

HOSPITAL PROVINCIAL
Dr. ANTONIO LUACES IRAOLA

Resistencia antimicrobiana de cepas de Staphylococcus aureus de origen clínico humano detectada por sistema DIRAMIC.

Antimicrobial resistance to strains of staphylococcus auruns of clinical human origin detected by the DIRAMIC system.

Lemis Dueñas Rosquete (1), Ana Margara Cadré Ratón (2), Oxana Cabrera Espinosa (3).

RESUMEN

Se caracterizaron 74 cepas circulantes de Staphylococcus aureus de origen clínico por su drogosensibilidad frente a 19 antimicrobianos mediante el método automatizado DIRAMIC. Se determinó que ninguna de las cepas fue totalmente sensible frente a todos los antimicrobianos probados. Los más efectivos fueron Norfloxacino, Azlocilina y Vancomicina para 90.5, 86.4 y 83.7% de sensibilidad, los de menos eficacia resultaron la Penicilina y Cefazolina con pobres 41.8 y 36.4 % de efectividad. Se halló que el 72% de las cepas estudiadas presentaron resistencia a 5 o más de los antibióticos utilizados, probando este dato una multiresistencia elevada. Un hallazgo significativo fue la detección de 5 cepas resistentes a la Vancomicina, antibiótico muy específico ante este tipo de gérmen

1. Doctor en Medicina. Especialista de I Grado en Microbiología. Master en Parasitología.
2. Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Microbiología.
3. Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Microbiología.

INTRODUCCION

Las lesiones de piel causadas por Staphylococcus aureus son las infecciones humanas más comunes causadas por este agente, siendo esta especie la de mayor importancia clínica dentro de su género. Del 40-50% de los seres humanos son portadores nasales del S. aureus. Sin embargo, diferentes mecanismos y factores patogénicos como son: la presencia de cápsula, producción de enzimas y toxinas, la colonización de sitios específicos del hospedero y la elaboración de slime hacen de este un agente un productor de enfermedades infecciosas muy severas y diversas. Ninguna bacteria patógena humana es tan versátil, siendo esta especie un agente poderoso y temido en las infecciones hospitalarias, por lo que requiere una terapéutica acertada para su tratamiento.

Los estafilococos son variablemente sensibles a muchos agentes antimicrobianos, su resistencia corresponde a diferentes clases: es común la producción de enzimas beta lactamasas, que inactivan los antibióticos de la familia de las penicilinas y en ocasiones algunas cefalosporinas; la resistencia a la nafcilina (igual que a la meticilina y a la oxacilina). La presencia de "tolerancia" lo que implica que experimentan inhibición por la acción del fármaco, pero este no los mata y por último los plásmidos que pueden presentar genes para la resistencia a la Tetraciclina, eritromicina, aminoglucósidos y otros fármacos. Recientemente, la aparición de cepas de S. aureus resistentes a la meticilina, ha ocasionado brotes de infecciones nosocomiales en diferentes países del mundo, en cambio 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 en hospitales cubanos mediante el empleo de nuevas técnicas de

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

MÉTODOS

Se emplearon 74 cepas de *S. aureus*, procedentes de pacientes atendidos por el laboratorio de Microbiología del Hospital General Docente "Antonio Luaces Iraola" durante los meses comprendidos entre junio y septiembre del 2003. De estas cepas, 46 pertenecían a pacientes atendidos en consulta externa y 28 a hospitalizados en diferentes servicios de dicho centro. El origen de las cepas era el siguiente: 31 procedían de lesiones de piel, 12 de misceláneas (pus, catéter, heridas, abscesos); 8 de hemocultivos, 9 de exudados oculares, 5 de exudados vaginales y 1 de faríngeo, 1 de espermocultivo y 1 de líquido pleural.

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 horas 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 y se corroboró la existencia de las características morfológicas tintoriales esperadas para la especie. Después se realizaron las pruebas de catalasa, coagulasa libre y fermentación en medio manitol salado. Se empleó como control positivo la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 y como control negativo para las pruebas de coagulasa y fermentación en amnitol una cepa de *Staphylococcus epidermidis*.

