

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

HOSPITAL PEDIÁTRICO "PEDRO BORRÁS"

## Susceptibilidad antimicrobiana y serotipaje de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes VIH/SIDA

Lic. Daniel Salasar Rodríguez,<sup>1</sup> Lic. Aileen González Rizo,<sup>2</sup> Dra. Sara Palma Monroy<sup>3</sup> y Téc. Teresa Reyes<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se analizaron 68 cepas aisladas de pacientes seropositivos atendidos en el hospital del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", durante el período comprendido desde octubre de 1996 hasta septiembre de 1997. Se les realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer y estudio antigénico mediante aglutinación en placa del antígeno somático. Los serogrupos con mayor frecuencia de aislamiento fueron O1 (27,9 %), O11 (10 %), O6 (8,8 %) y O5 (7,3 %); 21 cepas de 68 aislamientos (30,9 %) no pudieron ser agrupadas por serotipaje. Todas las cepas resultaron sensibles a gentamicina y azlocilina, la mayoría de los aislamientos fueron susceptibles a ceftazidime (n=66), ciprofloxacina (n=62). Por otra parte 25 de los 68 aislamientos (35,7 %) mostraron resistencia a cefotaxima. No se pudo demostrar una relación directa entre la resistencia a los antibióticos y los resultados serológicos. De acuerdo con estos resultados, la gentamicina tiene una elevada efectividad contra las cepas analizadas, en los años recientes deberá llevarse a cabo un uso más racional de betalactámicos y quinolonas para evitar el surgimiento de cepas multiresistentes en Cuba.

**DeCS:** PSEUDOMONAS AERUGINOSA/aislamiento & purificación; VIH; SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA; INFECCIONES OPORTUNISTAS RELACIONADAS CON SIDA; RESISTENCIA MICROBIANA A LAS DROGAS; TESTS DE SENSIBILIDAD MICROBIANA; SEROTIPIFICACION.

En las últimas décadas, *Pseudomonas aeruginosa* se ha erigido como una de las bacterias gramnegativas más problemáticas en el ambiente hospitalario,<sup>1,2</sup> que afecta a pacientes en estado crítico, y causa infecciones serias y fatales que van desde una enfermedad sistémica aguda en quemados y pacientes neutropénicos, hasta infecciones crónicas del tracto respiratorio en pacientes con fibrosis quística del páncreas (FQ).<sup>3</sup> *Pseudomonas aeruginosa* es la responsable de 50 % de las neumonías, 25-50 % de las bacteriemias fatales y se presenta con una alta tasa de morbilidad y mortalidad (más de 75 %) en las infecciones nosocomiales.<sup>4</sup> Esta bacteria es

considerada un patógeno oportunista por excelencia, aunque hace poco se han descrito formas más agresivas que son capaces de infectar individuos virtualmente sanos. Ejemplo de esto lo son las afecciones de la córnea, en especial en personas que usan lentes de contacto.<sup>5</sup>

En los últimos años la infección por esta bacteria ha sido reportada en los pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH),<sup>6</sup> ocupando el tercer lugar después de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.<sup>7,8</sup>

Esta bacteria es usualmente resistente a una amplia variedad de agentes antibacterianos que van

<sup>1</sup> Licenciado en Biología. Hospital Pediátrico "Pedro Borrás".

<sup>2</sup> Licenciada en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK).

<sup>3</sup> Especialista de I Grado en Microbiología. IPK.

<sup>4</sup> Técnica en Microbiología. IPK.

desde antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos y más recientemente, las nuevas quinolonas ipenemen y cilostina.<sup>9,10</sup>

En el presente trabajo se estudió el comportamiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a 5 antibióticos antipseudomonas, su clasificación serológica según el sistema internacional de tipificación serológica<sup>11</sup> y su relación con el comportamiento frente a estos antimicrobianos.

## MÉTODOS

### CEPAS

#### Cepas controles

*Escherichia coli* ATCC 25922. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, donadas por el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología y (INHEM), Cuba.

Se trabajaron 68 cepas de bacilos gramnegativos aislados de pacientes VIH/SIDA que fueron atendidos en el Hospital del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", durante el período octubre 1996 a septiembre 1997.

### MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVOS

Las cepas fueron inoculadas en caldo cerebro corazón (BHI) y se incubaron a 35 °C durante 18 h en condiciones de aerobiosis. A partir del medio BHI se realizaron pases a placas con agar Mac Conkey y se incubaron 24 h a 35 °C. El estudio bioquímico se realizó según el esquema de King-Weaver.<sup>12</sup> Todos los reactivos utilizados correspondieron a la casa comercial Oxoid (Inglaterra).

### PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Discos antibióticos utilizados: cefotaxima (5 µg), ceftazidima (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg) suministrados por el Centro de productos biológicos, Carlos J. Finlay, Cuba. El patrón de susceptibilidad de las 68 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se determinó con la metodología de Kirby-Bauer modificado.<sup>13</sup>

## ESTUDIO ANTIGÉNICO

La determinación del antígeno somático se realizó por el método de aglutinación en placa, con 4 sueros polivalentes y 16 antisueros monovalentes policlonales de *Pseudomonas aeruginosa* (CEBI, Cuba), de acuerdo con el Sistema Internacional de Tipificación Antigénica (IATS).<sup>11,14</sup>

## RESULTADOS

En la tabla 1 se evidencia la procedencia de las 68 cepas estudiadas, que se confirmaron por su biofenotipo como *Pseudomonas aeruginosa* según el esquema de clasificación de King-Weaver.<sup>12</sup> Los resultados del estudio de susceptibilidad *in vitro* de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a 5 antimicrobianos evidencian que los antibióticos más efectivos fueron gentamicina y azlocilina con 100 % de las cepas sensibles, y el antimicrobiano frente al cual estas cepas desarrollaron más resistencia fue cefotaxima (con 8,8 % de cepas sensibles) (tabla 2).

**TABLA 1.** Procedencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes VIH/SIDA

Procedencia	Cantidad de cepas
Espustos	50
Exudado faríngeo	9
Secreciones bronquiales	2
Exudado ótico	6
Coprocultivo	1
Total de cepas	68

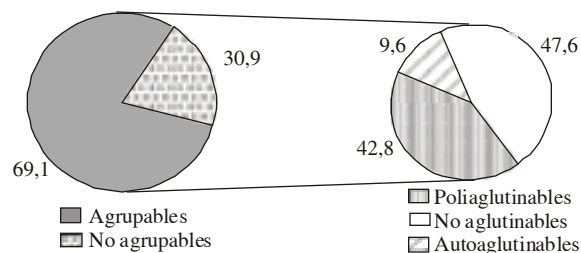
Desde el punto de vista serológico se pudieron agrupar 47 cepas y 21 no se pudieron agrupar (10 cepas poliaglutinables, 9 cepas no agrupables, 2 cepas autoaglutinables) (fig). Se confirmaron 9 patrones serológicos y resultaron más frecuentes los serogrupos O1 seguido por el O11 y O6 (tabla 3). Se observó una similitud en el comportamiento de estos aislamientos frente a los antimicrobianos ensayados, exceptuando la cepa perteneciente al serogrupo O12, que mostró resistencia a ciprofloxacina, cefotaxima y ceftazidima.

**TABLA 2.** Resultados de la prueba de susceptibilidad *in vitro* de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Discos de antibiótico utilizados		Sensibles		Intermedias		Resistentes	
		N	%	N	%	N	%
Aminoglucósidos	Gentamicina	68	100	0	0	0	0
Beta lactámicos	Azlocilina	68	100	0	0	0	0
	Ceftazidima	66	97,0	1	1,4	1	1,4
	Cefotaxima	6	8,8	37	54,4	25	35,7
Quinolonas	Ciprofloxacina	62	91,8	5	7,3	1	1,4

**TABLA 3.** Distribución serológica de las cepas agrupables de

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
Serogrupos	O1	O2	O4	O5	O6	O8	O11	O12	
Cantidad de cepas	9	2	3	5	6	1	7	1	
Porcentaje	27,9	2,9	4,4	7,3	8,8	1,4	10,2	1,4	



**Fig.** Agrupabilidad de las 68 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes VIH+.

## DISCUSIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* ha sido aislada con frecuencia en diferentes muestras de origen respiratorio obtenidas de pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).<sup>6,9,10</sup> En este estudio también se encontraron con mayor frecuencia los aislamientos procedentes de esputos bacteriológicos.

