

Serotipificación y susceptibilidad antibacteriana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes quemados infectados

Aniel Moya¹, Denisse Berríos¹, Juan F. Almenares², Linda N. Ibáñez³, Johnatan Hernández¹, Lázaro Joó¹, Alexandro Rodríguez¹, Pavel Mustelier¹, Armando Cádiz¹, Sara C. Esnard¹

1. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba. amoya@finlay.edu.cu
2. Universidad de Oriente. Centro de Estudios de Biotecnología. Santiago de Cuba, Cuba.
3. Hospital Clínico Quirúrgico "Calixto García". Ciudad de La Habana. Cuba.

Se aislaron 11 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en 10 pacientes quemados que se encontraban hospitalizados y se les realizó tipificación serológica y antibiología para determinar los serotipos más frecuentes en este tipo de pacientes. Los serotipos de mayor frecuencia de aislamiento fueron el O4 y el O5. Observamos una marcada resistencia frente a los antibióticos: carbenicilina (81,8%) y la azlocilina (72,7%).

Palabras claves: *Pseudomonas aeruginosa*, tipificación serológica, antibióticos, antibiograma

Introducción

Las quemaduras son lesiones hísticas de variable extensión y profundidad, que representan un sitio susceptible de colonización oportunista por microorganismos (M.O) de origen exógeno y endógeno (1,2,3). La destrucción de la piel, permite la invasión bacteriana y constituye un medio de cultivo ideal para estos M.O. Con independencia de la etiología, evolución, manejo terapéutico y respuesta individual de cada organismo; la sepsis en sus distintas manifestaciones forma parte del cuadro fisiopatológico del gran quemado y constituye una de las complicaciones más graves que se puede presentar en este tipo de paciente (4).

De los numerosos M.O que pueden infectar la lesión por quemadura, los más frecuentes son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*, *Streptococcus* y *Serratia*; los cuales junto a otros M.O grampositivos, hongos y virus constituyen el ecoauma de las unidades de quemados (5). *Pseudomonas aeruginosa* (6,7) puede habitar el suelo donde convive con hongos, productores de moléculas con efecto bacteriostático, por lo que ha desarrollado numerosos mecanismos de resistencia intrínseca frente a algunos tipos de antibacterianos, como los β -lactámicos, ampliamente utilizados para el tratamiento de las infecciones en pacientes quemados. Algunas cepas mucoides producen un exopolisacárido denominado alginato, capaz de fijar este M.O. al tejido mediante la formación de una fina capa compacta de mucus que aísla a la bacteria del ambiente y la protege de la acción de los antibióticos (8).

Este trabajo es el resultado de un estudio realizado, con el objetivo de conocer la presencia de los serotipos circulantes de *Pseudomonas aeruginosa*, en la Unidad de Quemados del Hospital Clínico Quirúrgico "Calixto García", Cuba; donde se aplicaron marcadores microbiológicos de serotipificación y antibiología para la clasificación de cepas aisladas en pacientes quemados infectados durante los tres meses que duró dicho estudio.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas: Las cepas fueron aisladas de pacientes hospitalizados en la Unidad de Quemados del Hospital General Docente Clínico Quirúrgico "Calixto García", Cuba, en el período comprendido entre el 1ro de diciembre de 1999 y el 1ro de febrero del 2000.

Los pacientes fueron clasificados como graves, muy graves, críticos y críticos extremos según la clasificación cubana de pronóstico de vida (9).

Aislamiento bacteriano: Para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó urocultivo, hemocultivo, cultivo de punta de catéter y cultivo de las lesiones a 10 pacientes hospitalizados en el período analizado. Estas muestras se tomaron cada tres días, según lo establecido por el servicio médico de la sala. Las cepas fueron aisladas e identificadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital, se trasladaron en cuñas de Agar Hierro de Kligler (BIOCEN) al Laboratorio de Microbiología del Área de Investigaciones del Instituto Finlay, donde se les realizó un pase a tubos con 5 mL de Caldo Nutriente (OXOID) y se incubaron 18 h a 37 °C, con agitación constante, en una incubadora modelo IF-3B.

Tabla 1. Datos de los pacientes quemados hospitalizados e infectados por *P. aeruginosa*. Hospital Clínico Quirúrgico "Calixto García".