Determinación de la susceptibilidad frente a los antimicrobianos:

LA susceptibilidad antimicrobiana de cada cepa fue determinada por el método DIRAMIC KIT DIAGNÓSTICO. A partir de una cepa pura, se tomaron de 3-4 colonias de un cultivo fresco (18-24 horas) y se inoculó en 4.5mL de medio de cultivo estéril se midió la concentración de células equivalentes en la escala McFarland. Se consultó la tabla de diluciones para determinar el volumen en microlitros que se agregará a otro medio de cultivo estéril. Se agitó para homogeneizar. A partir de esta solución se distribuyeron 0.2mL en la tira para antibiograma, en los pocillos correspondientes al control positivo y en los pocillos que contienen los discos de antibióticos. Se dispensaron, en el segundo pocillo destinado al control negativo la misma cantidad de medio de cultivo estéril. Se selló la tira nuevamente y se incubó junto con la dilución residual a 37°C durante 4 horas. Pasado este tiempo se extrajo de la incubadora la dilución residual comprobando en el calibrador de inóculos si el cultivo alcanzó valores iguales a 0.7 unidades. Al alcanzar este valor se retiraron la tiras de la incubadora y se realizó la lectura en DIRAMIC, basada en la detección de las modificaciones turbidimétricas que genera el crecimiento microbiano en el medio de cultivo en presencia de antibióticos para determinar el carácter de drogo/sensibilidad o drogo/resistencia de un microorganismo. Los discos de antimicrobianos y sus claves se muestran a continuación:

Antimicrobiano	Clave	Antimicrob.	Clave
Penicilina	P	Amikacina	AK
Ampicillin	AMP	Gentamicina	G
Oxacilina	OX	Ciprofloxac.	CIP
Cefazolina	KZ	Norfloxacino	NOR
Kanamicina	K	Ceftriaxona	CRO
Tetraciclina	T	Cefotaxima	CTX
Eritromicina	E	Ceftazidima	CAZ
Cloranfenicol	C	Vancomicina	V

Sulfaprim	SXT	Imipene	IMP
Azlocillina	AZL		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La susceptibilidad antimicrobiana se mide por métodos cualitativos y cuantitativos, estos últimos se prefieren a los primeros. Existen

varios procedimientos para la determinación cuantitativa de la sensibilidad antimicrobiana que pueden ser por dilución o difusión en agar. En nuestro estudio empleamos el método automatizado DIRAMIC, el cual fue descrito en Métodos.

En la tabla 1 se muestran los resultados del estudio de las cepas de *S. aureus* frente a los antimicrobianos probados, observando que los más efectivos fueron Norfloxacino, Azlocillina y Vancomicina con 90.5, 86.4 y 83.7% de todas las cepas sensibles. La sensibilidad encontrada frente a estos fármacos demuestra la efectividad de estos medicamentos, ya que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular (síntesis del péptido glucano a nivel de la pared).

La Penicilina y la Cefazolina solo fueron efectivos frente a un 41.8 y 36.4% de las cepas estudiadas. Ubicándose como drogas poco efectivas para el tratamiento de infecciones producidas por esta especie. La elevada resistencia encontrada ante estos antibióticos y otros como Ampicilina, Kanamicina, Tetraciclina y Sulfaprim pudiera estar en relación con el amplio uso que se les da en el tratamiento de diversas sepsis humanas, incluidas las ocasionadas por *S. aureus*.

En la tabla 3 presentamos el análisis de la resistencia encontrada en las cepas por antimicrobianos solos o en combinación con otros, donde en ninguna cepa se obtuvo una total sensibilidad a los 19 antibióticos utilizados en el estudio. Obtuvimos el hallazgo de 11 cepas resistentes frente a 5 drogas y 14 cepas resistentes ante 6 antimicrobianos. Cabe señalar que se obtuvieron 5 cepas resistentes a más de 10 antimicrobianos, todos estos resultados implican una alta multiresistencia.

De todos los resultados mostrados en la tabla 2 es evidente que 54 cepas presentaron una multiresistencia importante frente a 5 antibióticos o más para un 72%. 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 la diseminación y evitar los brotes de infecciones nosocomiales. Otros autores en diferentes países han llamado la atención sobre este aspecto al encontrar resultados similares. 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(11,12).

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 péptido glucano de la pared bacteriana); 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. La presencia de 5 cepas (6.7%) con estas características en este trabajo no constituye un buen pronóstico y nos alerta ante la necesidad de ser cuidadosos a la hora de instalar un tratamiento antimicrobiano, tanto a la hora de elegirlo como a la de decidir la dosis y duración del mismo.

Tabla 1. Resultados del estudio de la susceptibilidad antibacteriana de las cepas de *S. aureus* frente a los antimicrobianos probados.

