

***Pseudomonas aeruginosa*: an emerging nosocomial trouble in veterinary**

***Pseudomonas aeruginosa*: un problema nosocomial emergente en veterinaria**

Yuly Bernal-Rosas,¹ M.Sc, Karen Osorio-Muñoz,¹ M.V, Orlando Torres-García,^{1*} Ph.D.

¹Universidad Antonio Nariño, Facultad de Medicina Veterinaria, Carrera 3 este # 47A-15, Bogotá, D.C., Colombia. *Correspondence: ortorres@uan.edu.co.

Received: August 2014; Accepted: February 2015.

ABSTRACT

Objective. The goal of this study was to evaluate the susceptibility pattern of isolates *P. aeruginosa* from veterinary clinical centers in Bogotá, D.C., to some commonly used antibiotics in clinical. **Materials and methods.** Bacteriological standard protocols were used for the isolation and identification of bacterial strains. To evaluate the antimicrobial susceptibility of the isolates, to commonly used antibiotics, was performed the Kirby-Bauer agar-disk diffusion method on Mueller-Hinton agar. **Results.** A total of 160 samples was taken from clinical specimens and the environment in different veterinary clinics. Out of these samples, 89 (55.6%) were gram-negative strains, of which ten strains of *P. aeruginosa* were isolated (11.2%). All strains were resistant to Cefazolin, Lincomycin, Cephalothin, Ampicillin, Clindamycin, Sulfamethoxazole-Trimethoprim and Chloramphenicol while some isolates exhibited either resistance or an intermediate response to Amikacin (30%), Gentamicin (30%), Tobramycin (10%), Ciprofloxacin (20%), Ceftazidime (30%), Erythromycin (100%), Tetracycline (100%), Imipenem (10%), Meropenem (90%) and Bacitracin (90%). **Conclusions.** The results demonstrate that the acquired antimicrobial resistances of *P. aeruginosa* strains depend on antibiotic protocols applied. As observed in human hospitals, *Pseudomonas aeruginosa* is acting as one of the multidrug-resistant microorganisms of veterinary clinical relevance.

Key words: Antibiotic resistance, Bacteria, Dog, Multidrug-resistant, Nosocomial infections. (Source: NLM).

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el comportamiento a algunos antibióticos de uso común en clínica de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de centros clínicos veterinarios en Bogotá, D.C. **Materiales y métodos.** Un protocolo bacteriológico estándar se utilizó para el aislamiento e identificación de cepas bacterianas. Para evaluar la sensibilidad de los aislamientos bacterianos a diferentes antimicrobianos de uso clínico común, se empleó el método de difusión sobre agar Mueller-Hinton de Kirby-Bauer. **Resultados.** Un total de 160 muestras fueron tomadas a partir de muestras clínicas y del ambiente de diferentes clínicas veterinarias de la ciudad de Bogotá. De estas muestras, 89 (55.6%) fueron cepas bacterianas gram-negativas, de las que se aislaron 10 cepas de *P. aeruginosa* (11.2%). Todas las cepas de *P. aeruginosa* mostraron resistencia a la Cefazolina, Lincomicina, Cefalotina, Ampicilina, Clindamicina, Trimetoprim- Sulfametoxazol y Cloranfenicol; mientras que algunas de éstas, mostraron resistencia o una respuesta intermedia a Amikacina (30%), Gentamicina (30%), Tobramicina (10%),

Ciprofloxacina (20%), Ceftazidima (30%), Eritromicina (100%), Tetraciclina (100%), Imipinem (10%), Meropenem (90%) y Bacitracina (90%). **Conclusiones.** Los resultados demuestran que la resistencia adquirida a los antimicrobianos en las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de estos centros clínicos depende de los protocolos antibióticos aplicados. Al igual que sucede en los nosocomios Humanos, *Pseudomonas aeruginosa* se está comportando como uno de los microorganismos multiresistentes de relevancia clínica causante de infecciones nosocomiales veterinarias.

Palabras clave: Bacterias, infecciones nosocomiales, multiresistencia, perros, resistencia a antibióticos. (Fuente: NLM).

INTRODUCTION

Resistance to antibiotics is a growing problem worldwide, especially among nosocomial pathogens, and the spread of resistant bacteria is favored by the inappropriate use of antibiotics (1), leading to longer hospital stays and higher treatment costs (2). Several studies suggest that the antibiotic resistance is increasing from nosocomial isolates (3). The nutritional versatility and the ubiquity of *Pseudomonas aeruginosa* have made it become one of the most-common causes of Gram-negative nosocomial infections (4).

Pseudomonas aeruginosa is a motile, gram-negative rod that belongs to the family *Pseudomonadaceae*. *P. aeruginosa* is widely distributed in nature, and it has been isolated from various biological samples and different inorganic surfaces (5,6). *P. aeruginosa* is increasingly recognized as an emerging opportunistic pathogen of clinical relevance that causes chronic and recurrent infections in both humans and animals, particularly, in dogs and cats the most-frequent diseases include otitis external/media, urinary tract infection and pyoderma (7-9).