Paciente	Edad	Sexo	Indice de Gravedad	% de Quemaduras			Pronóstico
				DAB	H	total	
1	67	M	14	26	1	27	Muy Grave
2	47	F	30	20	10	30	Crítico
3	24	F	13.7	7.5	10	17.5	Muy Grave
4	30	F	59.5	21	49	70	Crítico Extremo
5	39	M	14	26	1	27	Muy Grave
6	21	M	19.5	33.5	3	36.5	Crítico
7	17	F	19	10	9	19	Muy Grave
8	34	F	43	79	6	86	Crítico Extremo
9	31	M	13	20	6	26	Muy Grave
10	40	F	11	19.5	1.5	21	Muy Grave

DAB: Dérmicas AB. H: Hipodérmicas.

Posteriormente, el cultivo obtenido a partir del crecimiento en caldo, se sembró a placas de Agar Nutriente (OXOID), con el objetivo de corroborar la pureza del aislamiento bacteriano. A continuación, se tomaron colonias aisladas, se sembraron en medio de conservación Skim milk-Glicerol y se mantuvo a -70°C , hasta completar la investigación.

Suspensiones celulares: Se realizó siembra por agotamiento en placas con Agar Nutriente (OXOID) y se incubó por 24 h a 37°C . De este cultivo se tomó una colonia y se sembró en una cuña de Agar Nutriente (OXOID) incubándose con iguales condiciones. El crecimiento bacteriano se resuspendió en solución salina al 0,85% y se empleó de 1-3 mL según el crecimiento de la cepa.

Serotipificación: Se realizó según el método de aglutinación en placa descrito por Pitt y Erdman (10)

empleando un set de antisueros somáticos producidos en el Centro de Estudios de Biotecnología de la Universidad de Oriente, Cuba; que reconoce a los 17 tipos somáticos individuales establecidos en el Sistema Internacional de Tipificación Antigénica (SITA) para este microorganismo (11).

Antibiograma: Se realizó por el método de difusión en agar de Bauer-Kirby siguiendo las recomendaciones del Comité Nacional de Control de Normas para Laboratorio Clínico (12). Las cepas controles utilizadas fueron: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25923 .

Los discos de antibacterianos empleados (Tabla 2.) los suministró la Empresa de Productos Biológicos (EPB) "Carlos J. Finlay":

Tabla 2 Criterios de interpretación basados en el método de Bauer-Kirby para los discos de antibióticos empleados en la determinación de la sensibilidad bacteriana *in vitro* y suministrados por la EPB "Carlos J. Finlay".

Antimicrobiano	Contenido del Disco	Diámetro (mm) de la zona de inhibición		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Ceftriaxona	30 μg	≤ 13	14-20	≥ 21
Ceftazidima	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima	30 μg	≤ 14	15-22	≥ 23
Azlocilina	75 μg	≤ 17	-	≥ 18
Carbenicilina	100 μg	≤ 17	18-22	≥ 18
Ciprofloxacina	5 μg	≤ 15	16-20	≥ 21
Gentamicina	10 UI	≤ 12	13-14	≥ 15

Resultados y Discusión

De los 10 pacientes: 6 fueron diagnosticados como muy graves, 2 se encontraban en estado crítico y 2 en estado crítico extremo, predominando en ellos las lesiones de tipo dérmicas AB (DAB) e hipodérmicas (H).

Fueron aisladas de los pacientes e identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* 11 cepas, las cuales en algunos casos se encontraban acompañadas de otros gérmenes como *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, entre otros. Los aislamientos se realizaron entre los 3 y 5 días posteriores al ingreso de los pacientes.

De las 11 cepas, 10 se aislaron en el sitio de la lesión excepto una, obtenida de un hemocultivo, mientras que el resto de las muestras resultaron negativas.

El momento del aislamiento de este M.O. nos permite afirmar que la infección fue adquirida en el hospital, ya que la colonización de la herida por quemaduras en los hospitales ocurre generalmente entre 2 y 25 días posteriores al ingreso (13).

Cuando se produce la lesión por quemaduras la población microbiana se esparce y en su mayoría sobrevive a las quemaduras (14); inmediatamente después del daño, la población microbiana predominante es grampositiva, por lo general es eliminada por la terapia contra ellas. En los días siguientes los M.O. gramnegativos colonizan la escara convirtiéndose en predominantes después de transcurrida la primera semana de la lesión (5).

