

PIOCINOTIPIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

ESTUDIO EN UN UNIVERSO HOSPITALARIO

M. A. GUZMAN, P. DE FORERO

En el presente trabajo se estudiaron 108 cepas de *Pseudomonas* aisladas de un universo hospitalario único. Se encontró que 105 pudieron identificarse como *P. aeruginosa*, 2 como *P. pseudomallei* y 1 como *P. alcaligenes*. Las 105 cepas de *P. aeruginosa* fueron piocinotipificadas, encontrándose que 70,5% del total pertenecían al piocinotipo 1 y dentro de éste, 60,8% correspondían al subpiocinotipo H. Igualmente se presenta una discusión sobre el interés de este tipo de estudios.

INTRODUCCION

La infección hospitalaria constituye uno de los graves problemas en la atención médica (1, 2). La posibilidad de establecer un control adecuado tiene como uno de los puntos de partida el conocimiento tan com-

pleto como sea posible de las poblaciones bacterianas del ambiente hospitalario y la posibilidad de poder rastrear la fuente de origen en un momento determinado (3).

La *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo que plantea serios problemas en los ambientes hospitalarios y que, por lo tanto, justifica medidas de vigilancia y control muy severos (4-9). El conocimiento de su comportamiento bacteriológico es de la mayor trascendencia para cada uno de estos ambientes.

El presente trabajo se realizó con el propósito de estudiar sobre un universo restringido la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* como agente de infección intrahospitalaria, y si el microorganismo aislado correspondía a un tipo constante o si existía una variación de tipos.

MATERIAL Y METODOS

Universo restringido. El universo seleccionado para el estudio fue el Hospital Militar Central de la ciudad de Bogotá.

Cepas para estudio. Las cepas para estudio fueron las aisladas de casos clínicos

Dr. Miguel A. Guzmán: Jefe del Grupo de Microbiología e Inmunología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D. E.; Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Piedad de Forero: Bacterióloga, Unidad de Bacteriología General, Grupo de Microbiología e Inmunología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.E.

Solicitud de separatas al Dr. Guzmán.

con un cuadro definido en pacientes hospitalizados en quienes la presencia de *P. aeruginosa* complicó una situación preexistente.

Otras cepas. Igualmente se consideraron en estudio cepas aisladas de implementos de uso hospitalario.

Medios de cultivo. Todos los medios de cultivo usados fueron comercialmente obtenidos y fueron los usualmente recomendados para obtener una identificación bioquímica completa de *P. aeruginosa* (10).

Cepas indicadoras. Las cepas indicadoras para la piocinotipificación fueron gentilmente facilitadas por los doctores Alfredo Villalobos y Auramarina de Roldán de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