In Latin America, bacterial resistance in hospitals presents a high variety with small differences among countries, including Colombia. Epidemiological studies conducted in Bogotá in early 2000 showed a prevalence of 37% for *P. aeruginosa*, this being one of clinically relevant bacteria that most commonly cause nosocomial infections reviewed by Cabrera et al (10). However, no studies have analyzed the impact of this problem in veterinary clinical centers, in Bogotá.

P. aeruginosa isolates are naturally resistant to a large number of antibiotics; however, mechanisms of antimicrobial resistance, such as efflux pumps and porins, has allowed to these strains extend the range of antibiotic resistance (11). Multiple antibiotic resistances have created significant problems in the treatment of infected wounds. On the other hand, treatment failure and cross-resistance between strains and the spread of strains from patient to patient can result in multidrug resistance (MDR) *P. aeruginosa*. (12).

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es un problema creciente en todo el mundo, especialmente entre los patógenos nosocomiales; la propagación de las bacterias resistentes se ve favorecida por el uso inadecuado de los antibióticos (1) que da lugar a estancias hospitalarias más largas y mayores costos de tratamiento (2). Varios estudios sugieren que la resistencia a los antibióticos está aumentando a partir de los aislados nosocomiales (3). La versatilidad nutricional y la ubicuidad de la *Pseudomonas aeruginosa* la convierten en una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales gram-negativas (4).

La *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo móvil gram-negativo que pertenece a la familia de las *Pseudomonadaceae*. La *P. aeruginosa* está ampliamente distribuida en la naturaleza y se ha aislado a partir de diversas muestras biológicas y diferentes superficies inorgánicas (5,6). La *P. aeruginosa* es cada vez más reconocida como un patógeno oportunista emergente de relevancia clínica que causa infecciones crónicas y recurrentes en los seres humanos y los animales, particularmente en los perros y los gatos donde las enfermedades más frecuentes son otitis externa/media, infección del tracto urinario y pioderma (7-9).

En América Latina, la resistencia bacteriana en los hospitales presenta una alta variedad con pequeñas diferencias entre los países, entre ellos Colombia. Estudios epidemiológicos llevados a cabo en Bogotá a principios de 2000 mostraron una prevalencia del 37% para la *P. aeruginosa*, siendo esta una de las bacterias clínicamente relevantes que causan con mayor frecuencia las infecciones nosocomiales revisado por Cabrera et al (10). Sin embargo, ningún estudio ha analizado el impacto de este problema en las clínicas veterinarias de Bogotá.

Las *P. aeruginosa* aisladas son naturalmente resistentes a un gran número de antibióticos; sin embargo, los mecanismos de resistencia a los antibióticos, tales como bombas de eflujo y porinas, le han permitido a estas cepas ampliar la gama de resistencia a los antibióticos (11). La multi-resistencia a los antibióticos ha creado problemas significativos en el tratamiento de heridas infectadas. Por otro lado,

Taking into account the above considerations, the aim of this survey was to assess the susceptibility pattern of *P. aeruginosa* isolates from veterinary clinical centers in Bogotá, D.C., to some commonly used antibiotics in clinical.

MATERIALS AND METHODS

Study design. This prospective observational study was carried out at the Veterinary Faculty of Antonio Nariño University from Bogotá, D.C., Colombia, between June 2013 and May 2014. Dog patients that were considered to be at high risk of developing nosocomial events were eligible for enrollment in the study (Most hospitalized patients presented primarily infections of viral or bacterial type). The study was restricted to patients (canines) that were hospitalized for at least one day in the respective critical care units (88.9% of patients were hospitalized for more than 4 days).

Bacterial isolates. 135 samples from a variety of clinical specimens of dogs (stool (n =91), urine (n =14), nasal discharge (n =6), wound swab (n =8), surgical site infections (n =3), swab from skin (n =8) and ear (n =5)) and 25 environmental samples (surgical instruments, dressings, baths, surgical rooms, devices, floors, walls, beds, sinks, examination tables and wastewater) were examined. Cotton swabs were used to collect samples. The samples were placed into Brain Heart Infusion (BHI) broth (Oxoid, UK) and were sent immediately to the microbiology laboratory.

Sample processing. Samples were inoculated onto 5% of sheep blood agar plates (Oxoid, UK) and incubated at 37°C for 24 h. The identification of *Pseudomonas* was on the basis of colony morphology and Gram Staining; any suspicious colony was subcultured on cetrinide agar plates (CM0579 Oxoid, UK), and purified. The isolate were identified as a *P. aeruginosa* based on biochemical test. Such as oxidase test, motility, aerobic fermentation of glucose, lactose, maltose and mannitol, arginine and lysine utilization, nitrate reduction, production of urease and DNase, ONPG (orthonitrophenyl-beta-D-galactopyranoside) test, acetamide and esculin hydrolysis, and susceptibility to polymyxin, was performing according to (13). Isolates were stored at -80°C in Mueller-Hinton Broth (Merck, Germany) supplemented with 40 per cent glycerol (v/v).

