

Cartas al editor

Resistencia a antibióticos y presencia de plásmido en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Al Editor:

En los últimos años, se ha prestado gran atención al tratamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* a causa de que esta bacteria es altamente resistente a muchos antibióticos que son inhibitorios para otras especies (Rodríguez Tebar y col., 1982). Esta resistencia a antibióticos puede ser atribuida a la presencia de plásmidos como son los que median la resistencia a gentamicina en estas especies (Kato y col., 1982), así como alteraciones de ciertas estructuras celulares que forman la barrera de penetración, disminuyendo la susceptibilidad a antibióticos β -lactámicos y otros (Rodríguez Tebar y col., 1982; Nicas y Hancock, 1983).

Pseudomonas aeruginosa produce una β -lactamasa, codificada por el cromosoma, que hidroliza penicilina G, ampicillin y cefalosporina. La carbenicilina y otros nuevos antibióticos β -lactámicos no son hidrolizados por esta enzima e inhiben la mayoría de estas cepas. La resistencia a este antibiótico puede resultar de la presencia de plásmidos *R* que codifican para la producción de una β -lactamasa constitutiva capaz de hidrolizar estas drogas. Han sido determinados 11 tipos diferentes de plásmidos que median β -lactamasa en Gram Negativa, nueve de ellos en *Ps. aeruginosa* (Calderwood y col., 1982).

En el presente trabajo se reporta la resistencia a un grupo de antibióticos en dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (225 y 265), aisladas de pacientes en una sala de quemados, así como la posible presencia de un plásmido *R*.

Las cepas utilizadas fueron suministradas por el departamento de Bacteriología del hospital "Luis Díaz Soto" de Ciudad de La Habana, donde se realizó el aislamiento y la identificación de ellas. Fueron conservadas en medio LB, con temperatura de incubación de 30°C durante los ensayos.

Se determinó según Scudamore y Goldner (1982) que las cepas 225 y 265 eran resistentes a: bencilpenicilina (1000 μ g/ml), sulfanilamida (1000 μ g/ml) carbenicilina (100 μ g/ml), kanamicina (50 μ g/ml) y cloranfenicol (50 μ g/ml). Ambas cepas mostraron una actividad β -lactamasa que utiliza como sustrato bencilpenicilina y no carbenicilina; esta determinación se realizó según el procedimiento planteado por Boyer (1971) y el método de Boyer y Ganshow (1982).

Las cepas 225 y 265 fueron curadas empleando naranja de acridina y acriflavina, cuyas concentraciones mínimas inhibitorias fueron determinadas según Mitsuashi y col. (1961). La curación fue realizada según Salisbury (1972). Las células tratadas con acriflavina (40 μ g/ml)

fueron sembradas y replicadas sobre medios suplementados con: penicilina, carbenicilina y sulfanilamida, a las concentraciones mencionadas anteriormente, seleccionándose las colonias sensibles. Las tratadas con naranja de acridina ($120 \mu\text{g/ml}$) fueron sembradas y replicadas sobre medio suplementado con carbenicilina.

Se encontró que una fracción de las células resistentes a antibióticos fueron convertidas en sensibles, siendo menos efectiva la naranja de acridina obteniéndose 23% y 18% de curación.

Con respecto a los resultados obtenidos para el tratamiento con acriflavina detectamos porcentajes de curación similares para ambas cepas (225 y 265); penicilina 5% y 5%, carbenicilina 29% y 28% y sulfanilamida 41% y 43%.

Teniendo en cuenta lo reportado por Wtanabe y Fukasawa (1961) y analizando el porcentaje de curación obtenido, es posible sugerir que la resistencia a carbenicilina y sulfanilamida está determinada por la presencia de un plásmido en estado no asociado al cromosoma bacteriano. Si comparamos estos porcentajes de curación con los obtenidos para penicilina, podemos plantear que este carácter parece estar determinado por el cromosoma; estos resultados concuerdan con lo planteado por Calderwood (1982).

La diferencia obtenida en los porcentajes de curación con respecto a carbenicilina y sulfanilamida, puede ser explicada como un fenómeno de inhibición diferencial por la acridina de algunas funciones especiales de los plásmidos, o puede ser justificada por una segregación por separado de unidades hereditarias (Novick, 1969).