El conjunto de cepas tipificadoras estuvo constituido por ocho, numeradas de 1

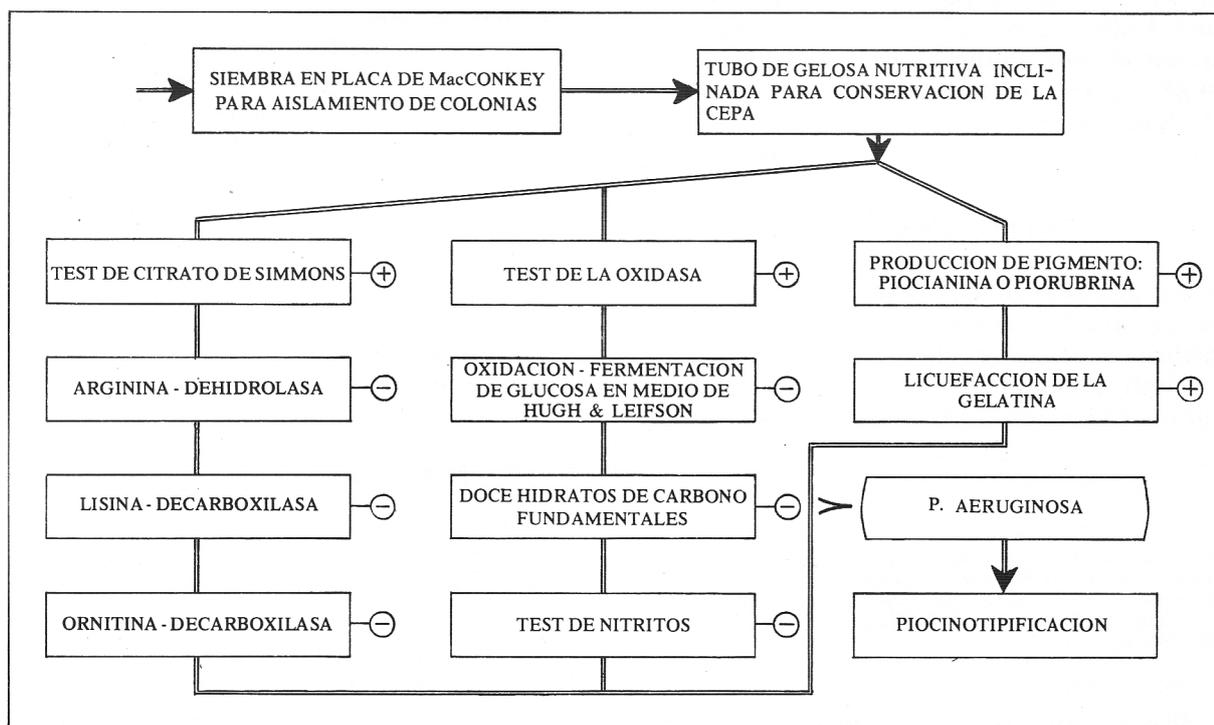
a 8. El conjunto de cepas subtipificadoras estuvo constituido por cinco cepas identificadas con las letras A, B, C, D y E (11).

Se fijó como tiempo del estudio una vigilancia horizontal durante un período de un año.

Las cepas fueron aisladas en el laboratorio de bacteriología del Hospital Militar de muestras obtenidas de pacientes hospitalizados con infección definida desarrollada dentro del ambiente hospitalario. Cuando el aislamiento primario sobre agar-sangre mostró un crecimiento bacteriano presuntivo de *P. aeruginosa*, la cepa se remitió al Instituto Nacional de Salud con los datos pertinentes.

Toda cepa sospechosa de ser *P. aeruginosa*, fue sembrada sobre medio de MacConkey y después de una incubación de 18 horas, se estudió su crecimiento, as-

Tabla 1. Esquema de las diferentes pruebas en el estudio bioquímico de *P. aeruginosa*.



pecto de la colonia y olor, para determinar presencia de *Pseudomonas*.

Del cultivo anterior se seleccionó una colonia, la cual se resembró sobre agar nutritivo en tubo inclinado y se incubó a 37°C. por 18 horas, tiempo después del cual, comprobado un crecimiento adecuado, se procedió a realizar siembras sobre medios especiales para estudiar el comportamiento bioquímico del microorganismo, permitiendo hacer, sin duda, su identificación final como *P. aeruginosa*. En la Tabla 1 se señalan las pruebas practicadas a cada una de las cepas.

Las cepas que por las pruebas bioquímicas se identificaron como *P. aeruginosa* fueron sometidas a piocinotipificación para determinar la distribución de tipos dentro de la población en estudio. Para ello se siguió la técnica de Gillies y Govan (12), modificándola en el sentido de hacer una suspensión inicial de la cepa en 5 ml. de caldo estéril de cerebro-corazón, dándole una turbidez aproximada de 2 en la escala de McFarland (13).

Esta suspensión se incubó por 5 horas a 37°C., al término de las cuales se sembró con escobillón sobre agar-sangre humana al 6% en caja de Petri, siguiendo el diámetro de ésta; el ancho de la siembra fue aproximadamente de 1 cm., tal como puede verse en la Figura 1.

Una vez sembrada la suspensión, se incubó a 37°C. por 18 horas, al término de las cuales, comprobado un buen crecimiento, se removió éste cuidadosamente con un portaobjeto, como lo muestra la Figura 2. Posteriormente, para eliminar los microorganismos que quedaban de la maniobra anterior, se vertieron 10 ml. de cloroformo en la tapa de la caja de Petri y sobre ésta se colocó invertida la placa con la siembra (Figura 3). Después de dejar en reposo por 10 a 15 minutos, se decantó el cloroformo y para eliminar los últimos vapores, se dejó abierta la placa por unos 5 minutos. En esta forma quedó lista la superficie del medio para tipificación (Figura 4).