Antibiotic sensitivity assay. Antimicrobial susceptibility to a panel of 18 antimicrobial agents most commonly used in veterinary

el fracaso del tratamiento, la resistencia cruzada entre las cepas y la propagación de estas de paciente a paciente, pueden dar lugar a multi-resistencia a los medicamentos (MDR por sus siglas en inglés) de la *P. aeruginosa*. (12).

En vista de las consideraciones anteriores, este estudio tuvo por objeto evaluar el patrón de susceptibilidad de las *P. aeruginosa* aisladas, procedentes de clínicas veterinarias de Bogotá, D.C., a algunos antibióticos de uso común en los tratamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio. Este estudio observacional prospectivo se llevó a cabo en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Antonio Nariño de Bogotá, D.C., Colombia, entre junio de 2013 y mayo de 2014. Los pacientes caninos que se consideraron en alto riesgo de desarrollar eventos nosocomiales eran elegibles para ser incluidos en el estudio (la mayoría de los pacientes hospitalizados presentaban principalmente infecciones de tipo viral o bacteriana). El estudio se limitó a los pacientes (caninos) que fueron hospitalizados por lo menos durante un día en las respectivas unidades de cuidados intensivos (el 88,9% de los pacientes fueron hospitalizados durante más de 4 días).

Aislados bacterianos. Se examinaron 135 muestras procedentes de una variedad de ejemplares de perros (excrementos (n=91), orina (n=14), secreción nasal (n=6), frotis de heridas (n=8), infecciones en heridas de cirugía (n=3), frotis de piel (n=8) y oído (n=5) y 25 muestras ambientales (instrumental quirúrgico, vendajes, baños, salas quirúrgicas, equipos, pisos, paredes, camas, lavabos, mesas de examen y aguas residuales). Se utilizaron hisopos de algodón para recoger las muestras. Las muestras se colocaron en un medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid, Reino Unido) y se enviaron inmediatamente al laboratorio de microbiología.

Procesamiento de las muestras. Las muestras se inocularon en placas de agar con sangre de oveja al 5% (Oxoid, Reino Unido) y se incubaron a 37°C durante 24 h. La identificación de la *Pseudomonas* se hizo con base en la morfología de la colonia y la técnica de tinción de Gram; todas las colonias presuntivas se subcultivaron sobre placas de agar cetrinide (CM0579 Oxoid, Reino Unido) y se depuraron. Los aislados se identificaron como *P. aeruginosa* con base en pruebas bioquímicas. Pruebas tales como las de oxidasa, motilidad, fermentación aerobia de la glucosa, la lactosa, la maltosa y el manitol, utilización de la arginina y la lisina, reducción de nitrato, producción de ureasa, DNasa, ONPG (ortonitrofenil-beta-D-galactopiranosido), hidrólisis de la acetamida y de la esculina y susceptibilidad a la polimixina,

clinical centers in Bogota was carried out on Muller-Hinton agar by using Kirby Bauer disc diffusion technique reformation by the Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests (CLSI) suggestions (14). The following antimicrobials for *P. aeruginosa* were used: Aminoglycosides: Amikacin (AMI 30 µg), Gentamicin (GM 10 µg) and Tobramycin (TOB 10 µg). Fluoroquinolones: Ciprofloxacin (CIP 5 µg) and Norfloxacin (NOR 10 µg). Cephalosporins: First generation: Cefazolin (CZ 30 µg) and Cephalothin (CF 30 µg); Third generation: Ceftazidime (CAZ 30 µg). Macrolides: Erythromycin (E 15 µg). Penicillins: Ampicillin (AMP 10 µg). Tetracyclines: Tetracycline (TE 30 µg). Lincosamides: Lincomycin (L 2 µg) and Clindamycin (DA 2 µg). Carbapenems: Imipenem (IPM 10 µg) and Meropenem (MEM 10 µg). Polypeptides: Bacitracin (B 10 µg). Sulfonamides: Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT 1.25/23.75 µg). Chloramphenicol: Chloramphenicol (C 30 µg).

The inhibition zone diameter around each disk was measured and was interpreted as described by the NCCLS, which classifies the organism into three categories: sensitive (S), intermediate sensitive (I) and resistant (R) (14).

Multiple antibiotic resistance index. The multiple antibiotic resistance (MAR) index was determined for each isolate by dividing the number of antibiotics to which the isolate is resistant by the total number of antibiotics tested (15). Multidrug resistance was defined as resistance to two or more antimicrobial classes. Any sign of inhibition or sensitivity was considered to be indicative of nonresistance.

