

ARTICULO ORIGINAL

Lic. Lorena Adamczyk Wieler*
Dr. Christian Trigoso Agudo**
Lic. Aneth Vasquez Michel***
Lic. Loreta Duran Arias****

Determinación de la Homoresistencia y Heteroresistencia de Staphylococcus Aureus Meticilinoresistente aislado de muestras de pacientes internados en los hospitales Boliviano Holandes, Hospital Obrero, y Hospital de Clinicas

RESUMEN

**INSTITUTO
NACIONAL DE
LABORATORIOS EN
SALUD (INLASA)****Pregunta de Investigación**

¿Las cepas de Staphylococcus aureus meticilino resistentes circulantes en nuestro medio, serán homoresistentes o heteroresistentes?

Objetivos

Determinar los fenómenos de homoresistencia y heteroresistencia a meticilina en aislamientos de Staphylococcus aureus de muestras de pacientes internados en los Hospitales Boliviano Holandes, Hospital Obrero y Hospital de Clínicas de la Ciudad de La Paz

Determinar el porcentaje de cepas de Staphylococcus aureus resistentes a la meticilina en los aislamientos obtenidos

Diseño

Corte transversal

Lugar

Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA)

Muestras

Las cepas fueron aisladas de muestras de exudados purulentos de abscesos, heridas y quemaduras provenientes de pacientes internados en los Hospitales Boliviano Holandes, Hospital Obrero y Hospital de Clínicas.

Métodos

* Se realizó la identificación de género y

especie aureus mediante pruebas de catalasa; coagulasa y manitol respectivamente.

* La determinación de sensibilidad y /o resistencia se las hizo mediante difusión en disco (Bauer-Kirby) con discos de Oxacilina de 1 µg

* La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se la determinó por microdilución en caldo con Oxacilina p.a en polvo

Resultados

De 100 aislamientos de Staphylococcus aureus, el 16% son resistentes a la meticilina

En ninguna de las cepas resistentes se pudo evidenciar homoresistencia a la meticilina, por tanto el 100% de las cepas son heteroresistentes.

Conclusiones

Se determina que en nuestro medio la meticilina mantiene una buena actividad antimicrobiana frente a Staphylococcus aureus.

No existe el fenómeno de homoresistencia en las cepas aisladas en este estudio.

Palabras claves

Rev. Cuadernos 2005;50(2): 7-11 Meticilina, Staphylococcus aureus, homoresistencia, heteroresistencia, difusión en disco, concentración inhibitoria mínima

* Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
** Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA)
*** Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
**** Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA)

ABSTRACT

Research Question

Are the circulating methicillin resistant staphylococcus aureus strains in our patients homoresistant or heteroresistant?

Objectives

To assess the homoresistance and heteroresistance to methicillin of Staphylococcus aureus isolated from purulent exudate samples obtained from patients admitted to the Hospital Boliviano Holandes, Hospital Obrero and Hospital de Clinicas in La Paz.

To determine the percentage of methicillin resistant Staphylococcus aureus in these samples.

Study Design

Cross sectional

Study Location

Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA)

Samples

The strains were isolated from samples of purulent discharges from abscesses, wounds, infected burns from patients admitted to the Hospital Boliviano Holandes, Hospital Obrero, and Hospital de Clinicas.

Methods

Staphylococcus aureus was identified by tests of catalase, coagulase and manitol. Sensitivity and/or resistance was determined by disc diffusion (Bauer Kirby) with discs of Oxacilina of 1 µg. The Minimal Inhibitory Concentration (CIM) was determined by microdilution.

Results

Of 100 Staphylococcus aureus isolations, 16% were methicillin resistant. None of these strains was shown to be homoresistant. Therefore, we assume that 100% of the strains were heteroresistant.

Conclusions

Methicillin maintains a good antimicrobial activity against Staphylococcus aureus. The isolations in our study did not show homoresistance.

