

DETERMINACION DE LA FIBRONECTINA PLASMATICA PARA LA PREDICCION TEMPRANA DE SEPSIS EN PACIENTES QUEMADOS

Lic. Blanca Elizabeth Samayoa Herrera
Químico Biólogo

Licda. Patricia Cáceres Montiel
Catedrática del Departamento de Microbiología.

SUMARIO

El presente estudio se llevó a cabo en 26 pacientes quemados, divididos en tres grupos: Grupo Séptico (I), Grupo Moderadamente Séptico (II) y Grupo No Séptico (III), así como un grupo control, con el propósito de comparar las concentraciones de fibronectina durante el curso de la quemadura con superficie corporal quemada, desarrollo de sepsis y microorganismos presentes en las heridas.

El estudio reveló que no existe una correlación significativa entre la superficie corporal quemada y la concentración de fibronectina.

Sin embargo, se encontró diferencia significativa entre la concentración de fibronectina de los pacientes quemados y el grupo control.

El grupo de pacientes sépticos presenta los valores más bajos de fibronectina con respecto a la media del grupo control, siendo el período más probable de desarrollo de sepsis los días comprendidos entre el tercero y el décimotercero, período que coincide con las depresiones más severas de fibronectina para este grupo.

Se determinó una relación inversa entre las concentraciones de fibronectina y los conteos microbianos en las heridas de los pacientes sépticos, lo cual fue contrario a lo presentado por los grupos de pacientes moderadamente y no sépticos, en los que las concentraciones de fibronectina se mantienen altas sobre la media del grupo control y los conteos microbianos variables.

El grupo de pacientes sépticos presentó el mayor conteo de microorganismos en las heridas, significativamente diferente al de los otros grupos.

Las pruebas estadísticas empleadas para determinar las diferencias entre los grupos en los distintos días fueron: análisis de varianza multifactorial modelo desbalanceado completamente al azar, seguido de la prueba de Tukey.

INTRODUCCION

Las lesiones térmicas constituyen una de las mayores causas de devastación fisiológica que el hombre puede sufrir; en ellas la principal causa de muerte sigue siendo debida a la infección y el desarrollo de sepsis, asociadas a la extensión y grado de la quemadura, bacterias resistentes, edad y enfermedades preexistentes (1-4).

Recientemente, algunos autores han enfatizado que la naturaleza y el curso de las anomalías inmunológicas, después de una lesión térmica, se correlacionan con las complicaciones sépticas de pacientes quemados. Estas alteraciones incluyen: depresión de la inmunidad mediada por células; defectos en las respuestas de los polimorfonucleares y monocitos a la quimiotaxis; disfunción de los macrófagos alveolares y anomalías en el complemento y el Sistema Retículo Endotelial (1-8).

Durante los últimos años el interés se ha centrado en el Sistema Retículo Endotelial y regulación fagocitaria por una α - 2 - glicoproteína opsónica o fibronectina plasmática, cuya deficiencia provoca fallos parciales en los mecanismos de defensa mediados por este sistema (3,6,8).

Ekindjian *et al.*, han demostrado que las determinaciones de fibronectina posteriores a las lesiones térmicas permiten predecir que pacientes podrían desarrollar sepsis (3).

Otro de los aspectos que se considera importante en las unidades de quemados en algunos países, es la cuantificación e identificación de los microorganismos presentes en las heridas. Con estas determinaciones es posible diferenciar entre la presencia de contaminación e infección y predecir la invasión de microorganismos hacia tejido viable. La importancia de utilizar estos procedimientos estriba en poder clasificar a los pacientes en categorías; identificar las fuentes potenciales de infección y administrar un tratamiento más selectivo y eficaz (-12).