Quality Control of antimicrobial susceptibility tests. Quality control was performed utilizing strains from the American type culture collection (ATCC), *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Ethical approval. Regarding ethical considerations, these studies adhered to the Article 11 from Resolution No. 008430 on October 4, 1993 by the Colombian Ministry of Health according to whose classification, these are minimum-risk studies.

RESULTS

Between February 2013 and June 2013, 160 bacterial strains were collected from a variety of clinical specimens and environment samples of several veterinary clinics. Out of these samples, 89 (55.6%) were gram-negative strains, of

se realizaron de acuerdo con (13). Los aislados se almacenaron a -80°C en un medio de Mueller-Hinton (Merck, Alemania) con una adición de glicerol al 40 por ciento (v/v).

Ensayo de sensibilidad a los antibióticos. La susceptibilidad antimicrobiana a un panel con los 18 agentes antimicrobianos más utilizados en las clínicas veterinarias en Bogotá, se llevó a cabo en agar Muller-Hinton utilizando la técnica Kirby-Bauer de difusión por discos reformulada por sugerencia de los Estándares de Desempeño para Ensayos de Sensibilidad Antimicrobianas por Discos (CLSI) (14). Se utilizaron los siguientes antimicrobianos para *P. aeruginosa*: aminoglucósidos: amikacina (IAM 30 µg), gentamicina (GM 10 µg) y tobramicina (TOB 10 µg). Para las fluoroquinolonas: ciprofloxacina (CIP 5 µg) y norfloxacina (NOR 10 µg). Para las cefalosporinas: Primera generación: Cefazolina (CZ 30 µg) y cefalotina (CF 30 µg); tercera generación: ceftazidima (CAZ 30 µg). Para los macrólidos: eritromicina (E 15 µg). Las penicilinas: ampicilina (AMP 10 mg). Tetraciclinas: La tetraciclina (TE 30 mg). Lincosamidas: lincomicina (L 2 µg) y clindamicina (DA 2 µg). Carbapenemas: Imipenem (IPM 10 µg) y meropenem (MEM 10 µg). Para los polipéptidos: Bacitracin (B 10 µg). Para las sulfonamidas: trimetoprim-sulfametoxazol (SXT 1.25 / 23.75 µg). Cloranfenicol: cloranfenicol (C 30 µg).

El diámetro de la zona de inhibición alrededor de cada disco se midió y se interpretó como lo describe el NCCLS, que clasifica el organismo en tres categorías: sensible (S), sensible intermedio (I) y resistente (R) (14).

Índice de multi-resistencia a los antibióticos. El índice de multi-resistencia a los antibióticos (RAM) se determinó para cada aislado dividiendo el número de antibióticos a los que el aislado es resistente por el número total de antibióticos ensayados (15). La multi-resistencia se definió como la resistencia a dos o más clases de antimicrobianos. Cualquier signo de inhibición o sensibilidad se consideró como indicativo de no resistencia.

Control de calidad de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. El control de calidad se llevó a cabo utilizando cepas de la American Type Culture Collection (ATCC), *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Aprobación ética. De acuerdo con consideraciones éticas, estos estudios se adhirieron al artículo 11 de la Resolución No 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia; de acuerdo con su clasificación se trata de estudios de riesgo mínimo.

RESULTADOS

Entre febrero de 2013 y junio de 2013, se recogieron 160 cepas bacterianas a partir de una variedad de

which 10 (11.2%) strains of *P. aeruginosa* were isolated. 3 (30%) were isolated from environmental samples, and 7 (70%) were isolated from clinical specimens.

In this study, *P. aeruginosa* was most commonly isolated from surgical sites (57.1%). The percentage of strains susceptible, intermediate, or resistant to each antibiotic is presented in table 1. All 10 (100%) strains tested were susceptible to Norfloxacin, followed by Tobramycin (90%), Imipinem (90%), Ciprofloxacin (80%), Amikacin (70%), Gentamicin (70%), Ceftazidime (70%). Of the remaining antibiotics tested, Meropenem and Bacitracin exhibited the least activity against *P. aeruginosa* with 90% of the resistant strains each one. Notably, 100% of the isolates exhibited resistance to Cefazolin, Lincomycin, Cephalothin, Ampicillin, Clindamycin, Sulfamethoxazole-Trimethoprim and Chloramphenicol while some isolates exhibited either resistance or an intermediate response to Amikacin (30%), Gentamicin (30%), Tobramycin (10%), Ciprofloxacin (20%), Ceftazidime (30%), Erythromycin (100%), Tetracycline (100%), Imipinem (10%), Meropenem (90%) and Bacitracin (90%).