Key words

Methicillin, Staphylococcus aureus, homoresistance, heteroresistance, disc diffusion, minimal inhibitory concentration

INTRODUCCION

Las cepas de Staphylococcus metilino resistentes fueron identificadas inmediatamente después de la introducción de la metilina en la clínica ^(1, 2). Este tipo de resistencia fue denominada intrínseca ya que no era debida a la destrucción del antibiótico por β-lactamasas. La primera epidemia causada por MRSA fue en hospitales de Europa en 1960 ^(1,2), desde entonces las cepas de Staphylococcus aureus metilino resistente (MRSA) y los Staphylococcus coagulasa negativa resistente a la metilina se han expandido a nivel mundial y no solo en hospitales si no también fuera de ellos, particularmente entre pacientes crónicos bajo terapia y en personas que abusan de drogas parenterales.^(3,4,5)

Los MRSA son generalmente resistentes a otras importantes familias de antibioticos (macrólidos, lincosaminas y aminoglucocidos) por lo que desde la aparición de estas bacterias multiresistentes, los glucopéptidos, en particular la Vancomicina, se han convertido en las drogas de elección y muchas veces en las únicas opciones terapéuticas. ⁽⁶⁾

Una característica distintiva de la resistencia a la metilina es su naturaleza heterogénea⁽³⁾, el nivel de resistencia varia de acuerdo a las condiciones del cultivo y al antibiótico β-lactamico a utilizarse, la mayoría de las células en las cepas heterogéneas (típicamente 99,9% o más) son susceptibles a bajas concentraciones de antibiótico β-lactamico es decir de 1 a 5 µg/mL de metilina con una pequeña proporción de células (1 en 10⁶) que

crecen a concentraciones de metilicina de 50 µg/mL o más.

El fenómeno de resistencia homogénea versus heterogénea en cepas silvestres es completamente inexplicable. La pared celular de cepas heterogéneas es indistinguible mediante ensayos de cromatografía líquida de alta presión de la pared celular de cepas designados **chr***, susceptibles ⁽⁴⁾.

Los clones homogéneos estables seleccionados después de la siembra de cepas heterogéneas en antibióticos β-lactámicos tienen mutaciones en loci genéticos designados **chr***, que no son *fem* (factor esencial para la resistencia a la metilicina) y tampoco son **mecA** (gen codificador de la proteína PBP2a, que confiere resistencia a la metilicina) indicando que pueden ser logrados niveles altos de resistencia a través de varias rutas.⁽⁴⁾ La introducción de una cepa heterogénea **mecA** en una cepa homogénea que tiene **chr*** en la cual el **mecA** ha sido inactivado produce un fenotipo homogéneo. Se han reportado elementos cromosomales y clonales que confieren resistencia homogénea de alto nivel a mutantes seleccionadas con imipenem.

En nuestro medio se conoce muy poco acerca del tipo de cepas circulantes (homogénea o heterogéneamente resistentes), es más, no existen datos bien establecidos en torno al porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina, especialmente intrahospitalarios. Por ello, este estudio nos dará una idea de cual es el porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina y si estas son homogénea o heterogéneamente resistentes.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

1. Identificar las cepas de *Staphylococcus aureus* de exudados purulentos de heridas, abscesos y quemados mediante pruebas bioquímicas estandarizadas.
2. Determinar la resistencia a la metilicina en los aislamientos de *Staphylococcus aureus* por los métodos Kirby-Bauer, test de screening y CIM
3. Determinar si las cepas son fenotípicamente homoresistentes o heteroresistentes

MATERIALES Y METODOS

Tamaño muestral

Se procesaron un total de 113 muestras de las cuales se tomaron en cuenta para los tests de sensibilidad 100 aislamientos, aquellas que en la

tinción Gram son cocos Gram positivos y en las pruebas bioquímicas Catalasa, Coagulasa y Manitol dan positivo. Los 13 aislamientos restantes se los descarta por presentar contaminantes.

Lugar

Las muestras fueron analizadas en la Unidad de Bacteriología del Instituto de Laboratorios en Salud (INLASA). **Pruebas de Identificación de especie.**

Catalasa

Con una aguja de inoculación transferir parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos, agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % y observar la formación de burbujas abundantes luego de 30 a 40 segundos.

Prueba de coagulasa libre (tubo)

Emulsificar una pequeña cantidad de la colonia del microorganismo en un tubo que contenga 0,5 ml de plasma, incubar a 35°C durante 4 horas e inclinar el tubo observando si se forma un coágulo, las cepas que no forman coágulo en ese momento, deben ser reincubadas a temperatura ambiente, por 18 horas y nuevamente realizar la lectura.

