

UNIVERSIDAD DE LA HABANA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA

## Patrones de drogorresistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico humano

Dra. Nidia M. Rojas Hernández,<sup>1</sup> Lic. Natacha Fernández López,<sup>2</sup> Lic. María H. Espino Hernández<sup>3</sup> y Dra. María de los Ángeles Fernández Ferrer<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se caracterizaron 50 cepas circulantes de *Staphylococcus aureus* de origen clínico por su drogosensibilidad frente a 15 antimicrobianos mediante el método de difusión radial en medio Mueller Hinton. Además, se determinó la producción de la enzima beta lactamasa por los métodos acidimétrico y cromogénico, así como la presencia de cepas metilina-resistentes. Se determinó que 32 % de las cepas era sensible frente a todos los antimicrobianos probados. Los más efectivos fueron imipenem, norfloxacin y amikacina para 98, 96 y 92 % de sensibilidad; así como la existencia de 27 patrones diferentes de drogorresistencia en las cepas estudiadas. De ellas, 22 % era productor de beta lactamasa, y de estas últimas, 27 % resultó meticillin resistente.

**DeCs:** STAPHYLOCOCCUS AUREUS/efectos de drogas; RESISTENCIA MICROBIANA A LAS DROGAS.

El *Staphylococcus aureus* constituye la especie de mayor importancia clínica humana dentro de su género.<sup>1</sup> Aunque esta especie en ocasiones puede estar presente en la microbiota normal como un comensal, en otros casos, puede ser el agente etiológico de enfermedades infecciosas muy severas y diversas.<sup>2</sup> Ninguna bacteria patógena humana es tan versátil ni ha desarrollado tantos mecanismos de resistencia frente a los antimicrobianos como *S. aureus*, lo que unido a su corto tiempo de generación, hace de esta especie un agente poderoso y temido en lo referente a la salud humana, sobre todo en las infecciones hospitalarias,<sup>3</sup> por lo que requiere de una terapéutica acertada para su tratamiento.<sup>4</sup>

Los mecanismos de drogorresistencia, a través de los cuales las bacterias se defienden frente a los antimicrobianos, son diversos.<sup>5,6</sup> Uno de los más conocidos es la producción de enzimas del tipo de las beta lactamasas, que inactivan los antimicrobianos de la familia de las penicilinas y a veces algunas cefalosporinas.<sup>7,8</sup> Recientemente, la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticillina, ha ocasionado brotes de infecciones nosocomiales en diferentes países del mundo,<sup>9</sup> pero su presencia en los medios hospitalarios cubanos es algo aún no bien definido hasta el momento. Por todo lo anterior, y por la necesidad de conocer la susceptibilidad frente a los antimicrobianos de cepas de *S. aureus* circulantes en hospitales

<sup>1</sup> Doctora en Ciencias Biológicas. Investigadora Titular. Facultad de Biología de la Universidad de La Habana.

<sup>2</sup> Licenciada en Microbiología. Reserva Científica del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ).

<sup>3</sup> Licenciada en Microbiología. Hospital Materno Infantil "América Arias".

<sup>4</sup> Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Microbiología. CIMEQ.

cubanos, se realizó el presente trabajo con el objetivo de definir el comportamiento y los patrones de drogorresistencia en un grupo de cepas de esta especie; así como para analizar la incidencia de cepas productoras de beta lactamasa y meticillin-resistentes entre ellas, que suelen estar asociadas con patrones de multirresistencia frente a las drogas antimicrobianas.

## MÉTODOS

Se emplearon 50 cepas de *S. aureus*, aislados a partir de pacientes atendidos por el Departamento de Microbiología del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ) durante el período comprendido entre diciembre del año 1997 y abril de 1998. El origen de las cepas era el siguiente: 31 procedían de muestras de misceláneas (pus, heridas y catéter), 5 de diálisis, 2 de hemocultivos, 5 de exudados faríngeos, 5 de exudados nasales, 1 de exudado ótico y 1 de exudado ocular.

Los cultivos se identificaron según la metodología usual del laboratorio, consistente en siembra en placas con medio agar sangre de carnero 5 %, incubación por 24 h a 37 °C y selección de colonias con características culturales típicas de la especie, y hemólisis. Se prepararon frotis y se les realizó coloración de Gram a partir de estas colonias, que se observaron al microscopio y se corroboró la existencia de las características morfológico-tintoriales esperadas para la especie. Después se realizaron las pruebas de catalasa, coagulasa libre, DNAsa y fermentación en medio manitol salado.<sup>10</sup> Se empleó como control positivo la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 y como control negativo para las pruebas de coagulasa, DNAsa y fermentación en manitol salado una cepa de *Staphylococcus epidermidis*.

### *Determinación de la susceptibilidad frente a los antimicrobianos*

La susceptibilidad antimicrobiana de cada cepa se analizó mediante el método de difusión radial en medio agarizado descrito por el Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS).<sup>11</sup> Se empleó caldo Mueller Hinton para la preparación

del inóculo, que se llevó hasta una turbidez similar al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland.<sup>12</sup> La siembra se efectuó en placas de medio Mueller Hinton agarizado. Los antimicrobianos empleados se presentan con sus respectivas claves en la tabla 1. Como control se usó la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 y se comparó el tamaño de los halos obtenidos con los descritos en la literatura. Una vez incubados, los resultados se interpretaron según lo descrito en las especificaciones del documento del NCCLS.<sup>12</sup>

**TABLA 1.** Relación de discos de antimicrobianos empleados y sus claves

Antimicrobiano	Clave	Antimicrobiano	Clave
Cefazolina	KZ	Eritromicina	E
Cefuroxima	CXM	Tetraciclina	TE
Ceftriaxona	CRO	Norfloxacin	NOR
Ceftazidima	CAZ	Imipenem	IPM
Azlocilina	AZL	Vancomicina	VA
Amikacina	AK	Gentamicina	CN
Kanamicina	K	Cloranfenicol	C
Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT		

### *Determinación de la producción de beta lactamasa*

Como la determinación de la presencia de este tipo de enzima es importante desde el punto de vista de la drogorresistencia,<sup>6</sup> todas las cepas se sometieron a esta prueba empleando para ello 2 métodos: uno acidimétrico<sup>12,13</sup> y otro a través de una cefalosporina cromogénica comercial con la finalidad de comparar los resultados obtenidos con cada uno. Se usaron cepas controles de *S. aureus*.

**Método acidimétrico:** Se preparó una suspensión densa de células frescas de cada cepa incubada durante 24 h y se resuspendió en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar una concentración similar a la del tubo 5 de Mc Farland. Después, se unieron 0,5 mL del inóculo con 1 mL del reactivo preparado y se disolvieron 10<sup>6</sup> unidades de penicilina G con 10 mL de rojo fenol 5 %. Las lecturas se realizaron a los 60 min. Todas las cepas se evaluaron por duplicado. Se empleó una cepa de *S. epidermidis* como control negativo y otra de *S. aureus* ATCC 29213 como control positivo.<sup>13</sup>

*Método cromogénico:* Para este método se emplearon discos de nitrocefin (CEFINASE, BIOMERIEUX)<sup>14</sup> humedecidos con una gota de agua destilada estéril. Sobre la superficie del disco se realizó una extensión de parte de una colonia de cada cepa a probar. La lectura se efectuó a los 5 min, pues a los 3 min recomendados por los autores, en ocasiones el resultado no estaba bien definido.

#### *Determinación de cepas meticillin-resistentes*

A las cepas productoras de la enzima beta lactamasa se les realizó esta determinación. Se efectuó con discos de oxacilín (1 µg), que es más estable que el meticillin. El inóculo se preparó igual que para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, pero la placa de medio agarizado contenía medio Mueller Hinton agarizado con 4 % de NaCl. Más tarde se realizó la confirmación del crecimiento inoculando una suspensión de cada cepa sobre la superficie de este mismo medio con la adición de 6 µg/mL de oxacilín. Un crecimiento franco a las 24 h de incubación se consideró resistente.<sup>11</sup>

## RESULTADOS

En la tabla 2 se observa que todas las cepas probadas fueron sensibles a la vancomicina. Los antimicrobianos más efectivos fueron imipenem, norfloxacin y amikacina con 98, 96 y 92 % de todas las cepas sensibles. La tetraciclina y el trimetoprim-sulfametoxazol solo fueron efectivos frente a 50 y 38 % de las cepas estudiadas, lo que las ubica como drogas poco efectivas para el tratamiento de infecciones producidas por esta especie.

En la tabla 3 se muestran los resultados correspondientes al porcentaje de cepas resistentes a antimicrobianos solos o en combinación. Ninguna cepa mostró resistencia frente a más de 9 fármacos. Es notable que a pesar de haber empleado 15 antimicrobianos diferentes, 16 cepas para 32 % del total, fueron sensibles frente a todos los antimicrobianos enfrentados. No se encontraron cepas que fueran resistentes a las combinaciones de 6 ni 8 antimicrobianos. No obstante, el hallazgo de una cepa resistente frente a 7 antimicrobianos y 4 resistentes frente a 9 de los 15 antimicrobianos probados, implica una alta multirresistencia en ellas.

**TABLA 2.** Resultados del estudio de la susceptibilidad antibacteriana de las cepas de *Staphylococcus aureus* frente a los antimicrobianos probados (%)

Antimicrobianos	Cepas resistentes	Cepas con susceptibilidad intermedia	Cepas sensibles
VA	0	0	100
IPM	2	0	98
NOR	0	4	96
AK	6	2	92
C	10	0	90
KZ	16	0	84
CMX	12	4	84
CRO	10	8	82
CN	20	4	76
K	30	2	68
AZL	4	30	66
E	28	14	58
CAZ	16	26	58
TE	48	2	50
CAZ	38	24	38

**TABLA 3.** Resultados del análisis de la resistencia encontrada en las cepas por antimicrobiano solo o en combinación con otros (%)

No. de antimicrobianos	Cepas resistentes (%)	No. de antimicrobianos	Cepas resistentes (%)
0	32	5	6
1	20	6	0
2	14	7	2
3	6	8	0
4	12	9	8

**TABLA 4.** Patrones de drogorresistencia de las cepas estudiadas

No. del patrón	No. de antimicrobianos	Antimicrobianos resistentes	No. de cepas
1	0	-	16
2		TE	2
3		K	3
4	1	CAZ	1
5		SXT	1
6		CN	1
7		C	1
8		E+K	1
9		TE+CAZ	1
10	2	TE+SXT	3
11		SXT+CN	1
12		TE+CN	1
13		TE+SXT+C	1
14	3	TE+SXT+K	1
15		E+TE+CN	1
16		E+TE+K+AZL	1
17		E+TE+K+SXT	1
18	4	E+TE+CN+SXT	2
19		E+TE+CXM+CAZ	1
20		E+CN+CTX+KZ	1
21		E+TE+K+CN+SXT	1
22	5	TE+K+AK+KZ+SXT	1
23		E+TE+K+AK+SXT	1
24	7	E+TE+K+CAZ+KZ+CRO+CXM	1
25		E+TE+K+CAZ+CRO+CXM+SXT+CN+KZ	2
26	9	E+TE+K+CAZ+KZ+CRO+CXM+SXT+IPM	1
27		TE+K+CAZ+KZ+CRO+SXT+CMX+AK+AZL	1

La tabla 4 se confeccionó a partir de los diferentes patrones presentados por cada cepa como respuesta frente al conjunto de antimicrobianos, se definieron los patrones de drogorresistencia característicos para cada cepa y su frecuencia de aparición en el grupo en estudio. La determinación de 27 patrones diferentes permitió analizar el posible grado de asociación entre las diferentes cepas, que es evidentemente bajo, si se considera que el estudio se realizó con 50 cepas. El patrón 1 que agrupa a las cepas sensibles a todos los antimicrobianos probados, fue el de mayor frecuencia en el grupo, y le siguieron

los patrones 3 (resistencia frente a la kanamicina) y el patrón 10 (resistencia frente a los antimicrobianos trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina).

Al realizar las pruebas de producción de beta lactamasa por ambos métodos, hubo una coincidencia total en los resultados de todas las cepas, se determinó la producción de esta enzima en 11 cepas, lo que correspondió a 22 % del total. Estas pertenecían a los patrones siguientes: 1 correspondía al patrón 4, 2 eran resistentes a 2 antimicrobianos (patrones 8 y 11), 3 resultaron resistentes frente a 4 antimicrobianos (patrones

16, 19 y 20), 1 se encontraba ubicada en el patrón 24 y las 4 restantes presentaban resistencia frente a 9 antimicrobianos (2 de ellas en el patrón 25, y las 3 últimas en los patrones 26 y 27).

Cuando se realizó la prueba de meticillin-resistencia a las cepas productoras de beta lactamasa, se encontró que 3 cepas presentaban esta característica y pertenecían a los patrones 24, 25 y 27.

## DISCUSIÓN

El hallazgo de cepas de *S. aureus* resistentes o con resistencia reducida a la vancomicina (glicopéptido de alto peso molecular que inhibe la síntesis de la pared celular de las bacterias grampositivas e impide la síntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana<sup>15</sup>), es una gran dificultad para el tratamiento y control de infecciones producidas por estas cepas. Su detección constituye no solo un riesgo grave para el paciente, sino además una amenaza muy seria para la salud pública.<sup>16</sup> La ausencia de cepas con estas características en el grupo estudiado en este trabajo, si bien es un buen pronóstico, no quiere decir que se descuide en un futuro la realización de métodos para determinar su posible presencia.

Se debe destacar que la resistencia encontrada frente a antimicrobianos como la tetraciclina resultó elevada, al igual que para la eritromicina, lo que pudiera deberse a que estas drogas antimicrobianas se emplean ampliamente en el tratamiento de diversas infecciones humanas, incluidas las ocasionadas por *S. aureus*.

De los resultados mostrados en la tabla 3, es evidente que 8 cepas (para 16 % del total de cultivos estudiados) presentaron una multirresistencia importante frente a 5 antimicrobianos o más. Esto constituye una complicación desde el punto de vista del manejo terapéutico adecuado para tratar a los pacientes afectados de infecciones por estas cepas, así como para controlar su diseminación y evitar los brotes de infecciones nosocomiales. Ya otros autores en diferentes países han llamado la atención sobre este aspecto al encontrar resultados similares.<sup>17</sup> Indiscutiblemente, el éxito de la erradicación de estas cepas está relacionado con la política racional del uso de los antibióticos y el control interdisciplinario de los casos detectados.<sup>18</sup>

El bajo número de cepas coincidentes en un mismo patrón de drogorresistencia (los patrones 3 y 10 tienen el máximo de cepas: 3 en cada uno) indica que carecen de un origen común (al menos recientemente), pues no responden igual frente a los antimicrobianos. Incluso la coincidencia entre 2 cepas en el patrón 25 correspondiente a resistencia frente a 9 antimicrobianos, estas 2 cepas, cuyos orígenes de aislamiento son misceláneas y diálisis respectivamente, no pueden ser asociadas, pues aunque ambas producen beta lactamasa, una no es meticillin resistente y la otra sí lo es.

Como los resultados de la determinación de la enzima beta lactamasa coincidieron en 100 % de las cepas, por ambos métodos, es evidente que el método acidimétrico puede ser una opción fácil y barata para esta evaluación.

Se han publicado diferentes métodos para la clasificación en patrones de cepas de *Staphylococcus aureus*.<sup>19</sup> Pero indiscutiblemente, la definición de patrones de drogorresistencia es un método simple que puede utilizarse como preliminar en los pesquisajes epidemiológicos, porque aporta una mayor información que el habitual "mapa epidemiológico" de resistencia a los antimicrobianos que se emplea en los hospitales y resulta de gran utilidad para la detección temprana de posibles brotes de infecciones nosocomiales. Aunque sería conveniente realizar un estudio con un número mayor de cepas y realizar evaluaciones similares a las efectuadas en este trabajo en otras unidades hospitalarias.

## SUMMARY

Fifty circulating strains of *Staphylococcus aureus* of clinical origin were characterized by their drug susceptibility to 15 antimicrobials through the method of radial diffusion in Mueller Hinton medium. Also, beta-lactam production was determined by acidimetric and chromogenic methods as well as the presence of methicillin-resistant strains. It was confirmed that 32 % of strain was susceptible to tested antimicrobials, the most effective of which were imipenem, norfloxacin, and amikacin for 98, 96 and 92 % susceptibility respectively. Twenty-seven different drug resistance patterns were found in the studied strains. 22 % of the total strains was beta-lactam producers whereas 27 % of the latter turned out to be methicillin-resistant.

**Subject headings:** STAPHYLOCOCCUS AUREUS//drug effects; DRUG RESISTANCE; MICROBIAL.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Noble WC. Antibiotic resistance in the staphylococci. *Sci Prog* 1997;80:5.
2. Salyers AA, Whitt D. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. New York: ASM Press, 1994.
3. Trilla A. Epidemiology of nosocomial infections in adults intensive care units. *Intensive Care Med Suppl* 1994;(3):51-4.
4. Angeles M. Spread and maintenance of a dominant methicillin resistant. *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish Hospital. *J Clin Microbiol* 1994;32:2081.
5. Baquero F. Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:SA, 1.
6. Moreira BM, Daum RS. Antimicrobial resistance in staphylococci. *Pediatric Clin North Am* 1995;42(3):122-8.
7. Boyce JM. Methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus*: a continuing infection control challenge. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:45-9.
8. Bradley S, Terpenning MS, Ramsey MA. Methicillin - resistant. *Staphylococcus aureus*: colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med* 1991;115:417-27.
9. Durmaz B, Durmaz R, Sahim K. Methicillin- resistance among Turkish isolates of *Staphylococcus aureus* strains from nosocomial and community infections and their resistance patterns using various antimicrobial agents. *J Hosp Infect* 1997;37:325.
10. Kloos W, Bannerman T. *Staphylococcus and Micrococcus*. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenovar F, Tenover R, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6 th ed. Washington D.C:ASM, 1996.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial disks susceptibility tests. NCCLS document M2-A6, Villanova, PA, 1997.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. NCCLS document M7-A4 Villanova, PA, 1997.
13. Hedberg M, Nord CE. Beta-lactam resistance in bacteria: a review. *J Chemother* 1996;81(1):3-16.
14. Markowitz SM. Cefinase. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17(1):80-3.
15. Michel M, Gutman L. Methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. *Lancet* 1997;349:1901-16.
16. Flores P, Gordon S. Vancomycin -resistant. *Staphylococcus aureus*: an emerging public health threat. *Clev Clin J Med* 1997;67(10):527-32.
17. Fish DN, Piscitelli SC, Daziger LH. Development of resistance during antimicrobial therapy: a review of antibiotic classes and patients characteristics in 173 studies. *Pharmacotherapy* 1995;15(3):279-91.
18. Fuchs M, Langer C, Schmid A. Interdisciplinary management of infections with multidrug resistant. *Staphylococcus aureus* strains. *Zentral Chim* 1996;121(Suppl):76-8.
19. Rodahl V, Westh H, Jensen K. Antibiotic susceptibility and phage-type pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in general practice compared to strains from hospitalized patients. *Scand J Infect Dis* 1990;22:315-20.

Recibido: 6 de octubre de 1999. Aprobado: 2 de octubre del 2000.

Dra. Nidia M. Rojas Hernández. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 # 455, entre J e I, El Vedado, Ciudad de La Habana. Teléfono: 329252 Fax: (637)321321