Multiple antibiotic resistances were seen in all *Pseudomonas aeruginosa* isolated strains.

muestras clínicas y ambientales tomadas en varias clínicas veterinarias. De estas muestras, 89 (el 55.6%) correspondieron a cepas gram-negativas, de las que se aislaron 10 (el 11.2%) cepas de *P. aeruginosa*. De estas, 3 (el 30%) se aislaron de muestras tomadas en el ambiente y 7 (el 70%) de muestras clínicas.

En este estudio, la *P. aeruginosa* fue la que se aisló más comúnmente en las heridas quirúrgicas (57.1%). En la Tabla 1 se presenta el porcentaje de cepas sensibles, intermedias o resistentes a cada antibiótico. Todas las 10 (100%) cepas examinadas eran susceptibles a la norfloxacina, seguida de la tobramicina (90%), el imipenem (90%), la ciprofloxacina (80%), la amikacina (70%), la gentamicina (70%) y la ceftazidima (70%). De los restantes antibióticos ensayados, el meropenem y la bacitracina mostraron la menor actividad contra *P. aeruginosa* con 90% de las cepas resistentes a cada uno de ellos. Cabe destacar que el 100% de los aislados mostró resistencia a la cefazolina, lincomicina, cefalotina, ampicilina, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprima y cloranfenicol, mientras que algunos aislados mostraron resistencia o una respuesta intermedia a amikacina (30%), gentamicina (30%), tobramicina (10%), ciprofloxacina (20%), ceftazidima (30%), eritromicina (100%), tetraciclina (100%), Imipenem (10%), Meropenem (90%) y bacitracina (90%).

Table 1. Antibiotic susceptibility patterns of *P. aeruginosa*.

Antibiotic	Disk Content (µg)	Zone Diameter (mm)			<i>P. aeruginosa</i> (n = 10)		
		S	I	R	S %	I %	R %
Aminoglycosides							
AMK	30	≥ 17	15 -16	≤ 14	70	20	10
GM	10	≥ 15	13 -14	≤ 12	70	10	20
TOB*	10	≥ 15	13 -14	≤ 12	90	-	10
Fluoroquinolones							
CIP*	5	≥ 21	16 -20	≤ 15	80	10	10
NOR*	10	≥ 17	13 -16	≤ 12	100	-	-
Cephalosporins							
CZ	30	≥ 18	15 -17	≤ 14	-	-	100
CF	30	≥ 18	15 -17	≤ 14	-	-	100
CAZ*	30	≥ 18	15-17	≤ 14	70	-	30
Macrolides							
E	15	≥ 23	14 -22	≤ 13	-	10	90
Penicillins							
AMP	10	≥ 17	14 -16	≤ 13	-	-	100
Tetracyclines							
TE	30	≥ 19	15 -18	≤ 14	-	20	80
Lincosamides							
L	2	≥ 21	15 -20	≤ 14	-	-	100
DA	2	≥ 21	15 -20	≤ 14	-	-	100
Carbapenems							
IPM	10	≥ 19	16-18	≤ 15	90	-	10
MEM	10	≥ 19	16 -18	≤ 15	10	60	30
Polypeptides							
B*	10	≥ 13	9 -12	≤ 8	10	-	90
Sulfonamides							
SXT	1.25/23.75	≥ 16	11 -15	≤ 10	-	-	100
Chloramphenicol							
C	30	≥ 18	13 -17	≤ 12	-	-	100

Amikacin (AMI), Gentamicin (GM), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Norfloxacin (NOR), Cefazolin (CZ), Cephalothin (CF), Ceftazidime (CAZ), Erythromycin (E), Ampicillin (AMP), Tetracycline (TE), Lincomycin (L), Clindamycin (DA), Imipinem (IPM), Meropenem (MEM), Bacitracin (B), Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT), Chloramphenicol (C). Susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R). *No NCCLS breakpoint.

However, one of these clinic samples, showed the highest MDR 16/18 antibiotics tested (MAR 0.9). Table 2 shows multiple antibiotic resistance (MAR) index of *P. aeruginosa* isolates, which shows that, 80% had MAR index of 0.5 and above.

Table 2. Multiple antibiotic resistance (MAR) index of *P. aeruginosa* isolates.

No. of <i>P. aeruginosa</i> isolates	Percentage (%)	M.A.R.
0	0	0
2	20	0.5
7	70	0.6
1	10	0.9
0	0	1

DISCUSSION

Pseudomonas aeruginosa is a major cause of nosocomial infections in immunocompromised patients, especially in hospitalized burn patients (16). *P. aeruginosa* is intrinsically resistant to several antibiotics because of the low permeability of its outer-membrane, the constitutive expression of various efflux pumps, and the production of antibiotic-inactivating enzymes (11).

Infections caused by resistant strains are a true concern in many hospitals worldwide since they are associated with a high mortality, secondary bacteremia, an increase in the length of hospital stay, and a considerable increase in healthcare costs (17).