Las 8 cepas tipificadoras se sembraron en caldo de cerebro-corazón y se incu-

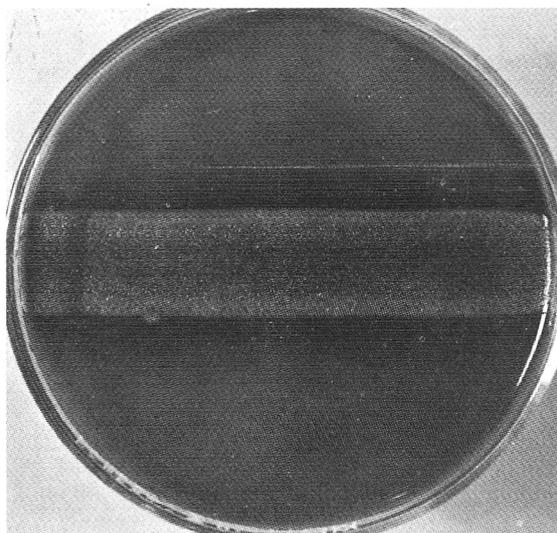


Figura 1. La fotografía muestra una de las cepas del estudio cultivada sobre agar-sangre.

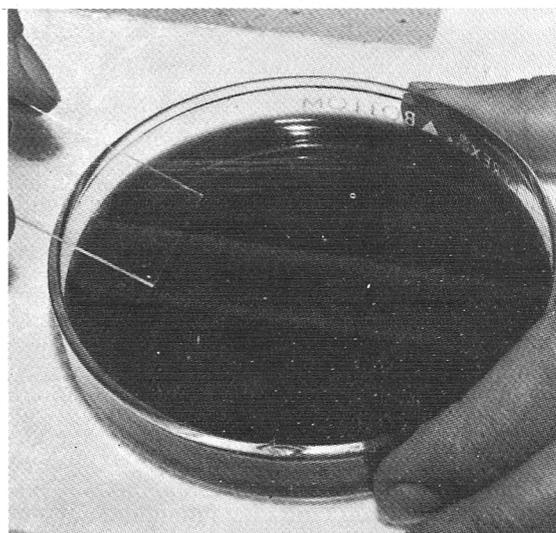


Figura 2. Manera de remover el cultivo de la cepa en estudio mediante un portaobjeto.

barón por 5 horas a 37°C. Cada una de éstas se resembró en las placas tratadas con los vapores de cloroformo, en sentido perpendicular al de la siembra inicial, tal como se muestra en la Figura 5. Estos cultivos se incubaron a 35°C. por 18 horas. Transcurrido este tiempo se estudió su crecimiento o inhibición y se anotaron cuidadosamente los resultados, para compararlos

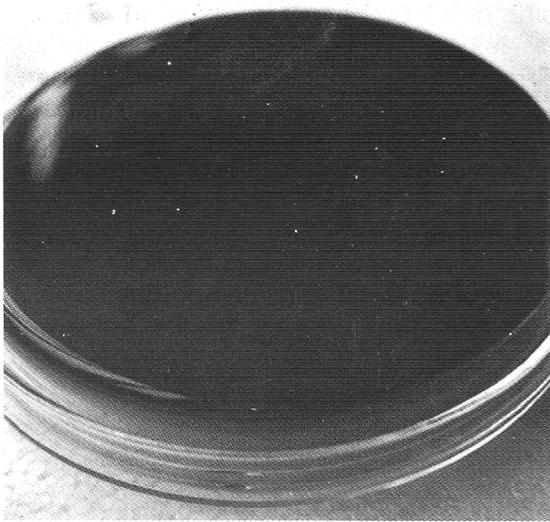


Figura 3. Manera de eliminar los restos del cultivo de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en estudio, mediante vapores de cloroformo.

luego con la tabla patrón (Tabla 2) y así determinar el tipo.

Las cepas que en el estudio anterior fueron clasificadas como piocinotipo 1 se subtipificaron siguiendo una técnica igual a la anteriormente descrita, frente a las cepas subtipificadoras A, B, C, DyE(Figura6).