Pruebas de determinación de resistencia

Todos los procedimientos de determinación de sensibilidad y resistencia, así como valores de referencia se basaron en parámetros establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ⁽⁸⁾.

Prueba de difusión de disco en agar (Bauer-Kirby)

Utilizar discos de 1 µg de metilicina (Difco Laboratories, Detroit, MT, USA) colocados en agar Muller Hinton (bioBRAS), con adición de 2% de NaCl. Las zonas de inhibición son determinadas luego de 48 horas de incubación a 35°C. La resistencia a la Metilicina, es definida de acuerdo a los puntos de corte que da el NCCLS ⁽⁸⁾. Los controles incluyen una cepa (ATCC 43300) y una cepa metilicina sensible (ATCC 25923).

Prueba de confirmación o test de screening

Las cepas resistentes (y si hubieran dudosas), son inoculadas en placas de agar Muller Hinton, suplementadas con 4% de NaCl y 6mg de metilicina por ml, son incubadas a 35 °C por exactamente 24 horas, para confirmar el crecimiento o no de las mismas.

Concentración inhibitoria mínima (CIM)

La CIM de la metilicina (Sigma, St Louis, MO, USA) es determinada por el método de microdilución en caldo, con 2 % de NaCl, luego de 24 horas de incubación a 35 °C, usando 10^5 UFC/ml. La cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus Coagulasa Negativos*, que son resistentes a la metilicina, presentan valores $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$, respectivamente, de acuerdo a los estándares (NCCLS). Entonces, las concentraciones de metilicina utilizadas para el estudio comprenden desde 0,25 $\mu\text{g/ml}$ hasta 128 $\mu\text{g/ml}$. Los controles utilizados fueron ATCC 43300 (cepa *S.aureus* metilicina resistente). El control negativo de resistencia fue ATCC 29213 (cepa *S.aureus* metilicina sensible).

RESULTADOS

De un total de 113 muestras recolectadas como *Staphylococcus aureus* de los diferentes nosocomios, solamente 100 fueron confirmadas como *Staphylococcus aureus* en el aislamiento e identificación, dando 88% de cepas utilizadas para las pruebas de sensibilidad y un 12% descartadas por razones de contaminación. (Cuadro Nº 1).

A 100 cepas aisladas se les realizó las pruebas de sensibilidad a la Oxacilina por los métodos de difusión por disco (Bauer-Kirby), Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y prueba de confirmación (test de screening), las tres pruebas se realizaron del mismo inóculo, de las cuales se determinó que 16% presentaban resistencia a la oxacilina por Bauer-Kirby y Test de Screening y 18% por CIM. (Cuadro Nº 2,3)

Las diluciones de Oxacilina probadas para la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) fueron 128, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y se determinó que 18% presentaban una MIC $\geq 4 \mu\text{g/mL}$, y 72% una MIC $\leq 2 \mu\text{g/mL}$. (Cuadro Nº 3).

De todos los aislamientos de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) se determinó que 100% presentan una resistencia heterogénea (Cuadro Nº 4).

Cuadro Nº 1. Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*

Aislamiento e Identificación	Nº de muestras procesadas	% de muestras procesadas
<i>S. aureus</i>	100	88%
Otros	13	12%
Total	113	100%

Cuadro Nº 2. Pruebas de sensibilidad de *Staphylococcus aureus* a la Oxacilina

Interpretación	Bauer-Kirby	CIM	Test Screening
Sensible	84%	82%	84%
Resistente	16%	18%	16%
Total	100%	100%	100%

Cuadro Nº 3. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de Oxacilina para *Staphylococcus aureus*

(CIM)	Nº de muestras	Porcentaje
128	0	0%
8	6	6%
6	6	6%
4	6	6%
2	34	34%
1	36	36%
0.5	24	24%
Total	112	100%

Cuadro Nº 4. Tipos de resistencia homogénea y heterogénea de los aislamientos de MRSA

Tipo de Resistencia	Muestras Resistentes	% de Muestras Resistentes
Homogénea	0	0%
Heterogénea	16	100%
Total	16	100%