Tabla 3. Tipificación serológica de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes quemados hospitalizados en el Hosp. Calixto García. Dic.1999 – Feb.2000

Cepas	Serotipos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .																
	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉	O ₁₀	O ₁₁	O ₁₂	O ₁₃	O ₁₄	O ₁₅	O ₁₆	O ₁₇
Q1				x		xx											
Q2													xx				
Q3						xx											
Q4													xx				
Q5				xx													
Q6				xx													
Q7				x													
Q8						xx											
A1	xx																
A2					xx												
A4					xx												

Leyenda:

- x Reconocimiento débil
- xx Reconocimiento fuerte

La Tabla 3 muestra los serotipos de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas durante esta investigación. Los resultados obtenidos por la tipificación serológica permitieron demostrar cinco tipos somáticos individuales en las cepas estudiadas, resultando los serotipos O4 y O5 los más frecuentes; otros como el O6, O1 y O13 se detectaron pero en menor cuantía.

Este resultado es interesante a pesar del discreto número de aislamientos, pues los serotipos que se

reportan en nuestro país como más frecuentes son el O11 y el O6; sin embargo el serotipo O11 no se detectó en nuestro trabajo, posiblemente debido al efecto inhibitorio de los títulos de IgG anti serotipo O11 de *P. aeruginosa* encontrado por otros autores en individuos sanos (15).

El estado de sepsis generalizada en estos pacientes fue un aspecto importante que limitó el estudio de nuevos aislamientos y de los existentes. La severidad de las lesiones y el shock fisiopatológico propio del trauma,

en la mayoría de los casos ocasionó la muerte de los pacientes y no permitió estudiar la infección desde sus inicios hasta su desaparición.

Autores como Pitt y Edman (9), hablan a favor de la localización de tipos somáticos individuales, de acuerdo con el país en que se realice la investigación y la procedencia de los aislamientos. Sería provechoso en estudios posteriores incrementar el universo de cepas provenientes de heridas por quemadura en varias Unidades de Quemados y durante un período más amplio para la toma de las muestras.

Los resultados obtenidos respecto a la susceptibilidad frente a los agentes antimicrobianos investigados, corroboraron una vez más la condición de multirresistencia que usualmente exhibe este microorganismo (Tabla 4). De las 11 cepas, 4 fueron resistentes a la ceftriaxona, lo cual correspondió con un 36,3% de las cepas evaluadas, 1 a la ceftazidima (9,1%), 1 a la ciprofloxacina (9,1), 8 a la azlocilina (72,7), 4 a la cefotaxima (36,3), 9 a la carbenicilina (81,8) y 7 a la gentamicina (63,6). En cuanto a las

cepas, las que mayor resistencia mostraron a los 7 antibacterianos probados fueron, O5 que fue resistente a 6; O6 y O13 que fueron resistentes a 5, a diferencia de O1 que fue susceptible a todos los antibacterianos investigados. Los mayores porcentajes de resistencia se detectaron con: azlocilina, carbenicilina y gentamicina, mientras que frente a la ciprofloxacina y la ceftazidima el 90% de las cepas resultaron sensibles.

Cuando relacionamos los serotipos de cada cepa con los patrones de resistencia se observó que las cepas O6 resultaron resistentes a 4 antibacterianos, coincidiendo este hecho también con la ceftriaxona, azlocilina, carbenicilina y gentamicina; resultando sensibles a la ciprofloxacina y ceftazidima. Las cepas O13 solo coincidieron en la susceptibilidad a la ceftazidima y en la resistencia a azlocilina y carbenicilina. Los resultados de las cepas O4 coincidieron en todos los patrones excepto en la respuesta a la cefotaxima mientras que las cepas O5 coincidieron solo en la susceptibilidad a la ciprofloxacina.

Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes quemados infectados. Hosp. Calixto García. Dic/1999 – Feb/2000.

Cepas	Serotipo	Antibacterianos						
		1	2	3	4	5	6	7
Q1	O6	R	S	S	R	R	R	R
Q2	O13	R	R	S	R	I	R	R
Q3	O6	R	S	S	R	I	R	R
Q4	O13	I	S	S	R	I	R	S
Q5	O4	I	S	S	R	I	R	R
Q6	O4	I	S	S	R	I	R	R
Q7	O4	I	S	S	R	R	R	R
Q8	O5	R	S	R	R	R	R	R
A1	O1	S	S	S	S	S	S	S
A2	O5	S	S	S	S	I	S	S
A4	O5	I	S	S	S	R	R	S

Leyenda:

(1). Ceftriaxona, (2). Ciprofloxacina, (3). Ceftazidima, (4). Azlocilina, (5). Cefotaxima, (6). Carbenicilina, (7). Gentamicina. (R) – Resistente, (S) – Sensible, (I) – Intermedio.