Antimicrobianos	Cepas Resistentes	%	Cepas con sensibilidad intermedia.	%	Cepas Sensibles.	%
-----------------	-------------------	---	------------------------------------	---	------------------	---

V	5	6.7	1	1.35	68	91.8
NOR	3	4.05	4	5.40	67	90.5
AZL	8	10.8	2	2.70	64	86.5
CAZ	12	16.2	1	1.35	61	82.4
CIP	10	13.5	4	5.40	60	81.1
C	10	13.5	4	5.40	60	81.1
IMP	7	9.45	8	10.8	59	79.7
E	14	18.9	1	1.35	59	79.7
AK	5	6.75	11	14.8	58	78.4
CRO	13	17.5	3	4.05	58	78.4
CTX	11	14.8	6	8.10	57	77.0
OX	19	25.6	2	2.70	53	71.6
G	19	25.6	9	12.2	46	62.2
S	23	31.0	10	13.5	41	55.4
T	29	39.2	6	8.10	39	52.7
K	33	44.6	5	6.75	36	48.6
AMP	36	48.6	6	8.10	32	43.2
P	37	50.0	6	8.10	31	41.9
KZ	45	60.8	2	2.70	27	36.5

Tabla 2. Resultados del análisis de la resistencia encontrada en las cepas por antimicrobianos solo o en combinación con otros.

No. antimicrobianos	de	Cepas Resistentes	%	No. antimicrobianos	de	Cepas Resistentes	%
1		2	2.70	7		6	8.10
2		10	13.5	8		11	14.9
3		5	6.75	9		4	5.40
4		3	4.05	10		3	4.05
5		11	14.8	+ 10		5	6.75
6		14	18.9				

Con los resultados obtenidos en este trabajo demostramos que el problema de la resistencia bacteriana ante los diferentes antimicrobianos, es una preocupante situación a tener en cuenta en nuestros medios hospitalarios, no solo a la hora de confeccionar los "mapas epidemiológicos", sino en el momento de trazar la política de antibióticos a seguir por cada centro. Además de mantener una estricta vigilancia para la detección temprana de posibles brotes de infecciones nosocomiales. No obstante sería conveniente realizar estudios similares a este con otros gérmenes y un mayor número de cepas en otras unidades hospitalarias.

ABSTRACT

Seventy-four circulating strains of staphylococcus aureus of clinical origin have been characterized due to their drug sensitivity against 19 antimicrobial agents by the automated method DIRAMIC. None of the strains was totally sensitive to all the antimicrobial proven/tested. The most effective ones were norfloxacin, azlocillin and vancomycin for as much as 90.5, 86.4 and 83.7% of sensitivity respectively. The least effective were penicillin and cefazolin with poor results as low as 41.8% and 36.4% of efficacy. Seventy-two per cent of the strains under study have been shown to have resistance to 5 or more of the antibiotics used, this datum has proven an increased multi-resistance. The detection of five resistant strains resulted in a significant finding when facing this type of germ.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Trilla A. Epidemiology of nosocomial infections in adults intensive care units. *Intensive Care Med Suppl* 1999; 3: 51-4.
2. Noble WC. Antibiotic resistance in the staphylococci. *Sci Prog* 1997; 80:5.
3. Martínez Izquierdo AM, Pérez Amarillo JM. Estafilococos. EN: Llop Hernández A, Valdéz-Dapena vivanco MM, Zuazo Silva JL. *Microbiología y parasitología médicas*. T.!. Ciudad de la Habana: ECIMED; 2001. p: 153-63.
4. Angeles M. Spread and maintenance of a dominant methicillin resistant. *Staphylococcus aureus* (MRSA) clon during an outbreak of MRSA disease in a Spanish Hospital. *J Clin Microbiol* 1999; 32: 2081.
5. Boyce JM. Methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus*: a continuing infection control challenge. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 13: 45-9.
6. Kloos W, Bannerman T, *Staphylococcus* and *Micrococcus*. En: Murray P, baron E, Pfaller M, Tenovar F, Tenover F, Tenover R, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed. Washington: ASM; 1996.
7. Cuba. Ministerio de Salud Pública. División de Microbiología. *Manual de Usuario. Sistema DIRAMIC*. La Habana: MINSAP; s.a.
8. Michel M, Gutman L. Methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: Therapeutic realities and possibilities. *Lancet* 1997; 349: 1901-16.
9. Fish PN, Piscitelli SC, Dazinger LH. Developmente of resistance during antimicrobial therapy: a review of antibiotic classes and patients characteristics in 173 studies. *Pharmacotherapy* 1995; 15(3): 279-91.
10. Todd J. Infecciones estafilocóccicas. En: Berman RE, Kliegman RM, Harbin AM, Nelson WE, eds.. *Nelson. Tratado de Pediatría*. 15 ed. La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 1998, 933-40.
11. Flores P, Gordon S. Vancomycin-resistance *Staphylococcus aureus*: an emerging public health treat. *Clev Clin J Med* 1997; 67(10): 527-32.