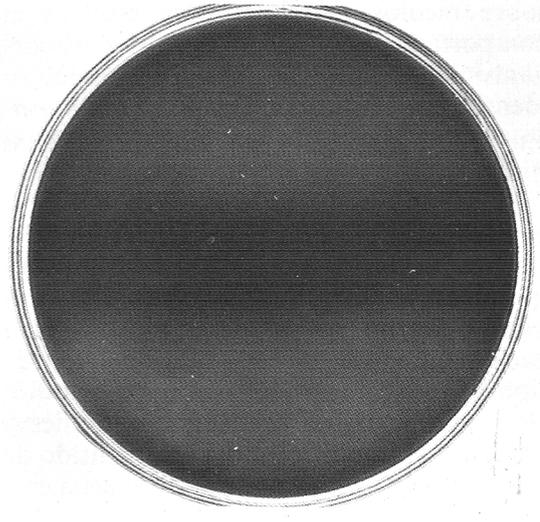


Figura 4. Superficie del medio listo para sembrar las cepas tipificadoras. Nótese la piocina producida por la cepa en estudio, *dijundida* en el medio.

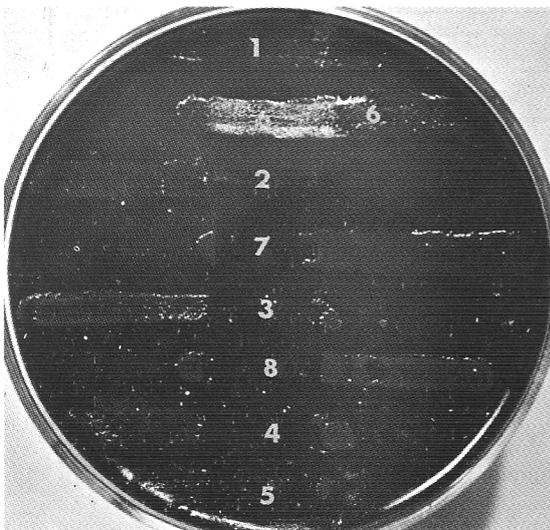


Figura 5. En la gráfica puede observarse el patrón de crecimiento e inhibición de las 8 cepas tipificadoras, por la piocina producida por la cepa en estudio. Nótese la siembra alterna de las cepas tipificadoras.

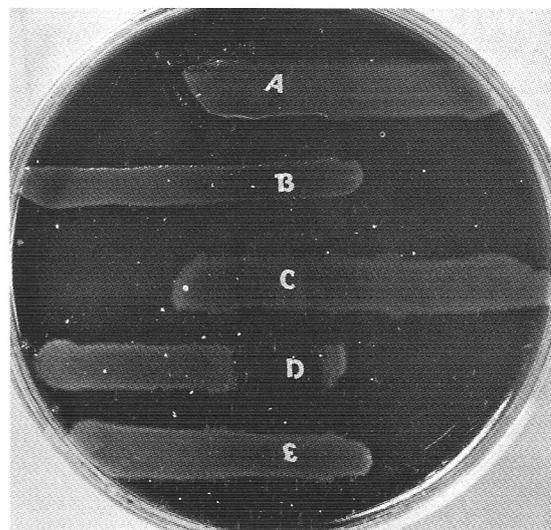


Figura 6. Patrón de inhibición y crecimiento de las cepas subtipificadoras del tipo 1. El patrón de la fotografía corresponde al subpiocinotipo G.

CEPAS PATRON PARA INHIBICION	PIOCINOTIPOS																																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
1	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
4	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
5	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
8	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CEPAS PATRON PARA INHIBICION	SUBPIOCINOTIPOS							
	A	B	C	D	E	F	G	H
A	+	-	-	+	-	-	-	-
B	+	+	-	-	+	-	-	+
C	+	+	+	+	+	-	+	-
D	+	+	+	+	-	-	-	+
E	+	+	+	+	+	-	+	+

+ = INHIBICION (NO CRECIMIENTO)
- = NO INHIBICION (CRECIMIENTO)

Tabla 2. Mosaico de inhibición para los 37 piocinotipos de *Pseudomonas aeruginosa* y para los 8 subpiocinotipos posibles en aquellos, según patrones de inhibición.