Analizando nuestros resultados, de acuerdo con las familias o grupos de antimicrobianos investigados (Tabla 4), se detectó que frente a las cefalosporinas, *Pseudomonas aeruginosa* fue resistente a la ceftriaxona y a la cefotaxima (36,3%) y sensible a la ceftazidima en un 9,1%. Fue sensible a la ciprofloxacina que pertenece a las quinolonas, mientras que los porcentajes más elevados (>50%) a los

antimicrobianos investigados se constató frente a las penicilinas y el aminoglucósido.

La gentamicina se reporta como uno de los más efectivos contra esta bacteria (16), sin embargo en nuestro trabajo obtuvimos un alto porcentaje de resistencia, similares resultados lo obtienen Holder y col (17).

En 1999 se realizó un estudio de la susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a un nuevo antibacteriano, el livofloxacin y se reportó resistencia de este M.O. a la gentamicina y a la ceftazidima, además detectaron que las cepas con menores porcentajes de susceptibilidad fueron aquellas aisladas de las heridas y la sangre (18). También se ha encontrado el 13,4% de resistencia para la ceftazidima así como el 27,3% y 31,9% para la carbenicilina y ciprofloxacina respectivamente. Además se reporta para *Pseudomonas aeruginosa* resistencia frente a meropenem (9,1%), imipenem (19,2%), piperacilin (12%) y para la amikacina (10,6%) (19).

En este estudio, para la ceftazidima se obtuvo un porcentaje de resistencia más bajo (9,1%), mientras que para la carbenicilina fue superior (81,82 %) y para la ciprofloxacina resultó mucho menor (9,1%).

Se conoce que *Pseudomonas aeruginosa* posee múltiples mecanismos de resistencia intrínseca, que justifican los patrones de resistencia en los aislamientos clínicos. En los últimos años se describen nuevos mecanismos que involucran cambios mutacionales en el cromosoma de la clase C de la β -lactamasa, adquisición de plásmidos o transposones relacionados con la misma y pérdida de la porina D-2, lo que resulta en una elevada resistencia al imipenem y a la mayoría de los β -lactámicos que se producen actualmente (19). También se describen tres sistemas de eflujo de familias de antibióticos, relacionados con proteínas de la membrana externa involucrados en la resistencia a β -lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina, dentro de los que se destaca el Mex-OprM. Resultados similares en cuanto a la existencia de estos mecanismos se reportan también en *E. coli* y otros microorganismos gramnegativos (20). Más recientemente se señala un nuevo mecanismo de resistencia basado en la secreción de β -lactamasa en el interior de vesículas donde la bicapa lipídica de la membrana es libremente permeable a los antimicrobianos, esta enzima los inactiva una vez que penetra en el interior de la misma; lo que debe disminuir la concentración del antibacteriano en ese ambiente (21).

En *Pseudomonas aeruginosa* la resistencia a los antibióticos β -lactámicos se debe principalmente a una hiperproducción de β -lactamasa, liberada por esta bacteria mediante la exportación de vesículas que contienen, además, componentes periplasmáticos como: proteasas, proelastasa, peptidoglicano, hidrolasas, fosforilasa C y fosfatasa alcalina (22), mecanismo empleado en la invasión tisular.

La estrategia más efectiva contra la resistencia microbiana es aplicar el tratamiento correcto desde el comienzo de la infección, para destruir los microorganismos inequívocamente. La resistencia antimicrobiana es el punto crítico del tratamiento de las enfermedades infecciosas en todo el mundo, pues entre las consecuencias que se derivan a un mal tratamiento está la disminución de nuevas opciones de tratamiento, la aparición de bacterias resistentes a varios grupos de antibacterianos, empeoramiento del curso clínico de la enfermedad, aumento de los días de hospitalización, y en general constituye un problema de salud pública que afecta al individuo, la sociedad y al ambiente.

La serotipificación es un método simple para diferenciar cepas. Esta técnica combinada con los ensayos de susceptibilidad posee gran importancia en la vigilancia epidemiológica de las unidades asistenciales (17). Aunque nuestro trabajo investigó un número pequeño de cepas, evaluamos de muy satisfactoria la inclusión de estos marcadores microbiológicos y epidemiológicos para la caracterización de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. El trabajo permitió conocer la presencia de los serotipos circulantes en nuestra área de estudio, y nos indicó la necesidad de un análisis de un mayor número de aislamientos en este tipo de Sala, lo que permitirá conocer resultados muy importantes en cuanto a los serotipos predominantes y los patrones de resistencia, permitiendo aplicar una terapia antibacteriana más efectiva.

