

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística

Dra. Miriam Fina Pérez Monrás,¹ Lic. María del Carmen Batlle Almodóvar,² Dra. Julia Verdera Hernández³ y Dra. Alina Llop Hernández⁴

RESUMEN

Se estudiaron 90 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de pacientes pediátricos del Hospital "William Soler" con fibrosis quística e infecciones respiratorias en el período de febrero y agosto de 2001, como parte de un proyecto de investigación conjunto entre las 2 instituciones. Se realizó el estudio de la susceptibilidad in vitro de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a 10 drogas antimicrobianas: azlocilina, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, ofloxacina, cloranfenicol y trimetoprim/sulfametoxazol, por el método de difusión con discos de Kirby-Bauer. Se utilizó la cepa de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los resultados de la investigación demostraron que los valores de susceptibilidad antimicrobiana estaban dentro de los límites aceptados. Se encontró una elevada resistencia frente al cloranfenicol (87,03 %) y trimetoprim/sulfametoxazol (92,28 %) y una alta sensibilidad frente a la azlocilina (85,0 %), ceftazidima (87,09 %), gentamicina (94,09 %), ciprofloxacina (94,8 %) y ofloxacina (92,5 %).

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, bacterias, resistencia a las drogas antimicrobianas, pacientes pediátricos con fibrosis quística.

Pseudomonas aeruginosa es el patógeno más importante dentro del género *Pseudomonas*, teniendo en cuenta la cantidad y tipos de infecciones (invasivas y tóxicas) que produce, así como la morbilidad y mortalidad que ocasiona.^{1,2}

A partir de la década de los 60 se ha incrementado el interés médico por esta especie, al convertirse en uno de los principales agentes causantes de enfermedades adquiridas en el ámbito hospitalario, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Otras especies de *Pseudomonas* causan enfermedades pero con menos frecuencia.²

Durante los últimos 30 años, *Pseudomonas aeruginosa* se ha convertido en un patógeno potencialmente importante en infecciones

adquiridas en el ámbito hospitalario, en especial en pacientes inmunocomprometidos, leucopénicos, quemados y en las unidades de cuidados intensivos.¹ Los antimicrobianos ejercen fuertes presiones selectivas sobre las poblaciones bacterianas y favorecen a aquellos microorganismos que son capaces de resistirlas.

Este microorganismo se plantea que ha reemplazado al *Staphylococcus aureus* como el principal patógeno en pacientes con fibrosis quística (FQ).²

La FQ es una enfermedad hereditaria y obstructiva crónica, más frecuente en los primeros años de la vida. Afecta esta enfermedad principalmente al aparato respiratorio y digestivo, en la cual una proteína anormal no permite el

¹ Especialista de II Grado en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Máster en Tecnología del ADN Recombinante. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada. Instructora Graduada. IPK.

³ Especialista de I Grado en Microbiología. Hospital Pediátrico "William Soler".

⁴ Especialista de II Grado en Microbiología. Profesora Titular. Profesora Consultante. IPK

ingreso y salida normales del cloruro, que junto al sodio forman la sal de ciertas células incluidas y revisten los pulmones y el páncreas, por lo que estas células producen una secreción mucosa espesa y pegajosa. La mucosidad obstruye los pulmones y causa problemas de respiración.³

Por causa de la alta tasa de mortalidad en los pacientes con FQ, la elevada capacidad de adaptación de las cepas infectantes y su característica mucoide, se estudian su diversidad y evolución, su resistencia a agentes antimicrobianos y la infección cruzada entre pacientes.³

La conveniencia de conocer la sensibilidad de las cepas de *Ps. aeruginosa*, aisladas de pacientes fibroquísticos se hace muy importante, para evitar el fallo terapéutico y el daño potencial de la diseminación de estos microorganismos, que por lo general presentan una elevada resistencia.³

Los mecanismos de resistencia de *Ps. aeruginosa* son complejos, variados y no del todo comprendidos. Algunos mecanismos son codificados por el ADN cromosómico, producido por la mutación genética. Otros son mediados por plásmidos. Aún más, algunas de estas moléculas de ADN están en transposones, segmentos genéticos que pueden moverse entre los cromosomas o entre cromosomas y plásmidos.⁴

En la presente investigación, sus autores se propusieron estudiar la sensibilidad antimicrobiana de 90 cepas de *Ps. aeruginosa*, aisladas de pacientes pediátricos con FQ procedentes del Hospital "William Soler".

MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de IRAB del Instituto de Medicina tropical "Pedro Kouri" (IPK), en el período comprendido entre febrero y agosto de 2001, con cepas aisladas en el Hospital "William Soler", procedentes de pacientes con fibrosis quística.

Cepas: se evaluaron 90 cepas de *Ps. aeruginosa* aisladas durante el período de febrero a agosto de 2001, procedentes del Laboratorio de Microbiología del Hospital Pediátrico "William Soler", aisladas de un total de 38 pacientes con

FQ y que presentaron durante el período de estudio cuadros de infecciones respiratorias. Las cepas fueron identificadas como *Ps. aeruginosa* y su identificación microbiológica se realizó por medio de pruebas bioquímicas.^{2,5}

Discos de antimicrobianos: se evaluaron un total de 10 drogas antimicrobianas: azlocilina (75 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), ofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg) y trimethoprim/sulfamethoxazol (1,25/23,75 µg). Todos los discos para antibiograma procedieron de la Empresa de Productos Biológicos "Carlos J. Finlay". Se realizó la aplicación del método tal y como se describe en las normas NCCLS (M2-A6) (National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement. Approved standard M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standard. 1999).

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana: se empleó el método de difusión con discos de Kirby-Bauer, según las recomendaciones del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS). Se utilizó para este fin la cepa de referencia para evaluar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Posteriormente se estudiaron 90 cepas de esta especie aisladas de pacientes pediátricos con fibrosis quística e IRAB. El procedimiento empleado fue el siguiente: a partir de un subcultivo del microorganismo de 16 a 18 h de incubación en agar Mc Conkey, se tomó una asada y se inoculó en caldo Mueller-Hinton (OXOID), se ajustó la concentración del inóculo a una turbidez equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland (10⁸ unidades formadoras de colonias/mL); con hisopo de algodón estéril se realizó luego la inoculación en medio agar Mueller-Hinton (OXOID).

Se colocaron posteriormente los discos de antimicrobianos (5 por cada placa) y estas se incubaron 24 h a 35 °C. Para la lectura se midieron en milímetros los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo y se compararon con los patrones establecidos por el NCCLS (tabla 1).

TABLA 1. Criterios para la interpretación de la susceptibilidad in vitro de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos (método de difusión con discos) (los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo se midieron en milímetros)

Antimicrobianos	Resistente	Susceptibilidad disminuida	Susceptible
Azlocilina	<17	-	>18
Ceftazidima	<14	15-17	>18
Cefotaxima	<14	15-22	>23
Ceftriaxona	<13	14-20	>21
Gentamicina	<12	13-14	>15
Tetraciclina	<14	15-18	>19
Ciprofloxacina	<15	16-20	>21
Ofloxacina	<12	13-15	>16
Cloranfenicol	<12	13-17	>18
Trimetoprim/Sulfametoxazol	<10	11-15	>16

Fuente: NCCLS , 1999.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran la elevada resistencia de las cepas estudiadas aisladas de pacientes con fibrosis quística, frente a drogas de amplio uso hospitalario como el cloranfenicol y el trimetoprim/sulfametoxazol. La mayor resistencia encontrada fue frente al cloranfenicol con 87,03 % y solo 12,97 % de cepas sensibles y frente al trimetoprim/sulfametoxazol la resistencia fue de 92,28 % y la sensibilidad de 7,72 %.

Los resultados de mayor sensibilidad se obtuvieron frente a azlocilina (85,0 %), ceftazidima (87,09 %), gentamicina (94,09 %), ciprofloxacina (94,8 %) y ofloxacina (92,5%) (tabla 2).

TABLA 2. Susceptibilidad antimicrobiana de 90 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de 38 pacientes con FQ

Droga	Resistente (%)	Sensible (%)
Azlocilina	15,0	85,0
Ceftazidima	12,91	87,09
Cefotaxima	27,95	72,5
Ceftriaxona	37,91	64,69
Gentamicina	5,91	94,09
Tetraciclina	56,0	44,0
Ciprofloxacina	5,2	94,8
Ofloxacina	7,5	92,5
Cloranfenicol	87,03	12,97
Trimetoprim/sulfametoxazol	92,28	7,72

Fuente: Laboratorio de IRAB del IPK, 2001.