En Guatemala, a la mayoría de pacientes que ingresan a los hospitales nacionales, no se les realiza ningún estudio que permita predecir o intensificar los cuidados necesarios para disminuir así la alta mortalidad por sepsis. Esto motivó el estudio de pruebas para la cuantificación de la fibronectina en pacientes quemados con el objeto de predecir en forma temprana el desarrollo de sepsis; así como la implementación de técnicas de cuantificación e identificación de la microbiota existente en las heridas, como auxiliares valiosos en el plan de cuidados y de tratamiento.

MATERIALES Y METODOS

Se determinaron las concentraciones de fibronectina en el plasma proveniente de 26 pacientes quemados atendidos en el Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala.

Los pacientes fueron divididos en tres grupos:

Grupo I, séptico: fiebre en picos de más de 39.5°C, uno o más hemocultivos positivos y alteraciones de conciencia.

Grupo II, moderadamente sépticos: fiebre de más de 39.5°C.

Grupo III, no sépticos: sin fiebre y hemocultivos negativos.

Las muestras fueron obtenidas en los días 3 \pm 1, 7 \pm 1, 10 \pm 1, 13 \pm 1, 17 \pm 1, 21 \pm 1 y 28 ó 35 después de la quemadura.

Se evaluó un grupo control consistente en 47 personas aparentemente sanas, con un promedio de edad de 24 años, con el propósito de determinar los valores normales de fibronectina.

A los pacientes quemados se les cuantificó e identificó la microbiota existente en las heridas por la técnica del hisopo húmedo, así como biopsia cuando se consideró necesario. Además se llevaron a cabo estudios de susceptibilidad antibiótica.

A. Determinación de fibronectina

Se llevó a cabo en placas de inmunodifusión radial, siguiendo las instrucciones del fabricante.*

Las muestras se obtuvieron al adicionar 4.5 ml de sangre venosa a 0.5 ml de citrato de sodio al 3.8 por ciento. El plasma así obtenido fue refrigerado antes del ensayo.

B. Cuantificación de microorganismos

Para la superficie de las heridas se utilizó el método del hisopo húmedo propuesto por Gergiadé *et al.* (9,10), modificado para este estudio de la forma siguiente: se utilizó un halo con diámetro conocido para limitar el área a muestrear.

Cuando fue necesario se tomó muestras para biopsia según el método sugerido por Loebel *et al.* (11).

C. Análisis estadístico

Las pruebas empleadas para determinar las diferencias entre los distintos grupos en los distintos días fueron: análisis de varianza modelo desbalanceado completamente al azar multifactorial (7 x 4 para las comparaciones de fibronectina y 7 x 3 para los conteos microbianos) y prueba de Tukey para la comparación múltiple de medidas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las heridas térmicas, además de romper la barrera mecánica de la piel, promueven la liberación de sustancias como colágeno desnaturalizado, la activación de los componentes de la coagulación, la predisposición al desarrollo de sepsis por contaminación de las heridas con el consiguiente fallo multisistémico, etc.

El Sistema Retículo Endotelial es uno de los encargados de remover estas partículas y desechos de la circulación, sin embargo se ha demostrado que las funciones de aclaramiento de este sistema, en pacientes quemados, se encuentran defectuosas debido a la deficiencia de un factor denominado fibronectina (3,6,8,13-15).

Existen dos clases de fibronectina: la soluble o plasmática y la de las superficies celulares, ambas son idénticas en composición, pero la plasmática tiene propiedades diferentes: circula abundantemente en el plasma y otros fluidos corporales y posee sitios de unión y reconocimiento para macromoléculas como colágeno, heparina, fibrina, fibrinógeno, actina, C₁o y

microorganismos, por lo que juega un importante papel en las funciones opsonicas previas a la fagocitosis primaria por las células de Kupffer en el hígado (Fig. No. 1) (16-19).

Estudios anteriores han demostrado que los niveles de esta proteína se encuentran inicialmente deprimidos en pacientes con lesiones térmicas o traumas, ocurriendo una depleción secundaria en pacientes que van a desarrollar sepsis.

La presente investigación se llevó a cabo en 26 pacientes quemados, de los que en el grupo séptico fallecieron un 67 por ciento, porcentaje similar al reportado en otros estudios (1-8).