Se determinó la presencia de plásmido mediante el método de extracción alcalina de Birnboim y Doly (1979) en las cepas 225 y 265, así como en cepas sensibles derivadas de las anteriores por tratamientos con agentes curantes. El ADN plasmídico fue evidenciado por electroforesis en gel de agarosa 0,8%, teñido con bromuro de etidio, y visualizado con luz ultravioleta. En la figura 1 se muestran los resultados para la cepa 225 y sus derivados sensibles. En ambos casos se observó una correlación positiva entre la presencia de plásmidos y la resistencia a carbenicilina y sulfanilamida. Todas las cepas analizadas fueron resistentes a penicilina, independientemente de presentar o no el plásmido.

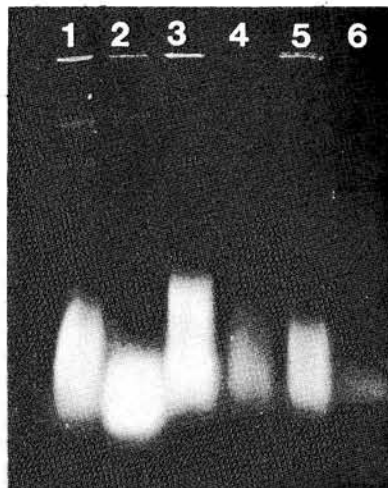


FIG. 1. Electroforesis en gel de agarosa de ADN plasmídico aislado de *Pseudomonas aeruginosa* 225, con un volumen de aplicación de $8 \mu\text{l}$ por muestra. De izquierda a derecha; carrilera 1, PFL-2; carrileras 2 y 3, p. 225, carrilera 4, 5 y 6 cepas curadas.

Estos resultados fueron corroborados en nuestro laboratorio por el aislamiento masivo del ADN plasmidial y su uso como vector en la transformación de cepas de *E. coli* sensibles a carbenicilina.

REFERENCIAS

- BIRNBOIN, H. C. y J. DOLY (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucl. Acids Res. **7**, 1513-1523.
- BOYER, P. D. (1971). *The Enzymes*. Third Edition. Vol. **4**, p. 23-46, Academic Press, New York.
- BOYKO W. L. y R. E. GANSCHOW (1982). *Rapid Identification of Escherichia coli Transformed by pBR 322 carrying inserts at the PstH Site*. Anal. Biochem. **122**, 85-88.
- CALDERWOOD S. B.; A. GARDELLA; A. M. PHILIPPON; G. A. JACOBY y R. C. MOELLER-RING Jr. (1982). *Effects of Azlocillin in Combination with Clavulanic Acid, Sulbactam, and N-Formimidoyl Thienamycin Against Lactamase-Producing, Carbenicillin-Resistant Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **22**, 266-271.
- KATO, T.; Y. SATO; S. IYOBE y S. MITSUHASHI (1982). *Plasmid-Mediated Gentamicin Resistance of Pseudomonas aeruginosa and Its Lack of Expression in Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **22**, 358-363.
- MITSUHASHI S.; K. HARADA y M. KAMEDA (1961). *Elimination of Transmissible Drug resistance by Treatment with Acriflavin*. Nature **189**, 947.
- NICAS, T. I. y R. E. W. HANCOCK (1983). *Pseudomonas aeruginosa Outer Membrane Permeability: Isolation of a Porin Protein F-Deficient Mutant*. J. Bact. **153**, 281-285.
- NOVICK, R.P. (1969). *Extrachromosomal Inheritance in Bacteria*. Bact. Rev. **33**, 210-235.
- RODRIGUEZ-TEBAR, A.; F. ROJO; D. DAMASO y D. VAZQUEZ (1982). *Carbenicillin Resistance of Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **22**, 255-261.
- SALISBURY, V.; R. W. HEDGES y N. DATTA (1972). *Two Modes of 'Curing' Transmissible Bacterial Plasmids*. J. Gen. Microbiol. **70**, 443-452.
- SCUDAMORE, R. A. y M. GOLDNER (1982). *Penetration of the Outer Membrane of Pseudomonas aeruginosa by Synergistic Combinations of Lactam and Aminoglycosides Antibiotics*. Antimicrob. Agents Chemother. **21**, 1007-1010.
- WATANABE, T. y T. FUKASAWA (1961). *Episome-Mediated Transfer of Drug Resistance in Enterobacteriaceae*. J. Bact. **81**, 679-683.

Anisia Silva¹ y Miriam Torres²

1) Facultad de Biología, Universidad de la Habana

2) Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba