría de las bacterias Gram negativas, tanto ambientales como de importancia clínica, son capsuladas, por lo que su presencia en cepas de *Acinetobacter* no es extraña ⁽¹⁵⁾. Sin embargo, la presencia de cápsula pareciera no ser una característica general del género. Al respecto, estudios efectuados con *A. calcoaceticus*, han demostrado diferentes características de superficie de este microorganismo. Rosenberg y cols. observaron alta hidrofobicidad y adherencia a células epiteliales en una cepa aislada del suelo de esta especie ⁽¹⁷⁾. En otro estudio, Taylor y Juni detectaron la existencia de una cápsula compuesta por D-glucosa y L-ramnosa en otra cepa ambiental de *Acinetobacter* ⁽¹⁸⁾. Estudios con *A. Baumannii* no han sido efectuados, por cuanto la taxonomía del género fue cambiada solo en 1986, con el reconocimiento de 12 especies y dejando los estudios anteriores con estos microorganismos obsoletos ⁽¹⁹⁾.

Las bacterias del género *Acinetobacter* son patógenos oportunistas que carecen del arsenal de genes de virulencia que poseen las bacterias patógenas. Entre los mecanismos de patogenicidad con que cuentan estos microorganismos destaca su elevado potencial para la adquisición de genes de resistencia lo que dificulta el tratamiento de las infecciones producidas ⁽⁶⁾. En este estudio hemos confirmado mediante microscopía electrónica la existencia de cápsula en dos cepas pertenecientes a los biotipos de mayor prevalencia en nuestros hospitales, elemento que podría contribuir a su mayor diseminación por constituir una ventaja sobre los biotipos no capsulados, al ser más eficientes para evadir los mecanismos de defensa inespecíficos del huésped. Las cápsulas, por su naturaleza polisacárida altamente hidratada, reducen la adherencia a los hidrocarburos y la hidrofobicidad de superficie en la mayoría de los microorganismos característica que comprobamos también en nuestras cepas, las que se caracterizaron por ser muy hidrofílicas ^(13,15).

Debido a su estructura hidratada, las cápsulas se colapsan con facilidad durante su procesamiento para microscopía electrónica, debido a que este incluye etapas de deshidratación. Por esta razón se utilizan para su visualización compuestos que estabilizan su estructura como los anticuerpos específicos⁽¹⁵⁾. En nuestro estudio hemos empleado, además, Azul de Alsacia, por su capacidad similar a la del rojo de rutenio de teñir material polisacárido, pero con la ventaja sobre este último de contribuir a su fijación⁽¹⁰⁾. Sin embargo, aún con estos tratamientos, en el proceso de lavado y luego de deshidratación no se conserva esta estructura en numerosas bacterias.

REFERENCIAS

1. Triantafilo V, Piwonka V, Nasra J et al. Bacteremias por *Infectol*. 1990; 4: 235 - 37.
2. Fernández A. *Acinetobacter calcoaceticus* spp. anitratus ¿Un grave problema intrahospitalario? *Bol Hosp S. J. de Dios*. 1991; 38: 282 - 85.
3. Bergogne-Berezin E, Towner K J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microb Rev*. 1996; 9: 148 - 65.
4. Martínez M A, Pinto M E, Giglio M S, Pommier J, Muñoz L M. Identificación y sensibilidad de *Acinetobacter* spp. aislados en muestras clínicas y ambiente hospitalario. *Rev Med Chile*. 1992; 120: 1267 - 72.
5. Zemelman R., Bello H., Domínguez, M., González G., Mella S., García A. Activity of imipenem, third-generation cephalosporins, aztreonam and ciprofloxacin against multiresistant gram-negative bacilli isolated from chilean hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 1993; 32: 413 - 19.
6. Towner K J. Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol*. 1997; 46: 721 - 46.
7. García S, Martínez M A, Pinto M E. Biotipificación de cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de infecciones intrahospitalarias. *Rev Chil Infectol*. 1991; 8: 83 - 86.
8. Domínguez M, González G, Bello H, García A, Mella S, Pinto M E, Martínez M A, Zemelman R. Identification and biotyping of *Acinetobacter* spp. isolated in chilean hospitals. *J Hosp Infect*. 1995; 30: 267 - 71.
9. Martínez M A, Pinto M E, Zemelman R, Cifras J L, Ramírez C. Características de superficie y sensibilidad antimicrobiana de cepas clínicas de *Acinetobacter* spp. Enviado a publicación a *Rev Med Chile*.
10. Hendley J O, Powell K R, Salomonsky N L, Rodewald R R. Electron microscopy of the gonococcal capsule. *J Infect Dis*. 1981; 143: 796 - 802.
11. Das B C, Ayliffe G A. Serotyping of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Clin Pathol*. 1984; 37: 1388 - 91.
12. Hendriksen D A, Krenz M M. Reagents and stains En A. Ballows, WJ Hausler, K Herrmann, HD Isenberg, HJ Shadomy (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. P. 1289 - 1315, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
13. Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett*. 1980; 9: 29 - 33.
14. Simoons-Smit A M, Verweij-Van Vught A M, Maclaren D M. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. *J Med Microbiol*. 1986; 21: 133- 37.
15. Bayer M E, Bayer M H. Biophysical and structural aspects of the bacterial capsule. *ASM News*. 1994; 60: 192 - 98.
16. Russo T A, Liang Y, Cross A L. The presence of K 54 capsular polysaccharide increases the pathogenicity of *Escherichia coli* in vitro. *J Infect Dis*. 1994; 169: 112 - 18.
17. Rosenberg M., Perry A., Bayer E A, Gutnick D., Rosenberg E., Ofek I. Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG - 1 to human epithelial cells and to hexadecane. *Infect Immun*. 1981; 33: 29 - 33.
18. Taylor W H, Juni E. Pathways for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide. *J bacteriol*. 1961; 81: 688 - 93.
19. Bouvet P J M, Grimont P A D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp.nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp.nov., *Acinetobacter junii* sp.nov., and emended descriptions of *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol*. 1986; 36: 228 - 40.