Has been reported that about 5 to 10% of hospitalized human patients acquire an infection of hospital origin (18), not very dissimilar from the observed percentages in veterinary practice in small animal species, where prevalence reported is between 0.8 and 18.1%, according to the established surgical procedure (19). So the present study was conducted to determine the antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental samples in various veterinary clinical centers in Bogotá, D.C.

In the present study, the highest rate (51.7%) of *Pseudomonas aeruginosa* infections was observed in the examination room and surgical ward, followed by isolating strains of environment, in clinical floors, surgical rooms and exam table (30%). These results are in line with studies of Rakesh on 2012 (20).

Se observaron múltiples resistencias a antibióticos en todas las cepas aisladas de *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, una de estas muestras clínicas mostró la mayor MDR 16/18 a los antibióticos ensayados (RAM=0.9). En la tabla 2 se muestra el índice de multi-resistencia a los antibióticos (RAM) de las cepas de *P. aeruginosa*, lo que demuestra que el 80% tenía un índice RAM de 0.5 y superior.

DISCUSIÓN

La *Pseudomonas aeruginosa* es una causa importante de las infecciones nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en aquellos hospitalizados por quemaduras (16). La *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a varios antibióticos debido a la baja permeabilidad de su membrana externa, la expresión constitutiva de varias bombas de eflujo y la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos (11).

Las infecciones causadas por las cepas resistentes son una verdadera preocupación en muchos hospitales de todo el mundo ya que se asocian con una alta mortalidad, bacteriemia secundaria, aumento en la duración de la estancia hospitalaria y aumento considerable en los costos de salud (17).

Se ha informado que alrededor del 5 al 10% de pacientes humanos hospitalizados adquieren una infección de origen hospitalario (18) y no es muy diferente a los porcentajes observados en la práctica veterinaria en especies animales pequeñas, donde la prevalencia reportada está entre el 0.8 y el 18.1%, de acuerdo con el procedimiento quirúrgico establecido (19). En consecuencia el presente estudio se realizó para determinar el patrón de resistencia a los antibióticos de las *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras clínicas y ambientales en diversas clínicas veterinarias de Bogotá, D.C.

En el presente estudio se observó la tasa más alta (51.7%) de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en la salas de toma de muestras y salas de cirugía, seguida por las cepas aisladas en el medio ambiente, pisos, salas quirúrgicas y mesas de examen (30%). Estos resultados son consistentes con los estudios de Rakesh en 2012 (20).

Los aminoglucósidos matan a las bacterias mediante la inhibición de la síntesis de proteínas adhiriéndose al 16S rANR y mediante la interrupción de la integridad de la membrana celular bacteriana (21). En este estudio, el diez por ciento de las *P. aeruginosa* son intermedia o marginalmente sensibles a la gentamicina con una resistencia del 20%; esta información revela que su resistencia está aumentando. Estos resultados son similares a los reportados en estudios previos (15). Sin embargo, los aminoglucósidos más nuevos con un espectro más amplio de actividad antibacteriana,

Aminoglycosides kill bacteria by inhibiting protein synthesis via binding to the 16S rRNA and by disrupting the bacterial cell membrane integrity (21). In this study, ten percent *P. aeruginosa* is intermediate or marginally sensitive to gentamicin with 20% resistant these data reveal that the gentamicin resistance is increasing. These results are similar to those reported in previous studies (15). However, the newer aminoglycosides with a broader spectrum of antibacterial activity, such as Amikacin, Gentamicin and Tobramycin, which in this study, showed relatively high activity of 70%, 70% and 90% against *P. aeruginosa* strains, respectively. Similarly, Harada and Lin, reported on 2012, a low percentage of resistance to Amikacin and Gentamicin (22, 23). Suggesting that these could still be the gold standard for treatment in cases of more resistant bacteria.

Fluoroquinolones, particularly Ciprofloxacin, are commonly used in the treatment of *P. aeruginosa* infections. Ciprofloxacin is the one antibiotic with antipseudomonal coverage. *P. aeruginosa* is most susceptible to Ciprofloxacin and Imipenem (16, 24). In contrast, this study shows that these isolates have started developing resistance or marginally sensitive (20%) against Ciprofloxacin, probably due to its irrational and inappropriate use. These results are consistent with those reported in other studies (22, 25, 26).

Was found that strains of *P. aeruginosa* isolates are resistant to multiple drugs, suggesting that selective pressure created by the persistent and possibly inappropriate use of these antimicrobials in veterinary clinic practice is one of the determining factors for the emergence of resistance; reason that justifies the MIR greater than 0.5 in 80% of *P. aeruginosa* strains isolated in the study; these results are consistent with those reported by Kyung-Mee on 2013 (27).