Tabla 3. Distribución de las cepas de *Pseudomonas* aisladas, según el origen de la muestra.

ORIGEN DE LA MUESTRA	NUMERO DE CEPAS	
	<i>P. aeruginosa</i>	Otras <i>Pseudomonas</i>
Heridas	25	
Secreciones internas (drenaje)	17	
Quemaduras	15	1*
Orinas	10	1**
Hemocultivos	7	
Secreción ótica	7	
Líquido cefalorraquídeo	6	
Secreciones rinofaríngeas	6	
Lesiones de piel	4	
Secreción ocular	2	
Espuito	1	1**
Absceso cerebral	1	
Totales	105	3

* *P. pseudomallei*
** *P. alcaligenes*

RESULTADOS

El número promedio de cepas aisladas por mes fue de 8 a 10, sin encontrarse relación alguna en la frecuencia periódica durante el tiempo total del estudio. Se recibieron un total de 108 cepas cuya distribución según el origen de la muestra se detalla en la Tabla 3. De ellas, 105 se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa* o sea el 97,22%; 2 fueron identificadas como *Pseudomonas pseudomallei* para un 1,85% y una fue identificada como *Pseudomonas alcaligenes* o sea el 0,92%.

Se encontró que las 105 cepas de *P. aeruginosa* fueron tipificables, o sea el 100%. La distribución de piocinotipos mostró que el piocinotipo 1 tiene la más alta frecuencia encontrándose 74 cepas, (70,5%), seguido por el tipo 10 con 14 cepas (13,3%) y en tercer lugar el tipo 3 con

5 cepas (4,8%). Otros tipos presentaron una frecuencia muy baja, que los hace exóticos dentro del universo estudiado, como puede analizarse en la Tabla 4. La distribución de piocinotipo en relación al origen de la cepa guarda la misma distribución para los tres tipos más frecuentes, tal como puede verse en la Tabla 5.

La subpiocinotipificación de las cepas pertenecientes al piocinotipo 1 con las 5 cepas subtipificadoras, dio la distribución

Tabla 4. Distribución de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas, según piocinotipo. Valores absolutos y porcentuales.

PIOCINOTIPO	NUMERO DE CEPAS	%
1	74	70,5
10	14	13,3
3	5	4,8
6	4	3,8
5	3	2,9
3,3	1	1,0
3,2	1	1,0
3,1	1	1,0
9	1	1,0
2	1	1,0
TOTAL	105	

Tabla 5. Distribución de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas, por piocinotipo y según origen de la muestra.

ORIGEN DE LA MUESTRA	PIOCINOTIPO										Total de cepas
	1	10	3	6	5	33	32	31	9	2	
Heridas	20	4	3	1	1						29
Secreciones internas (drenaje)	10	6				1					17
Quemaduras	12	2		1							15
Orinas	9		1								10
Hemocultivos	7										7
Secreción ótica	4		1	1				1			7
Líquido cefalorraquídeo	4	1			1						6
Secreciones rinofaríngeas	2	1	1	1					1		6
Lesiones de piel	3							1			4
Secreción ocular	1				1						2
Espujo	1										1
Absceso cerebral	1										1
TOTALES	74	14	5	4	3	1	1	1	1	1	105

que se muestra en la Tabla 6. Como se observa, 45 cepas (60,8%) pertenecen al subtipo H, seguido de 10 cepas (13,5%) del subtipo A y luego el subtipo D con 8 cepas (10,8%). Otros subtipos muestran una frecuencia muy baja. El subtipo G tiene la frecuencia más baja con el 2,7%. La distribución de estos subtipos en relación con el origen de la cepa puede detallarse en la Tabla 7. Puede observarse que las cepas aisladas de quemaduras muestran una variedad de subtipos en contraste con las cepas de otro origen.

Tabla 6. Distribución de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas y pertenecientes al piocinotipo 1, según el subpiocinotipo.

SUBPIOCINOTIPO	NUMERO DE CEPAS	%
H	45	60,8
A	10	13,5
D	8	10,8
C	6	8,1
B	3	4,0
G	2	2,7
TOTAL	74	

Tabla 7. Distribución de las cepas de *P. aeruginosa* piocinotipo 1 aisladas, por subpiocinotipo y según origen de la muestra.