En el estudio serológico se encontró 30,9 % de cepas no agrupables, se pudo alcanzar solo 69,1 % de indentificación, pero coincide con lo reportado por otros autores en cuanto al predominio de los serogrupos O1,O11,O6.<sup>15-21</sup>

Dentro de los 6 antibióticos utilizados, la azlocilina y la gentamicina fueron las drogas de

mayor sensibilidad y la cefotaxima la que mostró mayor nivel de resistencia ante las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Los aminoglucósidos, con excepción de la estreptomina, siguen siendo drogas con elevada actividad antipseudomonas, aunque se han reportado altos niveles de resistencia por transconjugación, con excepción de gentamicina,<sup>22</sup> el antibiótico utilizado en el estudio perteneciente a este grupo mostró una alta efectividad antipseudomonas en las cepas estudiadas. En Europa se ha encontrado asociación de la resistencia a gentamicina con el serogrupo O12,<sup>15</sup> en las cepas analizadas este serogrupo mostró sensibilidad a este antibiótico pero fue resistente a ciprofloxacina, cefotaxima y ceftazidima.

Dentro del grupo de los antibióticos betalactámicos, la azlocilina mostró mucho más efectividad que la ceftazidima, pues 100 % de las cepas fueron sensibles a azlocilina, aunque en otros trabajos se ha reportado el hallazgo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (0,3%) con resistencia asociada con la presencia de enzimas PSE 1 o PSE 4<sup>23</sup> con concentración mínima inhibitoria >16 µg/mL.<sup>24</sup> Kolar y Pfaller encontraron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con altos niveles de resistencia a cefotaxima,<sup>25,26</sup> al igual que lo encontrado en este estudio. Aunque en este trabajo solo se encontró una cepa resistente a ciprofloxacina y 5 cepas de las estudiadas con valores intermedios de susceptibilidad, los autores consideran que este fenómeno constituye una señal de alerta; por tal motivo se hace necesario vigilar el surgimiento y la propagación de cepas resistentes a las nuevas quinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina), por los reportes de altos niveles de resistencia a las fluorquinolonas.<sup>27-31</sup>

## SUMMARY

Sixty-eight strains from seropositive patients seen at "Pedro Kourí" Tropical Medicine Hospital from October 1996 to September 1997 were analyzed in this study. Antimicrobial susceptibility tests by the Kirby-Bauer method and antigenic study through slide agglutination of the somatic antigen were performed in such strains. The most frequent isolated serogroups were 01(27.9%), 011(10%), 06(8.8%) and 05(7.3%); twenty-one strains of 68 isolates (30.9%) could not be serotyped. All the strains were susceptible to gentamycin and azlocylin; most of isolates were susceptible to ceftazidime (n=66), and ciprofloxacin (n=62). On the other hand, 25 of the 68 isolates (35.7%) showed resistance to cefotaxime. No direct relation between antibiotic resistance and serologic results could be proved. According to these results, gentamycin is highly effective for treating analyzed strains. In the forthcoming years, beta-lactams and quinolones should be more rationally used so as to prevent the emergence of multi-resistant strains in Cuba.