Se determinó que no existe una correlación significativa entre la superficie corporal quemada y las concentraciones de fibronectina; así pacientes con un 50 por ciento de superficie corporal quemada tuvieron cursos favorables con aumentos de fibronectina, mientras que pacientes con porcentajes menores, fallecieron (Fig. No. 2 y Tabla No. 1).

Este resultado, es contrario al presentado por Lanser (15), y la razón de esta diferencia se debe posiblemente a que las muestras se tomaron a las 72 horas postquemadura y no, en las 6 a 12 horas como en el estudio de este autor.

En algunos de los pacientes los niveles de fibronectina no retornaron a los niveles normales en el tercer día. La razón de esta respuesta puede deberse a la destrucción de tejido con exposición de colágeno y proteínas desnaturalizadas, unión de la proteína con fibrina, presencia de células endoteliales, facilidad de migración de los fibroblastos que provocan un consumo acelerado sustancial de la misma en la herida. También se ha demostrado, que esta queda atrapada alrededor de la herida debido a su alto peso molecular.

Con los análisis estadísticos se determinó que existía diferencia significativa entre los grupos de pacientes sépticos, moderadamente sépticos, no sépticos y normales ($p > 0.05$).

Los grupos de pacientes moderadamente sépticos y no sépticos mostraron patrones variables de respuesta, luego de la quemadura y en el transcurso de su recuperación, presentando alzas y bajas en los niveles de fibronectina. Contrario a esto, los pacientes del grupo séptico presentaron respuestas con niveles bajos iniciales y con aumentos posteriores (Tabla No. 2 y Fig. No. 3).

Las razones por las que el grupo séptico mantiene sus niveles de fibronectina debajo de la media normal pueden deberse además de las mencionadas anteriormente a una degradación de la fibronectina intravascular (proteólisis limitada por plasmina), inactivación biológica o consumo acelerado por la presencia de microorganismos, fragmentos inhibitorios o síntesis inapropiada de la misma (20).

Las concentraciones de fibronectina en los días 28 y 21 fueron significativamente más elevadas que las de los otros días ($p > 0.05$).

A pesar que en el día 3 se esperaban las concentraciones más bajas de fibronectina, no ocurrió sino hasta en los días 7 y 10. Probablemente esta diferencia se debe a que en este período los pacientes ya han estado en contacto con cepas nosocomiales de microorganismos capaces de provocar sepsis y/o a que la mayoría de pacientes comienzan a sintetizar nueva fibronectina sin alcanzar los niveles apropiados hasta el día 21 y 28.

Los valores diarios de fibronectina del grupo de pacientes sépticos presentaron interacciones significativas al compararse con los valores de los otros grupos ($p > 0.05$) (Tabla No. 2)†

* Química Hoechst de Guatemala
Carret. Roosevelt Km. 15.5, Z. 7.

Con estos datos fue posible determinar que las diferencias se presentaron en el período comprendido entre el tercer y décimo tercer día postquemadura, y que este período coincide con el apareamiento de sepsis para este grupo.

Apoyándose en esto último y lo reportado por otros autores, puede concluirse que la deficiencia de fibronectina puede ser interpretada como el reflejo indirecto del desarrollo de sepsis (3,13,14,20).

Con respecto a los microorganismos cuantificados en las heridas de los pacientes, el grupo séptico presentó los conteos más altos ($p > 0.05$) (Fig. No. 4).

Las infecciones de estos pacientes pueden clasificarse como infecciones invasivas con o sin bacteremia. En los grupos moderadamente y no sépticos, las concentraciones de microorganismos no siguieron patrones definidos, pudiendo clasificarse estas infecciones como de tipo no invasivo sin bacteremia. Puede observarse además que los conteos microbianos en estos grupos no sobrepasan las cuantificaciones del grupo séptico; y que las concentraciones de fibronectina no sufren disminuciones significativas, lo que explica porqué estos pacientes pudieron manejar en mejor forma el reto al desarrollo de sepsis (Comparar Figs. No. 3 y 4).