Referencias

1. Del Sol A. Las quemaduras y sus diferentes aspectos. C. De La Habana: Ed. Científico Técnica. 1990, 18:31- 46.
2. Song W, Lee KM, Kang HJ, Shin DH, Kim DK.; Microbiologic aspects of predominant bacteria isolated from the burn patients in Korea. *Burns*; 2001; 27(2):136-139
3. Sanyal SC, Mokaddas EM, Gang RK y Bang RL. Microbiology of septicemia in Burn Patients. *Annual Burns & Fire Disease*. 1998; 11(1):19-22.
4. Tang H, Zhaofan X, Liu S, Chen Y, Ge S.; The experience in the treatment of patients with extensive full-thickness burns. *Burns*; 1999; 25(8):757-9.
5. Pruitt BA Jr, McManus AT, Kim SH, Goodwin CW. Burn wound infections: current status. *World Journal of Surgery*; 1998 Feb;22(2):135-45
6. Bernard D Davis, Renato Dulbecco, Hernán N. Eisen, Herobe S. Ginsberg. *Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos no fermentadores. *Microbiología*. Ed. by Lippincott Company. 1994; Cap.29: 595-600.

7. Esnard SC. *Pseudomonas aeruginosa*: I - Biología. *Vaccimonitor*. 1997; 6(9):2-9.
8. Coquet L, Jouenne JT. Resistance of artificial biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* to Imipenem and Tobramycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998; 42:755-760.
9. Borges MH. Atención al paciente quemado en unidades especializadas. Clasificación Cubana de pronóstico de vida. Manual de Procedimiento de diagnóstico y tratamientos en traumatología y cirugía plástica. C. de La Habana: Ed. Pueblo y Educación; 1984:33.
10. Pitt TL, Erdman YJ. The specificity of agglutination reactions of *Pseudomonas aeruginosa* with O antisera. *Journal of Medical Microbiology*; 1978; 11:15-23.
11. Pinghui V.L, Wang S. Three new somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 5: 922-925.
12. NCCLS. Performance standards for Anti-microbial disc susceptibility test. 6th Edition. Approved standards. 1997; Jan M-2-A-6(17); No 1.
13. Kovacks K, Paterson D.L, Yu V,L. Antimicrobial Therapy for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Med*. 1998; 15(7): 464-478.
14. Yang HM, Guo ZR, Sheno ZY. Delayed fluid resuscitation induced bacterial translocation after lethal thermal injury: role of oxygen free radical injury of intestinal mucosa; *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1994; 74(9):552-5, 583-584.
15. Moya A., Joó L., Rodríguez A., Hernández J, Almenares JF, Berrios D., Rodríguez Z, Cádiz A., Esnard SC. Preparado de inmunoglobulina contra LPS de *Pseudomonas aeruginosa* serotipo O11. *Vaccimonitor* 2002; 11(1):11-17.
16. Shand GH. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane proteins and iron regulation membrane proteins at different stages of chronic cystic fibrosis lung infection. *Journal of Medical Microbiology*; 1991;34(4):203-212.
17. Holder I.A., Volpel K., Ronald G., Paranchych W. Studies on multiple *Pseudomonas aeruginosa* isolates from individual burn patients by RFLP, O antigen serotyping and antibiogram analysis. *Burns*. 1995; 21(6):441-444.
18. Segatore B, Setacci D, Perilli M, Franceschini N, De Santis A, Marchetti F, Amicosante G. Italian survey on comparative levofloxacin susceptibility in 334 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobials Agents Chemotherapy*; 1999;43(2):428-31.
19. Bonfiglio G, Laksai Y, Franchino L, Amicosante G, Nicolette G. Mechanism of β -lactam resistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a italian survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 1998; 42:697-702.
20. Mine T., Morita Y., Kataoka A., Mizushima T., Tsuchina T. Expression in E-coli of a new multidrug efflux, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobials Agents Chemotherapy*. 1999; 2:415-417.
21. Ciofu O, Beveridge T.J, Kadurugamuwa J, Rasmussen J.W y Hoiby N. Chromosomal β -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 2000; 45:9-13.
22. Beveridge T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *The Journal of Bacteriology*. 1999; 8(181):4725- 4733.

Serotyping and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from infected burnt patients

Abstract

Eleven strains of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from lesions in 10 burnt in patients. Serotyping and antibiogram analysis were done to determine the most frequent serotypes in these patients. The most frequently isolated were serotypes O4 and O5. We found marked resistance to the antibiotics carbenicillin (81.8%) and azlocillin (72.7%).

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antigen serotyping, antibiotics, antibiogram analysis.