**SUBJECT HEADINGS:** PSEUDOMONAS AERUGINOSA/ isolation & purification; HIV; ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME; AIDS-RELATED OPPORTUNISTIC INFECTIONS; DRUG RESISTANCE, MICROBIAL; MICROBIAL SENSITIVITY TESTS; SEROTYPING.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Vos D, Lima JR, Pirnay JP, Strullens M, Duinslager L, Vanderkelen A. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimen and expectoration by multiplex PCR bases in outer membrane lipoprotein genes, Opr I and Opr L. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1295-8.
- Speijer H, Sovelkoul P, Boten M, Stobberingh E, Tjhie J. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa*, a setting of endemicity in an intensive care unit. *J Clin Microbiol* 1997;37(11):3654-61.
- Yu H, Boucher JC, Hibler NS, Deretic V. Virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* lacking the extreme stress sigma factor Alg U ( $\sigma^5$ ). *Inf Immun* 1996;64(7):2774-81.
- Stanley J, Cryz JR. *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Bacteriol Vacc* 1984;( ):317-45.
- Mlot C. *Pseudomonas* can thwart the eye's multitiered infection defenses. *ASM News* 2000;66(2):66.
- Roca B, Vilar C, Pérez EV, Sáez-Rayuela A, Simón A. Breast abscess with lethal septicemia due to *Pseudomonas aeruginosa* in patient with AIDS. *Presse Med* 1996;25(17):803-4.
- Asboe D, Gant N, Auchen HM, Moore DA, Umasonkar S, Bingham JS. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* strain in respiratory infection in AIDS patients. *AIDS* 1998;12(14):1771-5.
- Taylor IK, Coken RJ, Mass FM. Pulmonary complication of HIV disease 10-year of retrospective evolution of yields from bronchoalveolar lavage 1983-1993. *Thorax* 1995;50(12):
- Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Chen YC, Ho SW, Luh KT. Persistence of multidrug-resistance *Pseudomonas aeruginosa* clones in an intensive care burn unit. *J Clin Microbiol* 1998;36(5):1347-51.
- Nikae T. Multiantibiotic resistance caused by active drug resistance extrusion in *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Microbiol Sem* 1997;13:273-84.
- Lui PV, Matsumoto H, Kusama H, Bergan T. Subeg of heat-stable, major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Systematic Bacteriol* 1983;33:256-64.
- King EO, Weaver RE, Tatum HW, Hollis DG. Identification of unusual pathogenic gram-negative bacteria. Atlanta: Center of Diseases Control, 1972.
- NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighth Informational. Supplement. 1998;18(1):37p.
- Ansorg RA, Knoche ME, Spies AF, Kraus CT. Differentiation of the major flagellar antigens of the *Pseudomonas aeruginosa* by the slide coagglutination technique. *J Clin Microbiol* 1984;20(1):84-8.
- Watine J, Mifsud AJ, Picard B, Chacet JC, Solignou-Bourred, Pitt TL. Epidemiologically related and unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* K serotype 012 cannot be distinguished by phenotypic and genotypic. *J Hosp Infect* 1997;36:105-16.
- Ojeiyi B, Wols C, Doring J, Lam S, Rusdhal HN. Typing of polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *APMIS* 1990;98:423-31.
- Esnard SC. Empleo de sueros diagnósticos producidos en la República Popular China para serotipificación de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Cubana Farm* 1997;31(12):107-12.
- Millesino M, De Initis G, Chirillo MG, Musso T, Savoia D. *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: serotypes, resistance phenotypes and plasmid profiles. *Eur J Epid* 1996;12:123-9.
- Tassios P, Gennimata V, Maniates AN, Fock C, Legakis BJ. Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroups 011. The Greek *Pseudomonas aeruginosa*. Study group. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):897-901.
- Kinoshita M, Sawabe E, Okamura N. Concept of segmentation in epidemiology, epidemiological relation among antimicrobial-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect* 1997;35(3):269-76.
- Pleissot P, Alkahalaf B, Michael-Brian Y. Prevalence and profiles of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:261-4.
- El-Karsh T, Tawfik AF, AL-Shammary F, Al-Slah S, Kambal AM, Shibi AM. Antimicrobial resistance and prevalence of extended spectrum beta-lactamase among clinical isolates of gram-negative bacteria in Riyadh. *Chemother* 1995;7(6):509-14.
- Chen MY, Yuan M, Liner More DM. Mechanism of resistance to beta-lactam antibiotic amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates in the UK in 1993. *J Med Microbiol* 1995;43(4):300-9.
- Chen MY, Yuan M, Ibrahim-El Magboul IB, Livermore DM. National survey of susceptibility to antimicrobial amongst clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrobiol Chemother* 1995;35(1):521-34.
- Kolar M, Kurasora Y, Latal T, Heijnar P, Faer E, Raida L. Bacterial strains isolates from neutropenia patients and their resistance to antibiotic. *Cos Lec Cesk* 1998;137(3):84-8.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV. Multicenter evaluation of the microbial activity for sex broad-spectrum beta-lactams in Venezuela using the E-Test method. The Venezuela Antimicrobial Resistance Study Group. *Diag Microbiol Infect Dis* 1998;30(31):45-52.
- Kohler T, Michea Hamzehpoor M, Plesiat P, Kahr AL, Pechene JC. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;161(11):254-43.
- Piddock LJ. Mechanisms of resistance to quinolones: State of art 1992-1994. *Drugs* 1995;49(Supp. 2):29-35.

29. Yanezawa M, Takahata M, Matsubara N, Watanabey Y, Narita H. DNA girase *gyr A* mutation in quinolone resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1970-2.
30. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role and *mexA-mexB OprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(9):1948-53.
31. Cambou E, Peroni E, Dib C, Petinon C, Trias J, Salier V. Role of mutation in DNA gyrase genes in ciprofloxacin

resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistance to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(10):2248-52.

Recibido: 15 de noviembre de 2000. Aprobado: 11 de abril de 2001.

Lic. *Daniel Salasar*. Hospital Pediátrico "Pedro Borrás. F y 27, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.