En el grupo séptico, solamente un hemocultivo fue positivo para uno de los pacientes, a pesar de que los conteos microbianos en otros pacientes de este mismo grupo eran altos y la fibronectina baja. Esto apoya el hecho de no utilizar el hemocultivo como prueba única de monitoreo del desarrollo de sepsis (22).

Entre los microorganismos identificados, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp., fueron los más frecuentemente aislados (Tabla No. 3). Estos presentaron la mayoría de las veces patrones resistentes de susceptibilidad antimicrobiana ante los antibióticos utilizados en este centro hospitalario.

La deficiencia de fibronectina puede provocar la aparición de microorganismos como *P. aeruginosa* y *S. aureus* debido a una adherencia defectuosa de estos a los neutrófilos y monocitos (23-26).

La frecuencia en el aislamiento de estos microorganismos puede deberse también a que los pacientes se encuentran inmunodeprimidos, con heridas expuestas al ambiente nosocomial y tratados con terapias profilácticas, que eliminan la microbiota competitiva y promueven el desarrollo de especies como estas.

Con respecto a las técnicas empleadas, el coeficiente de variación para la determinación de fibronectina por inmunodifusión radial fue de 13.73 por ciento. Con este coeficiente se determina que la técnica es aceptable y precisa.

El coeficiente de variación para los conteos microbianos en superficie fue bastante alto (33.736), pero a pesar de este resultado, esta técnica es recomendable para ser utilizada como prueba de monitoreo de las heridas de los pacientes quemados. Si estos recuentos presentan cifras elevadas o consideradas peligrosas para el paciente, puede recurrirse a la biopsia.

Para finalizar puede afirmarse que la fibronectina como prueba indirecta del desarrollo de sepsis, el conteo de microorganismos en las heridas, la evaluación clínica apropiada y hemocultivos, pueden proporcionar información valiosa y objetiva para el seguimiento de los pacientes quemados.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Los niveles deprimidos de fibronectina pueden interpretarse como el reflejo indirecto del desarrollo de sepsis, cuadro que puede presentarse entre el día 3 y 13 postquemadura.
2. Existen diferencias significativas en la concentración de fibronectina entre los pacientes sépticos, moderadamente sépticos, no sépticos y normales. Los grupos de pacientes moderadamente y no sépticos presentan las concentraciones más elevadas de fibronectina con respecto al grupo control y séptico.
3. El grupo de pacientes sépticos presenta las mayores concentraciones de microorganismos significativamente diferentes a las de los otros grupos, siendo los microorganismos aislados con mayor frecuencia, en su orden: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp. y *Enterobacter* spp.
4. Para Guatemala se recomienda lo siguiente:
 - a. Que se inicien las gestiones necesarias para crear una Unidad de Quemados.
 - b. Que se establezca una Guía para el Cuidado y Tratamiento del Paciente Quemado basada en:
 - Prevención de la contaminación de las heridas con microorganismos del ambiente nosocomial.
 - Evaluación continua de las heridas por medio de conteos microbianos periódicos.
 - Reconocimiento temprano de sepsis por medio de la determinación de fibronectina, evaluaciones clínicas objetivas y hemocultivos repetidos.
 - Vigilancia constante en el cuidado de las heridas, asepsis debridamiento, hidroterapia y tratamiento tópico.
 - Soporte nutricional adecuado.

AGRADECIMIENTOS

A la Licenciada Patricia Cáceres Montiel por su paciencia y asesoría en este trabajo.

Al Ingeniero Agrónomo Marino Barrientos por su asesoría estadística en la presente investigación.

Al personal laborante de los departamentos de Cirugía y Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios.

A Química Hoechst de Guatemala.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Shorr RM, Ershler WB, Gamelli RL. Inmunoglobulin production in burned patients. *J Trauma* 1984; 24:319-322.
2. Deitch AE, Gelder F, McDonald J. Prognostic significance of abnormal neutrophil chemotaxis after thermal injury. *J Trauma* 1982; 22:199-204.