DISCUSION

El INLASA elaboró informes semestrales a nivel nacional los años 1999 y 2000, con la colaboración de 20 laboratorios que son parte de la red de vigilancia de resistencia, en los que se reporta un aumento de 3% (1999) a 6,9%(2000) de MRSA, este es un aumento de mas del doble ⁽⁷⁾

En el presente estudio realizado entre octubre del 2003 y abril del 2004 se obtuvo 16% de MRSA, por lo que se tiene que pensar que mas o menos la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la metilicina va aumentando de 3 a 10% por año, por lo tanto se tienen que tomar medidas de prevención para que estos porcentajes de MRSA en un futuro no alcancen niveles alarmantes. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que los datos de este estudio no son nacionales sino regionales.

Los porcentajes de MRSA encontrados en este trabajo coinciden con algunos resultados reportados en Ecuador, pero son más bajos que los reportados en Lima (36-90%), Arequipa (67-71%), que son los más altos en Latinoamérica, pero comparables con los encontrados en Europa (75%) ^(9,10).

En lo referente a algunos detalles del procedimiento, en la determinación del CIM se realizó la dilución

de 128 µg/ml que es bastante alta, debido a que las cepas de *Staphylococcus aureus* que presentan una resistencia homogénea, se identifica más certeramente a altas concentraciones de antibiótico a partir de una concentración de 64 - 128 µg/ml, ya que mediante el antibiograma es un tanto difícil determinar este tipo de homogeneidad por que si bien estas cepas presentan un halo uniforme, muchas veces las cepas intra halo son imperceptibles a simple vista, pudiendo dar resultados errados.

No se determinó ninguna cepa de *Staphylococcus aureus* con una sensibilidad intermedia en el antibiograma, por razones de que el rango del diámetro del halo para que una cepa se considere con sensibilidad intermedia es muy pequeño (11 - 12 mm), y también porque en la CIM no se tiene esta categoría para estos resultados ⁽⁸⁾, entonces

las cepas que dan este tipo de sensibilidad deben ser muy pocas.

Se encontró que el 100% de las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes presentan resistencia del tipo heterogénea, lo cual concuerda con la mayoría de estudios realizados que indican que un 99.9% de las cepas aisladas de casos clínicos poseen una resistencia heterogénea ^(3,4,5).

Conclusiones

No se identificaron en este estudio, cepas de *Staphylococcus aureus* homogéneamente resistentes a meticilina

Se determina que en nuestro medio la meticilina mantiene una buena actividad antimicrobiana frente

REFERENCIAS

1. Bouza E, Cosín J y Grupo Cooperativo para el Estudio de la Infección. Estudio de Prevalencia hospitalaria y consumo de antibióticos. Med Clin (Barc): 353-358. 1997;98
2. Patterson, J.. En torno a la situación real de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. The Lancet. 2000 348:836-37.
3. Matthews, P.R. y P.R. Stewart.. Resistance heterogeneity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol.1998 Lett. 22:161-166.
4. Chambers,H.F. Methicillin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microb Rev 1997; 10:781-91.
5. Franklin D. Lowy.. *Staphylococcus aureus* infectious. New England Journal of medicine 1998. 339:520-32.
6. Jauregui Peredo L. E.. Antimicrobianos: Uso Terapéutico en Infectología Clínica. Editorial Plural. Primera Edición.2002 81-85.
7. Ministerio de Salud y Previsión Social, Instituto de Laboratorios en Salud. Laboratorio Nacional de Referencia Bacteriología Clínica. 2001. Vigilancia Epidemiológica de Resistencia a los Antimicrobianos (VERA) ,1999-2000. Boletín Informativo
8. Witte,W., M.Kresken, C.Braukle, and C.Cuny..Increasing incidence and widespred dissemination of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* 1997 (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals.Clin Microbiol Infect 3:414-422.
9. Mehndirrata,P.L., S. Vidhani, and M.D. Mathur.. A study on *Staphylococcus aureus* strains submitted to a reference laboratory. 2001 Indian J med Res 114:90-4.
10. NCCLS.. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for Bacteria that grow aerobically Approved Standard M7-A4. 2003 National Committee for Laboratory Standards.