DISCUSIÓN

Ps. aeruginosa en pacientes con enfermedades crónicas puede mostrar una variante fenotípica mucoide, dada por la síntesis de alginato, el cual

está determinado genéticamente y solo se presenta cuando existen daños o deterioro de la estructura orgánica donde se manifieste. En pacientes FQ, el deterioro de la función y estructura del pulmón dada por la infección crónica con este microorganismo, hace que se manifieste la variedad mucoide. Por encima de 80 a 90 % de estos pacientes desarrollan infecciones crónicas por *Ps. aeruginosa*.²

El método reconocido por la OMS de Bauer-Kirby, ha permitido conocer el nivel de resistencia y susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en placas de agar. Este método combinado con la serotipificación ha sido recomendado para estudiar los serotipos que aparezcan con mayor frecuencia en *Ps. aeruginosa*.

El incremento de la resistencia de las cepas de *Ps. aeruginosa* a la mayoría de los antimicrobianos se plantea puede deberse a la amplia utilización de antibióticos.⁶⁻⁸ En la actualidad se describe la emergencia de la resistencia de este tipo de infecciones frente a los agentes antimicrobianos. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, ocurre con todos los antibióticos, es decir, aislamientos que son inicialmente sensibles podrían transformarse en resistentes dentro de los 3 o 4 d posteriores a la iniciación de la terapia antimicrobiana.

Entre los métodos de estudio de la susceptibilidad antimicrobiana in vitro de *Ps. aeruginosa* están la dilución en agar, la difusión con tiras (E-test) y la difusión con discos.

Los 2 primeros ofrecen resultados cuantitativos, o sea, permiten conocer la concentración mínima inhibitoria necesaria para impedir el crecimiento del microorganismo, pero resultan muy costosos, requieren de un personal entrenado para su

ejecución y no están al alcance de todos los laboratorios; sin embargo, el método de difusión con discos es sencillo, de costo permisible, no requiere de personal calificado para su uso y aunque es un método cualitativo, brinda resultados confiables, lo cual hace a este método útil, no solo para los laboratorios de microbiología de instituciones altamente especializadas, sino también para laboratorios menos especializados.⁵

Coincidiendo con estos resultados, varios autores plantean la elevada resistencia de las cepas de *Ps. aeruginosa* frente a diferentes drogas.⁹⁻¹¹ En relación con las cepas de *Ps. aeruginosa* en correspondencia con los hallazgos aquí, diversos autores señalan que en general es muy baja la resistencia de esta especie de *Pseudomonas* frente a la gentamicina,^{12,13} por el contrario, otros concluyen que es muy elevada la resistencia de *Ps. aeruginosa* frente a esta droga.^{9,10}

Se ha planteado por diversos autores que la resistencia de este microorganismo a un gran número de agentes antimicrobianos, puede deberse al tratamiento impuesto sobre todo en pacientes críticos y en donde cepas sensibles se transforman en cepas resistentes, después de 2 semanas de tratamiento con algún antimicrobiano.¹⁰⁻¹²

La resistencia bacteriana a los antibióticos es uno de los serios problemas en la terapia de enfermedades y en la práctica epidemiológica.¹⁴⁻¹⁶ Ninguna droga antimicrobiana actúa sin el riesgo de desarrollo de mecanismos de resistencia.¹⁵ El elevado porcentaje de cepas resistentes se explica mediante el uso frecuente en este tipo de pacientes por su enfermedad de base.^{14,15}

El estudio de la resistencia a los antibióticos constituye una guía que permite establecer alguna relación en cuanto al origen de las cepas, en caso de un brote o epidemia causadas por este agente.¹³⁻¹⁵

Los fallos terapéuticos frente a *Ps. aeruginosa* indican la necesidad de establecer diferenciación entre la persistencia de cepas con el mismo patrón de resistencia o con un patrón diferente y la reinfección debido a una nueva cepa; porque diferentes cepas pueden desarrollar similares patrones de resistencia y aislamientos clínicos consecutivos de estas pueden exhibir diferentes patrones de susceptibilidad antimicrobiana.^{3,13-15}

Es necesario en el tratamiento de las infecciones por *Ps. aeruginosa*, utilizar fármacos de

forma combinada, pues pueden desarrollar resistencia cuando se usan de forma única. Deben emplearse penicilinas activas contra este microorganismo como: ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, combinadas con un aminoglucósido: gentamicina, tobramicina, amikacina. Otros medicamentos eficaces contra *Ps. aeruginosa* son: aztreonam, imipenem, quinolonas (ciprofloxacina) y cefalosporinas (ceftazidima y cefoperazona).^{2,5,16-19}

Acorde a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observa la factibilidad de la aplicación del método de difusión con discos de antimicrobianos con las 10 drogas empleadas. Teniendo en cuenta las ventajas del método, ya planteadas anteriormente, y el disponer de la cepa de referencia para el estudio, se recomienda la utilización de este.

Antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* strains taken from patients with cystic fibrosis

SUMMARY

Ninety strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from pediatric patients with cystic fibrosis and respiratory infections at "William Soler" pediatric hospital were studied in the period from February to August, 2001, as part of a joint research project of the two hospitals. In vitro susceptibility of these strains to 10 antimicrobials, that is, azlocycline, ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, gentamicin, tetracycline, ciprofloxacin, ofloxacin, chloramphenicol and trimethoprim/sulfamethoxazole was studied by Kirby-Bauer disk diffusion. The reference strain was ATCC 27853. The research work results showed that antimicrobial susceptibility values were within the allowable limits. Increased resistance to chloramphenicol (87.03%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (92.28%) as well as high sensitivity to azlocycline (85%), ceftazidime (87.09%), gentamicin (94.09%), ciprofloxacin (94.8%) and ofloxacin (92.5%) were observed.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria, antimicrobial drug resistance, pediatric patients, cystic fibrosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Nader OM. *Pseudomonas-Legionella*. En: Basualdo JA, Coto CE, Torres RA, eds. Microbiología Biomédica. Argentina:Atlante srl; 1996. p.309.
2. Martínez AM, Pérez JL, Pérez MF. *Pseudomonas*. En: Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL. Microbiología y Parasitología Médicas. T. I. Ciudad de La Habana:Editorial Ciencias Médicas; 2001. p.303-20.
3. Bingen E, Dernamer E, Picard B. Molecular epidemiological analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing failure

- of antibiotic therapy in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:423-37.
4. Koneman A, Dowell J, Sommers W. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en Diagnóstico Microbiológico. 3er ed.. Buenos Aires, Argentina:Editorial Médica Panamericana; 1996. p.566-8.
 5. Pérez MF, Rodríguez D, Zuazo JL. Marcadores epidemiológicos en el estudio de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de una unidad de cuidados intensivos pediátricos. *Rev Cubana Med Trop* 1991;43(2):132-5.
 6. Nilsson L. Frequencies of variants resistant to different aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1991;20:255-9.
 7. Pitt TL. Epidemiology of multiply resistant gram-negative bacteria in Hospital. *Med Microbiol Lett* 1996;5:284-91.
 8. Koláv M, Hájek V, Sázelová J. Resistance to antibiotics in gram-negative rods from clinical material of Hospital and Community origen. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* 1995;139:33-5.
 9. Hawkeg PM. Action against antibiotic resistance: no time to lose. *Lancet* 1998; 351:298-9.
 10. Hfiby N, Schifft P. Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Acta Paed Scan* 1982;301:1-132.
 11. Pier GB . *Pseudomonas aeruginosa*: A Key problem in cystic fibrosis. *ASM News* 1998;64(6):339-47.
 12. Stevamg S. Lung Infection with Alginate-producing Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1992;180(28):1-79.
 13. García AD, Ibarra A, Rodríguez FC, Casal M. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from patents with cystic fibrosis. *Rev Esp Quimioter* 2004;17(4):332-5.
 14. Mackenzie FM, Smith SV, Milne KE, Griffiths K, Legge J, Gould M. Antibigrams of resistant gram-negative bacteria from Scottish Cystic Fibrosis patients. *J Cystic Fibrosis* 2004;3(3):151-7.
 15. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2004;42(5):1915-22.
 16. Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blázquez H. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4226-33.
 17. Guzmán L. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. *Rev Chil Infect* 2004;21(2):117-24.
 18. Van Eldere J. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa*. Susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:347-52.
 19. Trucco O, Prado V, Durán C, Grupo Pronares. Red de vigilancia de resistencia antimicrobiana PRONARES. Informe Primer Semestre 2001. *Rev Chil Infect* 2002;19(S2):140-8.
- Recibido: 5 de octubre de 2005. Aprobado: 18 de julio de 2006.
 Dra. *Miriam Fina Pérez Monrás*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". AP 601, CP 11300, Ciudad de La Habana.
 Teléf.: 2020652. Fax: 2046051. Correo electrónico: miriamp@ipk.sld.cu