3. Ekindjian OG *et al.* Plasma fibronectin time course in burned patients Influence of sepsis. J Trauma 1984; 24: 214-219.
4. Miller CL. The immune response to burn injury. J Trauma 1981; 21:677-679.
5. Menon T *et al.* Kinetics of peripheal blood T cell numbers and functions in patients with burns. J Trauma 1984; 24:220-223.
6. Mosseson MW, Amrani L. The estructura and biologic activities of plasma fibronectin. Blood 1980; 56:145-158.
7. Bjornson AB, Altemeir WA, Bjornson S. A model studying the role of complement and inmunoglobulins in opsonization of oportunist microorganisms (The septic burned patients). Am Surg, 1983;189:515-527.
8. Saba *et al.* Reversal of fibronectin and opsonic deficiencis in patients. A controlled estudy. Ann Surg 1984; 199:8-96.
9. Georgiade et al. A comparison of methods for the quantitation of bacteria in burn wounds. II Clinical evaluation. Am J Clin Path 1970; 53:40-42.
10. Georgiade J *et al.* A comparison of methods for the quantitation of bacteria in burn wounds. I Experimental ebaluation. Am J Clin Path 1970;53:35-39.
11. Loeb EC *et al.* The method of quantitative burn wound biopsy cultures and its routine use in the care of burned patients. Am J Path 1974; 61:21-24.
12. Pruitt BA, McManus AT. Opportuniste infections in severely burned patients. Am J Med 1984; 146-154.
13. Saba TM, Jafe E. Plasma fibronectin (opsonic glycoprotein) its synthesis by vascular endothelial cell and rol cardiopulmnary integrity after trauma as relation to Reticulo Endothelial System function. Am J Med 1980; 68: 577-592.
14. Mosher FD. Physioly of fibronectin. Ann Rev Med 1984; 35: 561-575.
15. Lanser ME, Saba TM, Soovill WA. Opsonic glycoprotein (plasma fibronectin) levels after burn injury. Ann Surg 1980; 192:76-782.
16. Detich EA, Gels, F. MacDonald JC. The role of plasma fibronectin a nonantibody, noncomplement opsonin for *Staphylococua aureus* J. Trauma 1984; 24: 203-213.
17. Stanislawski L *et al.* Role of tibronectin in attachment of *Streptococcus pyogenes* and *Eshecichia coli* to human cell lines and isolated oral epithelial cells. Infect Imm 1985; 48:257-259.
18. Speziale *et al.* Fibronectin binding to a *Streptococcus pyogenes* strain. J Bacteriol 1984; 157:420-427.
19. Ouassi MA *et al.* Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. Nature 1984; 308:380-381.
20. Zearluth G, Wolf G. Plasma fibronectin as a marker for cancer and other diseases. Am J Med 1984;77:685-689.
21. Velly TS. Plasma fibronectin response to sepsis mobilization or synthesis? J Trauma 1984; 24:824-829.
22. Alexander WJ. Infections of burn wounds. 335-353p. (In Bennet JV, Brachman PS, eds. Hospital Infection. Boston: Little Brown, 1979. 542 p).
23. Brodin B *et al.* Low plasma fibronectin indicate septicaemia in mayor burns. Act Chir Scand 1984; 150:5-11.
24. Woods *et al.* Role of fibronectin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to buccal cells. J Infect Dis 1981; 143:784-790.
25. Woods *et al.* Role of salivary protease activity in adherence of Gram negative bacilli to mammalian bucal epithelial cells "in vivo". J Clin Invest 1981; 68: 1435-1440.
26. Proctor Ra. Role of fibronectin in human monocyte and macrophage bacterial activity. Infect Imm 1985; 47:629-637.

