

AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA DE DISTINTO ORIGEN (*)

Por Walter G. Aguirre (1), Gleyre T. Dorta (2), Marta B. Tobía (3), Carlos M. Gómez (4), M. Prio (5) y A. A. Mariazzi (6)

RESUMEN

Aislamos 25 cepas de Pseudomonas aeruginosa de 63 muestras de diverso origen. De estas, 21 eran de lesiones humanas con 9 aislamientos; 20 de animales con 8 aislamientos y 22 muestras de aguas naturales con 5 aislamientos.

Identificamos estas cepas mediante el estudio de características morfológicas, tintoriales, culturales y bioquímicas.

Probamos su acción patógena experimental por inoculación en ratón blanco cepa Roeland, con pocas variaciones en su comportamiento. Ensayamos la acción de 4 antisépticos de los cuales sólo 3 se comportaron uniformemente.

Frente a la penicilina siempre fueron resistentes, y en presencia de tetraciclina, anastrepto, ampiciclina y colistín, la sensibilidad de las cepas estudiada fue variable.

A ISOLATIONS AND STUDY OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAINS FROM SAMPLES OF DIFFERENT ORIGIN

SUMMARY

We isolated 25 strains of Pseudomonas aeruginosa from 63 samples of different origin. This was 21 from human lesions with 9 isolations 20 from animals with 8 isolations and 22 samples from natural waters with 5 isolations.

We made the identifications of these strains by the study of the morphological, tintorial, cultural and biochemical characteristics.

We proof the experimental pathogenic action by inoculation in Roeland strain of white mouse and we obtain few variations in the compartment. We assay 4 antiseptics from which 3 was comportated with uniformity.

In front of penicilin it was always resistent and in the presence of tetracycline, anastrepto, ampiciclina, and colistin, the sensibility of the strains studied was variable.

(*) Trabajo realizado en la Cátedra de Microbiología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

(1) Profesor Titular.

(2) Jefe de Trabajos Prácticos.

(3) Ayudante Diplomado de Microbiología.

(4) Ayudante Diplomado de Microbiología.

(5) Ayudante ad-honorem.

(6) Auxiliar de la Docencia del Instituto de Limnología. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata.

ANTECEDENTES

Emprendimos este trabajo con el propósito de aislar *Pseudomonas aeruginosa*, identificarla con técnicas simples y rápidas y comparar algunos de los caracteres de cepas aisladas de procesos patológicos humanos y animales y las del ambiente natural.

Sabemos que este microorganismo no está aún claramente ubicado y definido desde el punto de vista de su patogenicidad. Es considerado un oportunista que produce distintos tipos de infecciones, superficiales y profundas, en el hombre y animales, principalmente cuando las defensas están debilitadas. Como agente secundario de invasión puede ser causante de meningitis en el lactante y en el adulto, otitis en el hombre y animales, etc.

En la naturaleza es un agente de la putrefacción de la materia orgánica y un saprófito muy difundido; se encuentra frecuentemente en el suelo, agua y aire, sobre la superficie de la piel y en el tubo digestivo del hombre y animales. De ahí la facilidad con que se agrega y asocia a procesos patológicos superficiales.

Desde que Gessard en 1882 aisló este bacilo, numerosos investigadores se han ocupado de diversos aspectos de sus actividades biológicas. Lo que ha llamado la atención es la pigmentogénesis; Seelen N. A. (1943) entre otros, estudió algunas características del género *Pseudomonas* relacionadas con la producción de pigmentos, recalcando la importancia de los constituyentes del medio de cultivo y la acción inhibidora de metales pesados. Haynes, ET AAO II IN IN IN O TA Haynes, W. C. (1951) y Gaby, W. L.