ORIGEN DE LA MUESTRA	SUBPIOCINOTIPO						TOTAL DE CEPAS
	H	A	D	C	B	G	
Heridas	13	2	3	1	1		20
Secreciones internas (drenaje)	6	2	1	1			10
Quemaduras	5	1	1	2	1	2	12
Orinas	5	2	1		1		9
Hemocultivos	5		1	1			7
Secreción ótica	2	1		1			4
Líquido cefalorraquídeo	3	1					4
Secreciones rinofaríngeas	2						2
Lesiones de piel	2		1				3
Secreción ocular		1					1
Espujo	1						1
Absceso cerebral	1						1
TOTALES	45	10	8	6	3	2	74

DISCUSION

La *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo distribuido ampliamente en la naturaleza, encontrándose inclusive en flora intestinal normal en un cierto porcentaje de huéspedes normales (10). Este microorganismo tiene una patogenicidad muy baja pero la capacidad de adquirir resistencia a los antibióticos lo hace patógeno oportunista de extrema peligrosidad, particularmente en el ambiente hospitalario (14), en donde circula para encontrar terrenos excepcionalmente propicios en pacientes debilitados, postquirúrgicos, diabéticos, desnutridos, afectados de entidades caquetizantes, inmunodeprimidos, prematuros (15-17) en quienes complica las situaciones preexistentes terminando en múltiples ocasiones en septicemias fatales (18). El conocimiento profundo de su microbiología y de su circulación dentro de los ambientes hospitalarios es de gran importancia para determinar conductas y medidas de control. Muchos sistemas han sido estandarizados para tipificar este microorganismo; se ha utilizado la tipificación con fagos, con sueros, y la piocinotipificación. Este último procedimiento, estandarizado por Gillis y Govan (12), se basa en el hecho de que *P. aeruginosa* produce un metabolito, la piocina, que al difundirse en el medio puede inhibir el crecimiento de cepas de *P. aeruginosa* que así pueden tomarse como cepas indicadoras para establecer una amplia combinación de inhibiciones o no, dando 37 tipos hasta ahora bien definidos. La mayoría de los estudios muestra un franco predominio en los ambientes del piocinotipo 1, el cual puede subtipificarse con cepas subtipificadoras. Esto permite entonces estudiar la población de *P. aeruginosa* prevalente en un ambiente determinado (19, 20). En el presente estudio es claro que la circulación de *P. aeruginosa* constituye un problema en el universo estudiado demostrándose concluyentemente que el piocinotipo 1 está enclavado en dicho ambiente. Es curioso al analizar la Tabla 5 encontrar que 7 hemocultivos mostraron el piocinotipo 1,

subtipo H. Ello demuestra, bien sea que estos hemocultivos correspondan o no a septicemias, una clara contaminación del medio ambiente indicando entre otras cosas, alta densidad de la circulación del microorganismo en el universo del estudio. Otra importancia de este tipo de estudio a más de conocer la realidad de la población microbiana dentro de los universos hospitalarios particulares, puede ser el estudio del comportamiento de esta población frente a los antibióticos, por ejemplo cabe preguntar: ¿son los miembros del tipo 1 subtipo H, homogéneamente sensibles o resistentes a determinados antibióticos? ¿Existe alguna correlación de los tipos con la virulencia? Estos estudios tendrán que ser realizados posteriormente. La piocinotipia es igualmente útil en las investigaciones de brotes epidémicos intrahospitalarios en la búsqueda de la fuente de contaminación (3-20), y su consiguiente control.

SUMMARY

108 strains of *Pseudomonas* isolated from a single hospital were studied. It was found that 105 strains were identified as *Pseudomonas aeruginosa*, 2 as *Pseudomonas pseudomallei* and 1 as *Pseudomonas alcaligenes*.