β -Lactam antibiotics, including antipseudomonal Penicillins, Cephalosporins, Monobactams, and Carbapenems, remain essential components for the treatment of nosocomial infections by *Pseudomonas aeruginosa* (28). Nevertheless, in this study, with the exception of Ceftazidime and Imipenem, all *P. aeruginosa* strains, were resistant to Cefazolin, Cephalothin, Ampicillin and Meropenem. In the same way, other antibiotics probed in this study such as, Macrolides, Tetracyclines, Lincosamides, Polypeptides, Sulfonamides and Chloramphenicol, exhibited the least activity against *P. aeruginosa*; resistance to these first-line antibiotics is increasing and frequently associated with multidrug resistance (MDR) phenotypes (29, 30). These results could suggest the possible extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production in these

tales como la amikacina, la gentamicina y la tobramicina, mostraron en este estudio una actividad relativamente alta del 70%, 70% y 90% frente a cepas de *P. aeruginosa*, respectivamente. Del mismo modo, Harada y Lin reportaron, en el año 2012, un bajo porcentaje de resistencia a la amikacina y a la gentamicina (22, 23). Ello sugiere que estas podrían seguir siendo la regla de oro para el tratamiento en los casos de las bacterias más resistentes.

Las fluoroquinolonas, especialmente la ciprofloxacina, se utilizan comúnmente en el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa*. La ciprofloxacina es un antibiótico con cobertura antipseudomónica. La *P. aeruginosa* es más susceptible a la ciprofloxacina y al Imipenem (16,24). Por el contrario, este estudio muestra que estos aislados comenzaron a desarrollar resistencia o sensibilidad marginal (20%) frente a la ciprofloxacina, posiblemente por su uso irracional e inapropiado. Estos resultados son consistentes con los reportados en otros estudios (22, 25, 26).

Se encontró que las cepas de *P. aeruginosa* aisladas son resistentes a múltiples fármacos, lo que sugiere que la presión selectiva creada por el uso persistente y posiblemente inadecuado de estos antimicrobianos en la práctica clínica veterinaria, es uno de los factores determinantes para la aparición de la resistencia; por esta razón se justifica un MIR superior al 0,5 en el 80% de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el estudio; estos resultados son consistentes con los reportados por Kyung-Mee en 2013 (27).

Los antibióticos β -lactámicos, incluyendo aquellos antipseudomonales tales como penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes, siguen siendo componentes esenciales en el tratamiento de las infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* (28). Sin embargo, en este estudio, con excepción de la ceftazidima y el imipenem, todas las cepas de *P. aeruginosa*, fueron resistentes a la cefazolina, la cefalotina, la ampicilina y el meropenem. De la misma manera otros antibióticos probados en el estudio, tales como los macrólidos, tetraciclinas, lincosamidas, polipéptidos, sulfonamidas y cloranfenicol, exhibieron la menor actividad contra la *P. aeruginosa*; la resistencia a estos antibióticos de primera línea está aumentando y se asocia frecuentemente con fenotipos de multi-resistencia a fármacos (MDR) (29, 30). Estos resultados podrían sugerir la posible producción de beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL por sus siglas en inglés) en estas cepas MDR de *P. aeruginosa*; sin embargo, se requieren estudios de confirmación.

Se pueden señalar numerosas causas para el desarrollo de cepas resistentes a los antibióticos. En los países en desarrollo la automedicación, la venta libre y la prescripción de antibióticos de amplio espectro que actúan contra un amplio rango de diferentes

MDR strains of *P. aeruginosa*; nonetheless, confirmation studies are required.

Numerous reasons can be assigned to the development of antibiotic resistant strains. In developing countries due to self-medication, free sale of antibiotics and antibiotic prescribing broad-spectrum that are activity against a wide range of different microbes, are the main sources of induction of antimicrobial resistance.

In conclusion the nosocomial infections in veterinary medicine are an emerging trouble. Multidrug resistance was observed in all strains of *P. aeruginosa* isolated in this work, possibly is due to antibiotic protocols applied in veterinary clinical. Like to in human hospitals, *Pseudomonas aeruginosa* today, is one of the microorganisms of veterinary clinical relevance in Bogota.

These results highlight the need to implement microbiological monitoring programs for multidrug resistant organisms and infection control procedures at veterinary clinical centers. Additionally, the mandatory incorporation of antibiograms as a guide in selecting empiric antibiotic therapy. Finally, the possibility of bacterial spread from animals to humans or vice versa requires particular attention.

Conflict of interest statement

The authors do not have any financial or other associations that might pose a conflict of interest.

Acknowledgements

This work was financially supported by a grant from the University Antonio Nariño.

microbios, son las principales fuentes de inducción a la resistencia a los antimicrobianos.

En conclusión las infecciones nosocomiales en la medicina veterinaria son un problema emergente.