ANEXOS

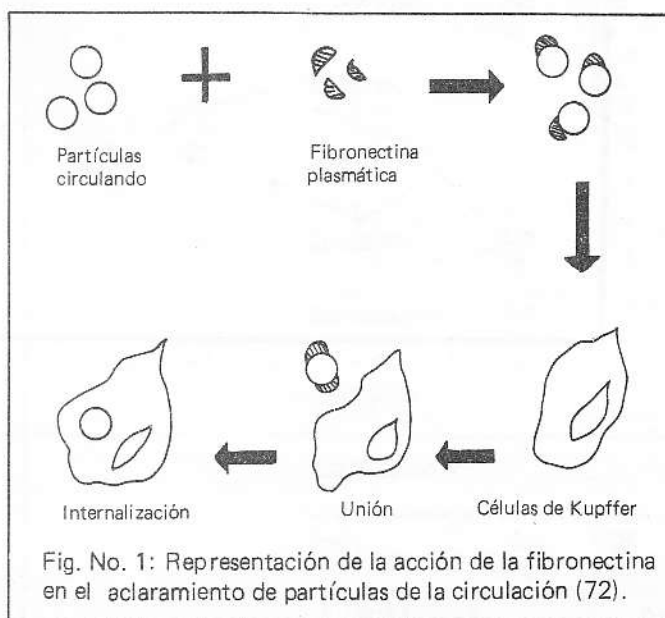


Tabla No. 1
Edad y Superficie Corporal Quemada (SCQ) de los pacientes en estudio

Grupo		Media	DS*	Min	Max
No. 1 (n = 7)	Edad	21.57 ±	20.03	20	80
No. 2 (n = 8)	Edad	25.50 ±	26.12	3	72
Moderadamente Sintéticos	SCQ	30.38 ±	21.12	10	72
No. 3 (n = 11)	Edad	21.00 ±	17.03	2	53
No Septicos	SCQ	13.81 ±	5.94	7	27

Fig. No. 2: Relación entre la Superficie Corporal Quemada y las concentraciones de fibronectina, 3 días después de la quemadura (16 determinaciones).

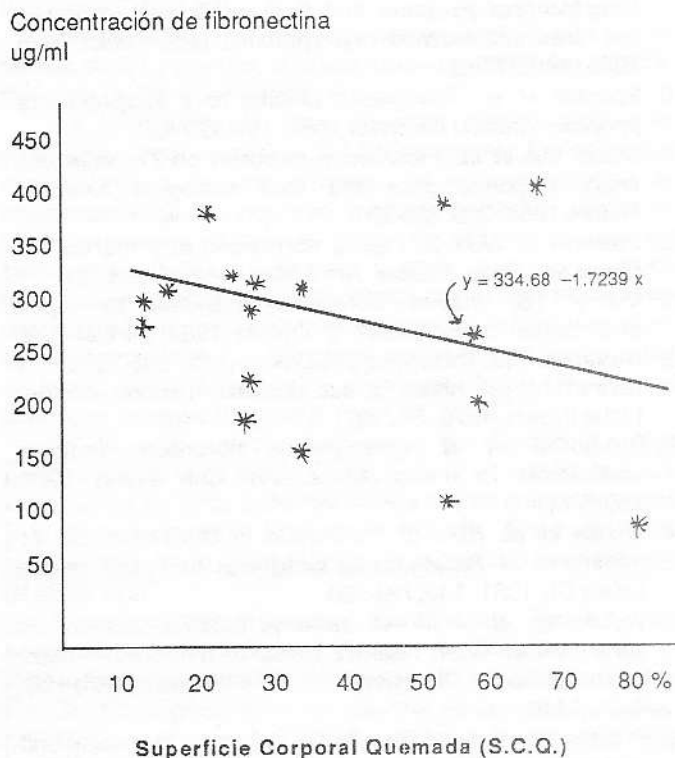


Fig. No. 3: Curso de la concentración de fibronectina de los grupos en estudio en los distintos días.