col. (1957) estudiaron tests de laboratorio útiles para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*. Este último encontró que las cepas aisladas de especímenes humanos producían una alta concentración de citocromooxidasa, detectable por un test simple y rápido. Kovacs, N. (1956) comunicó la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la reacción de oxidasa. Esta prueba tiene singular valor por cuanto su positividad se mantiene en las cepas que han perdido la pigmentogénesis. Bulmann, W. A. (1961) en un estudio realizado en cepas no productoras de pigmento, estableció la importancia del test de incubación a temperaturas de 0 y 42 °C para identificar *Pseudomonas aeruginosa* acompañado de la determinación de virulencia para el ratón cepa Suiza. Park, H. A. W. (1962) estudiando bacterias heterotróficas con flagelo polar, aisladas de agua, identificó tres géneros, primariamente por movilidad y secundariamente por tests bioquímicos, estableciendo porcentajes de cepas que dan resultados positivos con cada test practicado. Menciona la utilidad del test de utilización de hidratos de carbono como única fuente de carbono. Gaby W. L. y col. (1961) estudió la patogenicidad para el ratón de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de distinto origen clínico, comprobando la débil patogenicidad de cepas aisladas de infecciones humanas con respecto a la severidad de los procesos clínicos de las cuales procedían. Los resultados obtenidos demuestran la variable virulencia que pueden tener diferentes cepas en esas condiciones experimentales.

MATERIAL Y METODO

La búsqueda de *Pseudomonas aeruginosa* la realizamos en 63 muestras que obtuvimos del hombre y de distintas especies animales como también de ambientes naturales. Las muestras de origen humano fueron 21, proce-

dentales de orina, otitis y lesiones traumáticas, las de procedencia animal fueron 20, correspondientes 5 a bovinos sin manifestaciones clínicas y 15 a caninos con procesos patológicos con predominancia de otitis. También tra-

bajamos con 22 muestras de agua provenientes de la ribera del Río de La Plata, de la zona comprendida entre el paraje denominado "Boca cerrada" al norte y el Balneario "La Balandra" al sur. (Cuadro N° 1). Incluimos en este trabajo 3 cepas de colección.

La marcha bacteriológica comprendió los siguientes pasos: aislamiento en medio de King (King, E. O. y col. 1954); la pigmentación en este medio fué el punto de referencia para efectuar los aislamientos e identificación. Por lo tanto, las cepas que no tenían originariamente la propiedad de pigmentogénesis no fueron tomadas en cuenta en este trabajo. Observaciones en fresco y previa coloración, incubación de especímenes a temperaturas disgenésicas (0 y 42 °C); pruebas bioquímicas; investigación de piocianina y acción patógena experimental.

Las pruebas bioquímicas más importantes realizadas para la identificación fueron las siguientes: test de oxidasa según la técnica de Kovacs; investigación de catalasa con agua oxigenada de 20 volúmenes; oxidación de glucosa en medio de Hugh y Leifson; reducción de nitratos a nitritos y producción de hidrógeno sulfurado.

Efectuamos la investigación de pigmentos en caldo de pH alcalino, separando la piocianina por extracción clorofórmica. Al depositar este extracto en cápsula de Petri y evaporarse el solvente, obtuvimos cristales de piocianina.

A fin de conocer el grado de virulencia de las cepas aisladas, inoculamos ratones blancos cepa Roeland, de 25 - 30 gr, por vía subcutánea con 0,2 cc. de cultivo de 48 hs. A los animales muertos le practicamos la necropsia y buscamos retomar el germen por siembra de sangre obtenida por punción cardíaca, en agar nutritivo.

Con el objeto de conocer la concentración inhibitoria mínima de distintos antisépticos de uso terapéutico común en aplicaciones locales, cultivamos las cepas en caldo nutritivo con

diluciones crecientes de mertiolate, bicloruro de mercurio, ácido bórico y alcohol 96°. Después de una incubación de 24 horas comprobamos la presencia de organismos viables sembrando un ansa de cada dilución de la siembra en caldo, en agar nutritivo.

Además tratamos de poner en evidencia la acción in vitro de distintos antibióticos por medio del test sensitivo primario usando discos standard de uso común, conteniendo los siguientes antibióticos y concentraciones por disco:

Penicilina: 10 U. O.
 Ampliciclina: 25 gamas
 Estreptomina: 15 gamas
 Canamicina: 30 gamas
 Neomicina: 30 gamas
 Cefalosporina: 30 gamas
 Lincomicina: 10 gamas
 Rifampicina: 30 gamas
 Furoxona: 50 gamas
 Novobiocina: 10 gamas
 Cloramfenicol: 30 gamas
 Tetraciclina: 30 gamas
 Gentamicina: 10 gamas
 Oleandomicina: 10 gamas
 Rifocina: 15 gamas
 Aminosidina: 30 gamas
 Ac. nalidíxico: 30 gamas
 Meticilina: 15 gamas
 Eritromicina: 10 gamas
 Espiramicina: 30 gamas
 Colistín: 10 gamas
 Oxacilina: 15 gamas
 Paramomicina: 30 gamas
 Polimixina B: 100 U. O.
 Furadantina: 50 gamas

Además practicamos el método de las diluciones en tubo con los siguientes antibióticos:

Penicilina

Anastrepto (Estreptomina + Dihidroestreptomina: a. a.)

Rifocina

Tetrafenicol (Tetraciclina + Cloramfenicol: a. a.)

Ampliciclina (Novobiocina + Mepencilina: conc. 1 : 2)

Colisina (Colistín + Cloramfenicol: conc. 394 mgs : 1 g.)

En todos los casos efectuamos diluciones crecientes al décimo a partir de soluciones madres concentradas de cada uno de los antibióticos, utilizando como diluyente caldo nutritivo. El volumen final de medio de prueba con antibiótico fué de 2,5 cc. en todos los casos. El inóculo fué de 0,1 cc. de cepa cultivada en caldo durante 48 - 72 hs. La incubación se rea-

lizó a 37 °C durante 24 hs., al cabo de las cuales realizamos las lecturas. Consideramos que el antibiótico o antiséptico tenía acción inhibitoria cuando el medio de cultivo no presentaba signos visibles de crecimiento. En los casos en que no se pudo diferenciar claramente la multiplicación, repicamos en agar nutritivo para comprobar viabilidad.

RESULTADOS

Aislamos 22 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de 63 muestras testadas. De éstas, 9 procedían de procesos patológicos humanos, 8 de otitis canina y 5 de agua.

Las cepas se comportaron uniformemente desde el punto de vista de su movilidad, características tintoriales, pigmentogénesis, crecimiento en temperaturas disgenésicas y propiedades bioquímicas. Comprobamos comportamiento variable en la producción de catalasa (no producida por las cepas 6, 7 y 8); oxidación de glucosa (negativa para cepas 1, 2, 5, 6, 14, y 22), y producción de hidrógeno sulfurado (positivo para cepas 9 y 17).

Todas las cepas aisladas demostraron acción letal para el ratón, en la dosis inoculada, entre 24 y 48 hs. La cepa 7, aislada de otitis humana demostró poseer acción patógena más retardada (Cuadro N° 2). En la necropsia, observamos hemorragia generalizada, edema, infarto ganglionar, congestión y pigmentación verdosa de tejido subcutáneo. En todos los casos recuperamos el microorganismo, por siembra de sangre obtenida por punción cardíaca, en agar nutritivo.

Frente a la acción de los antisépticos, todas las cepas aisladas y las de colección examinadas demostraron

comportamiento uniforme frente a las mismas concentraciones de alcohol, ácido bórico y bicloruro de mercurio. Sin embargo, fue distinta la sensibilidad de 7 cepas frente al mertiolate. (Cuadro N° 3).

En el test sensitivo primario para antibióticos, todas las cepas estudiadas se mostraron resistentes, excepción de la N° 20 que fué inhibida en un halo de 9 mm. por el colistín. En cambio, en el método de las diluciones en tubo (Cuadro N° 4), sólo demostraron resistencia total a la penicilina, desde la mayor concentración ensayada (50.000 U. O. por cc.) Con rifocina las cepas demostraron sensibilidad entre 0,25 mg por cc. a 2,5 mg por cc. El tetrafenicol inhibió en la concentración de 2 y 20 gamas, a excepción de la cepa 11 que se comportó como la más sensible. Las concentraciones de anastrepto que inhibieron el crecimiento oscilaron entre 100 gamas y 10 gamas por cc. Ampli-ciclina inhibió el crecimiento en concentraciones comprendidas entre 30 gamas y 300 gamas por cc.

Colisina actuó como inhibidor en las concentraciones de 3,94 gamas y 39,4 gamas con excepción de la cepa 13 que fué sensible en la concentración de 394 gamas.

DISCUSION

Las cepas aisladas, a pesar de tener distinto origen, demostraron poseer características muy similares, según los tests practicados por nosotros (Cuadro N° 2). Sin embargo, debe-

mos señalar algunas aparentes excepciones a esta afirmación, por ejemplo, la negatividad para la prueba de catalasa. Este es un hecho que ocurre frecuentemente por cuanto no todas

las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* conocidas tienen esta propiedad, de acuerdo a hallazgos hechos por otros investigadores. Tiene valor la uniforme positividad al test de oxidasas, una de las pruebas más efectivas para la identificación de estos microorganismos. La irregularidad en la oxidación de la glucosa es también otro hecho comprobado ya con anterioridad.

En cuanto a la acción patógena experimental los resultados obtenidos dan solamente un dato de orientación con respecto a las diferencias que se pueden observar desde este punto de vista, entre distintas cepas. Pero lo evidente es que el ambiente acuático del cual se aislaron algunas cepas no interviene disminuyendo la virulencia de estos microorganismos. Muy por el contrario, los resultados obtenidos nos permiten observar que son éstas las cepas que en menor tiempo han producido la muerte del ratón. Hubiera sido interesante hacer una titulación para precisar con mayor exactitud el comportamiento de las cepas en la inoculación experimental, lo que será objeto de nuevas búsquedas.

Frente a la acción de los antisépticos *in vitro*, es llamativa la uniformidad que se observa en el comportamiento de todas las cepas, con la

única excepción del mertiolate, cuyas pequeñas diferencias en la concentración inhibitoria mínima, podría deberse a características particulares de las cepas.

Es conocida la gran resistencia que ofrece este microorganismo a la acción de diversos antibióticos. Lo hemos corroborado en este trabajo con algunos, cuyos resultados aparecen en el cuadro N° 4. La sensibilidad de las cepas, observada frente a la rifocina, se produce solamente en altas concentraciones, muy por encima de los niveles que pueden estar presentes en sangre en los tratamientos, y de las concentraciones que se usan para hacer el test sensitivo primario para uso clínico. La menor resistencia a tetraciclina y anastrepto demostrada por algunas cepas en el método de diluciones en tubos que la comprobada en el test sensitivo primario, podría deberse a una diferencia de sensibilidad de ambos métodos. La acción inhibitoria ejercida por colistina y ampliciclina responde en líneas generales a lo observado en el test sensitivo primario y demuestran un relativo alto grado de resistencia de las cepas a estos agentes terapéuticos.

También notamos diferencias en cuanto a dosis efectivas de los antibióticos en varias cepas.

CONCLUSIONES

Las cepas aisladas de *Pseudomonas aeruginosa* tienen características generales que presentan muy pocas variaciones en el conjunto. Notamos variaciones en el tiempo en que se produjo la acción patógena en ratón en algunos casos, y la acción bactericida de algunos antibióticos, principal-

mente aquellos que son complejos como tetraciclina, anastrepto, ampliciclina y colistín. Esta diversidad de comportamiento no guarda relación con el ambiente del que ha sido aislada la cepa. Las cepas de colección testadas, ofrecen en cambio, comportamiento uniforme.

BIBLIOGRAFIA

ACTIS DATO, A.; PAINCEIRA, M. T. y SALGADO, L. P.: *Sensibilidad in vitro a los agentes antimicrobianos y antibióticos de 118 cepas de Pseudomonas aeruginosa por el procedimiento*

de difusión. Rev. Asoc. Bioquím. Arg., 1963, XXVIII, 145/146, 43-52.

BULMANN, W. A.: *Identification of a pyocyanogenic strains of Pseudomo-*

- nas aeruginosa*. J. Bact., 1961, 82: 787-788.
- GABY, W. L.: *Practical laboratory test for the identification of Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact., 1957, 74 (3): 356-358.
- GABY, W. L.: *Pathogenicity of strains of Pseudomonas aeruginosa for mice*. J. Bact., 1961, 82: 149-150.
- KING, E. O.: *Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein*. J. Lab. Clin. Med., 1954, 44: 301-307.
- KOVACS, N.: *Identification of Pseudomonas pyocyanea by oxidasa reaction*. Nature, 1956, 178: 703.
- PARK, H. A. W.: *A study of certain heterotrophic polary flagellated water bacteria: Aeromonas, Pseudomonas y Comamonas*. J. Gen. Microbiol., 1962, 27: 121-133.
- SEELEN, N. A.: *Some characteristics of green fluorescent pigment-producing bacteria*. J. Bact., 1943, 46: 491-500.
- SOLARI, A. A.; ACTIS DATO, A.; HERRERO, M. M.; CRENASCHI, M. S. D. de; REID, M. I. de; SALGADO, L. P. y PAINCEIRA, M. T.: *Sobre la identificación rápida de Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Asoc. Bioquím. Argent., 1962, XXVII, 93-103.

CUADRO N° 1
ORIGEN DE LAS CEPAS AISLADAS

Cepa N°	Aislada de:	Especie	Procedencia
1	otitis	humana	Fac. Cs. Vet.
2	otitis	canina	Fac. Cs. Vet.
3	otitis	canina	Fac. Cs. Vet.
4	otitis	canina	Fac. Cs. Vet.
5	agua	—	Río de la Plata
6	lesión traum.	humana	Clínica privada
7	otitis	humana	Clínica privada
8	otitis	canina	Fac. Cs. Vet.
9	otitis	canina	Fac. Cs. Vet.
10	agua	—	Río de la Plata
11	agua	—	Río de la Plata
12	otitis	humana	Clínica privada
13	orina	humana	Clínica privada
14	otitis	humana	Clínica privada
15	agua	—	Río de la Plata
16	agua	—	Río de la Plata
17	otitis	canina	Fac. Cs. Vet.
18	otitis	canina	Fac. Cs. Vet.
19	otitis	humana	Clínica privada
20	orina	humana	Clínica privada
21	cepa colec.	—	Cepario Fac. Cs. Vet.
22	cepa colec.	—	Cepario Fac. Cs. Vet.
23	otitis	humana	Clínica privada
24	otitis	canina	Fac. Cs. Vet.
25	cepa colec.	—	Cepario Fac. Cs. Vet.

CUADRO N° 2

Cepa N°	Movilidad	Gram	Caldo-Pelíc. Pig.	Crecimiento a 42 °C	Crecimiento a 0 °C	Piocianina	Oxidasa	Catalasa	Gelatina	Citrato	Nitratos	Ox. Glucosa	RM	VP	SH ₂	Acción Patógena Experimental
1	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	24 hs.
2	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	48 hs.
3	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
4	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
5	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	24 hs.
6	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	24 hs.
7	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	—	—	—	72 hs.
8	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	48 hs.
9	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	24 hs.
10	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
11	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
12	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
13	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
14	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	24 hs.
15	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
16	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
17	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	24 hs.
18	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
19	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
20	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	24 hs.
21	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	48 hs.
22	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	36 hs.
23	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	48 hs.
24	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	48 hs.
25	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	72 hs.

CUADRO N° 3
Diluciones inhibidoras de antisépticos

Cepa N°	Alcohol 96 °	Ac. Bórico	Mertiolate	Bicloruro de Mercurio
1	1/5	1/100	1/100.000	1/400.000
2	"	"	"	"
3	"	"	"	"
4	"	"	"	"
5	1/5	1/100	1/200.000	1/400.000
6	"	"	"	"
7	"	"	"	"
8	"	"	1/100.000	"
9	1/5	1/100	1/100.000	1/400.000
10	"	"	"	"
11	"	"	"	"
12	"	"	"	"
13	1/5	1/100	1/200.000	1/400.000
14	"	"	1/100.000	"
15	"	"	"	"
16	"	"	1/200.000	"
17	1/5	1/100	1/100.000	1/400.000
18	"	"	"	"
19	"	"	"	"
20	"	"	"	"
21	1/5	1/100	1/200.000	1/400.000
22	"	"	"	"
23	"	"	1/100.000	"
24	"	"	"	"
25	"	"	"	"

CUADRO N° 4
Sensibilidad a antibióticos

Cepa N°	Penicilina	Rifosina	Tetra-fenicol	Anas-trepto	Ampli-ciclina	Colisina
1	R	0,25 mg	2 gamas	100 gamas	30 gamas	3,94 gamas
2	R	0,25 mg	20 gamas	100 gamas	30 gamas	3,94 gamas
3	R	0,25 mg	2 gamas	10 gamas	30 gamas	3,94 gamas
4	R	0,25 mg	20 gamas	10 gamas	30 gamas	39,4 gamas
5	R	0,25 mg	2 gamas	100 gamas	300 gamas	3,94 gamas
6	R	0,25 mg	2 gamas	100 gamas	30 gamas	3,94 gamas
7	R	0,25 mg	2 gamas	100 gamas	30 gamas	3,94 gamas
8	R	0,25 mg	2 gamas	10 gamas	30 gamas	3,94 gamas
9	R	0,25 mg	20 gamas	100 gamas	300 gamas	39,4 gamas
10	R	0,25 mg	2 gamas	100 gamas	30 gamas	3,94 gamas
11	R	2,5 mg	0,2 gamas	10 gamas	300 gamas	39,4 gamas
12	R	2,5 mg	20 gamas	100 gamas	30 gamas	39,4 gamas
13	R	2,5 mg	20 gamas	100 gamas	300 gamas	39,4 gamas
14	R	2,5 mg	20 gamas	100 gamas	300 gamas	39,4 gamas
15	R	2,5 mg	20 gamas	10 gamas	30 gamas	39,4 gamas
16	R	2,5 mg	20 gamas	100 gamas	30 gamas	39,4 gamas
17	R	2,5 mg	20 gamas	100 gamas	30 gamas	39,4 gamas
18	R	2,5 mg	20 gamas	10 gamas	300 gamas	39,4 gamas
19	R	2,5 mg	20 gamas	10 gamas	300 gamas	3,94 gamas
20	R	2,5 mg	20 gamas	10 gamas	30 gamas	39,4 gamas
21	R	0,25 mg	20 gamas	100 gamas	30 gamas	39,4 gamas
22	R	0,25 mg	20 gamas	100 gamas	30 gamas	39,4 gamas
23	R	0,25 mg	20 gamas	100 gamas	30 gamas	39,4 gamas
24	R	0,25 mg	20 gamas	100 gamas	30 gamas	39,4 gamas
25	R	0,25 mg	20 gamas	100 gamas	30 gamas	39,4 gamas