La multi-resistencia se observó en todas las cepas de *P. aeruginosa* aisladas en este trabajo y posiblemente se debe a los protocolos antibióticos aplicados en las prácticas clínicas veterinarias. Al igual que en los hospitales, la *Pseudomonas aeruginosa* es hoy en día uno de los microorganismos de mayor relevancia clínica veterinaria en Bogotá.

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de implementar programas de monitoreo microbiológico de los organismos multi-resistentes a fármacos y procedimientos para el control de infecciones en las clínicas veterinarias. Además, la incorporación obligatoria de antibiogramas como guía en la selección de la terapia antibiótica empírica. Por último, requiere especial atención a la posibilidad de propagación de bacterias de los animales a los seres humanos o viceversa.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores no tienen asociaciones financieras o de otro tipo que puedan suponer un conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado financieramente por una subvención de la Universidad Antonio Nariño.

REFERENCES

1. W.H.O. The evolving threat of antimicrobial resistance - Options for action. Geneva. W.H.O.; 2012.
2. Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(12):1840-1846.
3. Dai CM, Zhou JD, Wu Y, Qi Y. Distribution of pathogen and resistance of nosocomial infections in the intensive care units. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006; 31(2):277-280.
4. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy* 2005; 25(10):1353-1364.
5. Park HR, Hong MK, Hwang SY, Park YK, Kwon KH, Yoon JW, et al. Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* related to bovine mastitis. *Acta Vet Hung* 2014; 62(1):1-12.
6. Morales E, Cots F, Sala M, Comas M, Belvis F, Riu M, et al. Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *BMC Health Serv Res* 2012; 12:122.

7. Hariharan H, Coles M, Poole D, Lund L, Page R. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can Vet J* 2006; 47(3):253-255.
8. Hall JL, Holmes MA, Baines SJ. Prevalence and antimicrobial resistance of canine urinary tract pathogens. *Vet Rec* 2013; 173(22):549.
9. Papich MG. Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2013; 43(5):1091-1107.
10. Cabrera CE, Gómez RF, Zuñiga AE, Corral RH, Bertha López B, Chávez M. Epidemiology of nosocomial bacteria resistant to antimicrobials. *Colombia Médica* 2011; 42(1):117-125.
11. Hillier A, Alcorn JR, Cole LK, Kowalski JJ. Pyoderma caused by *Pseudomonas aeruginosa* infection in dogs: 20 cases. *Vet Dermatol* 2006; 17(6):432-439.
12. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(1):43-48.
13. Washington C. Winn SDA, William M. Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, Gary W. Procop and Gail L. Woods. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
14. C.L.S.I. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard - Fourth Edition. CLSI document, VET01-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
15. Tripathi P, Banerjee, G., Saxena, S., Kumar, G.M., and Ramteke, P.W. Antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of lower respiratory tract infection. *Afr J Microbiol Res* 2011; 5(19):2955-2959.
16. Biswal I, Arora BS, Kasana D, Neetushree. Incidence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients and environment of teaching institution. *J Clin Diagn Res* 2014; 8(5):DC26-29.
17. Giamarellou H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(2):229-233.
18. Sydnor ER, Perl TM. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(1):141-173.
19. Nelson LL. Surgical site infections in small animal surgery. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011; 41(5):1041-1056.
20. Rakesh RM GN, Kalpesh M, Rosy P, Kanu P, Vegad MM. Antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa* species isolated at a tertiary care hospital, ahmadabad. *Natl J Med Res* 2012; 2(2):156 - 159.
21. Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU. Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci* 2008; 15(1):5-14.
22. Harada K, Arima S, Niina A, Kataoka Y, Takahashi T. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs and cats in Japan: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *Microbiol Immunol* 2012; 56(2):123-127.
23. Lin D, Foley SL, Qi Y, Han J, Ji C, Li R, et al. Characterization of antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *J Appl Microbiol* 2012; 113(1):16-23.
24. Hirakawa Y, Sasaki H, Kawamoto E, Ishikawa H, Matsumoto T, Aoyama N, et al. Prevalence and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in chinchillas. *BMC Vet Res* 2010;6:52.
25. Hu XH, Xu XM, Mi ZH, Fan YF, Feng WY. Relationship between drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds and its mobile genetic elements. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2009; 25(2):103-105.
26. Ali SQ, Zehra A, Naqvi BS, Shah S, Bushra R. Resistance pattern of ciprofloxacin against different pathogens. *Oman Med J* 2010; 25(4):294-298.
27. Park KM, Nam HS, Woo HM. Successful management of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia after kidney transplantation in a dog. *J Vet Med Sci* 2013; 75(11):1529-1533.

28. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(6):560-578.
29. Kiser TH, Obritsch MD, Jung R, MacLaren R, Fish DN. Efflux pump contribution to multidrug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacotherapy* 2010; 30(7):632-638.
30. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodriguez C, Moya B, et al. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(5):1906-1911.