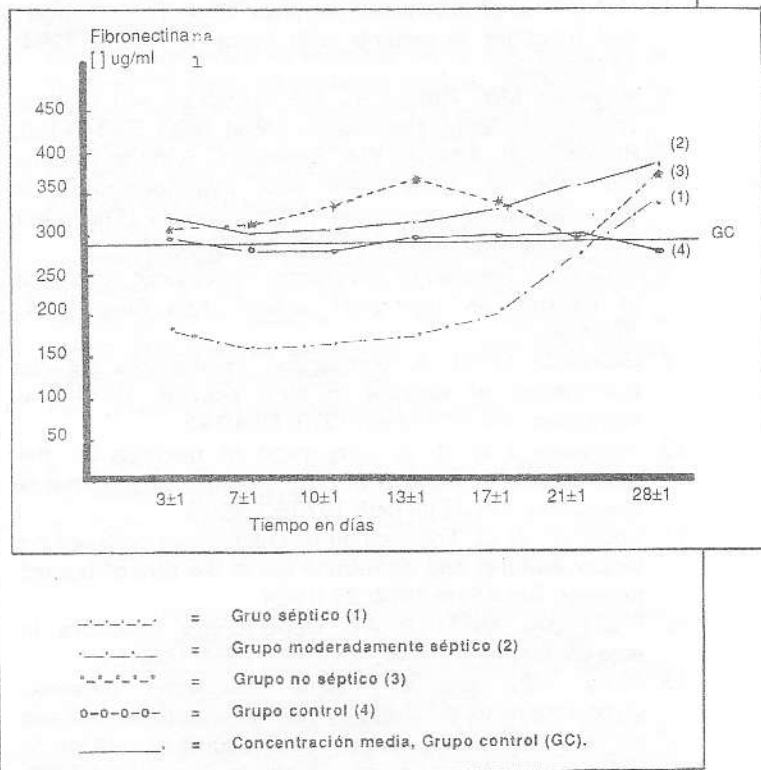


Fig. No. 4: Relación entre la concentración de microorganismos de los grupos en estudio en los distintos días.

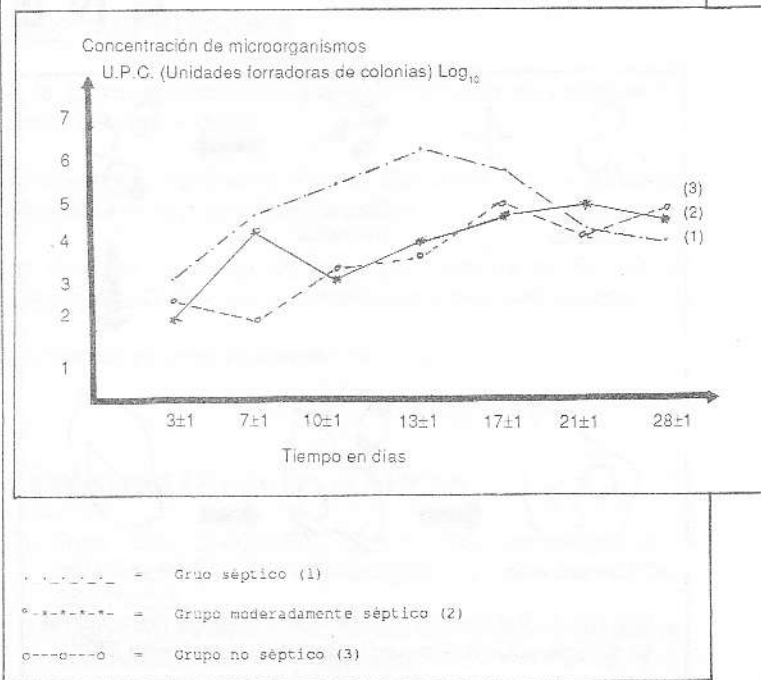


Tabla No. 2

Curso de la fibronectina (ug/ml) de los grupos en estudio en los distintos días

Día/Grupo	3±1	7±1	10±1	13±1	17±1	21±1	28 ó 35
No. 1 Sépticos	185.4	167.07	168.44	176.75	207	277.03	310.93
No. 2 Mod. Sépticos	325.33*	308.33*	311.00*	316.15*	330.25*	362.66*	379.33*
No. 3 No Sépticos	310.00	311.57*	341.71*	348.66*	328.57*	284.83	368.75*
Grupo Control	296.19*	287.85*	276.03	291.70*	299.96*	294.33*	288.05*