105 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were suitable for typing by means of the pyocinotype method. This study showed that 70.5% of them belonged to type 1, and 60.8% from type 1 belonged to subtype H. The paper also presents a broad discussion on the importance of this type of studies in hospital environments.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a los doctores Alfredo Villalobos y Auramarina de Roldán de la Universidad del Zulia, Maracaibo, por su colaboración. Igualmente al laboratorio de bacteriología del Hospital Militar por su cooperación, sin la cual este trabajo no se hubiese podido realizar. Finalmente nuestro reconocimiento muy especial al Dr. Alvaro Aguilera, Coordinador de la Red Nacional de Laboratorios, por su eficiente colaboración en la presentación de los cuadros de resultados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— Top, F. H.: Control de enfermedades infecciosas en hospitales generales. Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica N° 197, 1970.
- 2.— Proc. Internat. Conf. on Hospital Infections. Am. Hosp. Assoc. Chicago, 1971.
- 3.— Fierer, J., Taylor, P. M., and Gezon, H. M.: *Pseudomonas aeruginosa* epidemic traced to delivery - room resuscitators. N. Eng. J. Med. 276:991-996, 1967.
- 4.— Leading article. *Pseudomonas* infection in hospital. Brit. Med. J. 4: 309, 1967.
- 5.— Whitby, J. L., and Ramping, A.: *Pseudomonas aeruginosa* contaminaron in domestic hospital enviromets. Lancet 1: 15-17, 1972.
- 6.— Lowbury, E. J. L., Thom, B. T., Lilly, H. A., Babb, J. B. and, Whittall, K.: Sources of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with tracheostomy. J. Med. Microbiol. 3: 39-56, 1970.
- 7.— Light, I. J., Sutherland, J. M., Cochran, L. M., and Sutorius, J.: Ecologic relation between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* in a nurse population. N. Eng. J. Med. 278: 1243-1247, 1968.
- 8.— Aylife, G. A. T., Lowbury, E. J. L., Hamilton, I. G., Small, J. M., Asheshov, E. A., and Parker, M. T.: Hospital infection with *Pseudomonas aeruginosa* in neurosurgery. Lancet 2: 365-369, 1965.
- 9.— Chadwick, P.: The epidemiological significance of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital sinks. Can. J. Pub. Health 67: 323-328, 1976.
- 10.— Hug, R., and Gilardi, L. G.: *Pseudomonas*. Chapter 23, pp. 250-269. Manual of Clinical Microbiology. 5d. Ed. American Society for Microbiology, Washington D. C., 1974.
- 11.— Villalobos, A. y De Roldán, A.: La piocinotipia de *Pseudomonas aeruginosa* en nuestro medio. Rev. Fac. Med. (Maracaibo) 6:97-107, 1973.
- 12.— Gillies, R. R. and Govan, J. R.: Typing of *Pseudomonas pyocynea* by pyocine production. J. Path. Bacteriol. 91: 339-345, 1966.
- 13.— Kabat, E. A., and Mayen, M. M.: Experimental immunochemistry p. 872, 2 nd. Ed. Charles A. Thomas. 1961.
- 14.— Lowbury, E. J. L., Kidson, A., Lilly, H. A. et al.: Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics: emergence of strains highly resistant to carbenidillin. Lancet 2:448-452, 1969.
- 15.— Schimpf, S., Satterlee, W., Young, V. M., and Serpick, A.: Empiric therapy with carbenicillin and gentamicin for febrile patients with cancer and granulocytopenia. N. Eng. J. Med. 284:1061-1065, 1971.
- 16.— Curtin, J. A., Petersdorf, R. G., and Benett, I. L., Jr.: *Pseudomonas* bacteremia: review of ninety-one cases. Ann. Intern. Med. 54:1079-1107, 1961.
- 17.— Feeley, T. W., Du Moulin, G. C., Hedley-Whyte, J., Bushnell, L. S., Gilbert, J. P., and Feingold, D. S.: Aerosol polymyxin and pneumonia in seriously ill patients. N. Eng. J. Med. 293: 471-475, 1975.
- 18.— Hersh, E. M., Bodey, G. P., Naies, B. A. et al: Cause of death in acute leukemia: a ten year study of 414 patients from 1954-1963. JAMA 193:105-109, 1965.
- 19.— Dunkelberg, H., and Schicketanz: Epidemiological studies of *P. aeruginosa* infections by the typing of pyocine sensitivity. Zbt. Bakt. Hyg. 161: 444-454, 1976.
- 20.— Tinne, J. E.: Persistence of a specific *Pseudomonas* infections in a large general hospital. Scot. M. J. 22:16-21, 1977.