* Interacciones significativas con respecto a las concentraciones del Grupo Séptico en los días 3±1, 7±1, 10±1 y 13±1.
+ Interacciones significativas con respecto a las concentraciones del Grupo Séptico en los días 7±1, 10±1 y 13±1.
• Interacciones significativas con respecto a las concentraciones del Grupo Séptico en los días 7±1 y 10±1.

Fig. No. 5: Concentraciones medias de microorganismos durante el estudio.

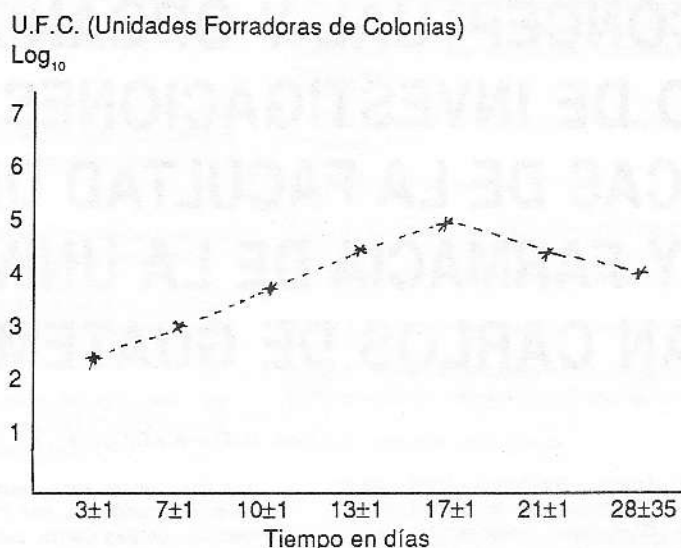


Tabla No. 5

Microorganismos más frecuentemente aislados en la superficie de las heridas de los pacientes en estudio

Microorganismo/Día	3±1	7±1	10±1	13±1	17±1	21±1	28	Total
<u>P. aeruginosa</u>	1.94* (3)	3.87 (6)	6.45 (10)	6.45 (10)	6.45 (10)	6.45 (10)	3.87 (6)	35.49 (55)
<u>Enterobacter</u> sp	3.23 (5)	3.23 (5)	2.59 (4)	3.23 (5)	2.59 (4)	1.28 (2)	1.94 (3)	18.07 (28)
<u>S. aureus</u>	1.94 (3)	1.94 (3)	4.52 (7)	3.22 (5)	2.51 (4)	3.22 (5)	1.29 (2)	18.71 (29)
<u>Klebsiella</u> sp	1.29 (2)	1.29 (2)	2.58 (4)	1.94 (2)	3.22 (5)	3.87 (6)	1.29 (2)	15.48 (23)
<u>S. epidermidis</u>	0.65 (1)	1.29 (2)	1.29 (2)	0.65 (1)	0.65 (1)	0.65 (1)	1.94 (3)	7.10 (11)
<u>Proteus</u> sp		0.65 (1)						
<u>E. coli</u>			0.65 (1)	0.65 (1)	0.65 (1)			
<u>Candida</u> sp	0.65 (1)							
<u>Streptococcus</u> sp	0.65 (1)							
<u>Citrobacter</u> sp				0.65 (1)				
<u>A. calcoaceticus</u> sp				0.65 (1)				
Total	10.36 (16)	12.26 (19)	18.06 (28)	17.42 (27)	16.73 (25)	15.48 (24)	10.32 (16)	100 (155)

* Porcentajes

Número de determinaciones