

Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* sensible, con sensibilidad "BORDERLINE" y resistentes a la meticilina.

MENDOZA TICONA Carlos Alberto *, VELASQUEZ TALAVERA Renato **, MERCADO DIAZ Ludwig **, BALLON ECHEGARAY Jorge **, MAGUIÑA VARGAS Ciro *** .

SUMMARY

Objective: To determine the susceptibility to different antibacterials of three categories of *S. aureus* according to its susceptibility to methicillin. **Methods:** 76 *S. aureus* strains that colonized patients and health workers were isolated from three Departments at Hospital Honorio Delgado in Arequipa, 36 of which were susceptible to methicillin (MSSA), 15 had borderline susceptibility (BORSA) and 25 were resistant to methicillin (MRSA). They underwent antibiogram for 14 antibacterials. **Results:** The only antibiotic to which all isolates were susceptible was vancomycin. MRSA were resistant to all betalactamics except imipenem that obtained 64% susceptibility. BORSA keep an 80% susceptibility to cephalotin and 100% to imipenem. The antibiotics cephalotin, imipenem, ciprofloxacin, cotrimoxazole, rifampicin, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol, lincomycin and gentamycin had variable susceptibilities ($p < 0.01$) among the three categories, a bigger proportion of MSSA were susceptible to these antibiotics, less for BORSA and lesser for MRSA. The multiresistant strains were more frequent in MRSA than in the other groups ($p < 0.01$). **Conclusions:** There are *S. aureus* strains in our environment with borderline susceptibility to methicillin. There are differences in the susceptibility to any antibacterials among the three groups of *S. aureus*; this differences can lead to a more rational antibacterial therapy. We should apply international recommendations for methicillin resistance detection in every strain isolation. (*Rev. Med. Hered.* 2003; 14: 181-185).

KEY WORDS : *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, borderline susceptibility, antibacterial susceptibility.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la susceptibilidad a diversos antibacterianos de tres categorías de *S. aureus* según su sensibilidad a la meticilina. **Materiales y Métodos:** Se aislaron 76 cepas de *S. aureus* que colonizaban pacientes y personal de salud de tres servicios del Hospital Honorio Delgado de Arequipa, de los cuales 36 fueron sensibles a meticilina (MSSA), 15 con susceptibilidad "borderline" (BORSA) y 25 fueron resistentes a la meticilina (MRSA). Se les sometió a antibiograma a 14 antibacterianos. **Resultados:** El único antibiótico al cual todas las aislamientos fueron sensibles fue vancomicina. Los MRSA fueron resistentes a todos los β -lactámicos excepto imipenem que obtuvo 64% de susceptibilidad. Los BORSA mantuvieron un 80% de sensibilidad a cefalotina y un 100% al imipenem. Los antibióticos cefalotina, imipenem, ciprofloxacina, cotrimoxazol, rifampicina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, lincomicina y gentamicina tuvieron sensibilidades variables ($p < 0.01$) entre las tres categorías; una mayor proporción de MSSA fue sensible a estos antibióticos, luego los BORSA y finalmente los MRSA. Las cepas multi-resistentes fueron mucho más frecuentes en los MRSA que en los otros dos grupos ($p < 0.01$). **Conclusión:** Existe en nuestro medio cepas de *S. aureus* con resistencia "borderline" a meticilina. Hay diferencias entre la sensibilidad a diversos antimicrobianos entre los tres grupos de *S. aureus*. Esta diferenciación podría beneficiar una terapia antimicrobiana

* Médico Residente de Enfermedades Infecciosas y Tropicales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

** Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

*** Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt. Profesor Principal, Dpto. de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad Peruana Cayetano Heredia

más racional. Se debe aplicar en todo aislamiento de *S. aureus* las recomendaciones internacionales para la detección de meticilino resistencia. (*Rev. Med. Hered.* 2003; 14: 181-185).

PALABRAS CLAVE: *Staphylococcus aureus*, meticilino resistencia, susceptibilidad borderline, sensibilidad antimicrobiana.

INTRODUCCION

Recientemente se ha informado entre 50 a 90% de prevalencia de cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina o meticilina (MRSA), en hospitales del Perú (1-6). Sin embargo, no se ha tenido reportes de brotes endémicos por MRSA ni de alta incidencia de fracaso terapéutico para *S. aureus* en estos hospitales. Estas cepas podrían no corresponder a auténticas MRSA, es decir, no poseerían el *gen mec A* que codifica a la proteína fijadora de penicilina 2a (PBP 2a) que posee poca afinidad a las drogas β -lactámicas conservando su función transpeptidasa y carboxipeptidasa para la síntesis del peptidoglicano de la pared celular. (7,8)

Determinar la resistencia a la meticilina es difícil por métodos clínicos. Sin embargo el Comité de Estándares de Laboratorios Clínicos de Estados Unidos ha establecido modificaciones al método de Bauer – Kirby, para lograr una mayor exactitud. Dentro de estas modificaciones se incluye el cultivo en medio Muller – Hinton hipertónico con ClNa al 5%, cultivo a una temperatura de 30°C por 24 horas y a pH neutro; así como la utilización de oxacilina por ser químicamente más estable que la meticilina durante su incubación. (9)

Cuando en 1968 se describió por primera vez esta resistencia, se utilizaba meticilina para evaluar y tratar infecciones por *S. aureus*. Ahora, la meticilina ya no es un agente de elección en el manejo clínico ni para evaluar la susceptibilidad del *S. aureus*. Sin embargo, el acrónimo MRSA es aún usado por la mayoría para describir estos aislamientos debido a rol histórico.

En 1984, Mc Douglas y Thornsberry (10) describieron por primera vez la aparición de cepas de *S. aureus* con susceptibilidad intermedia a las penicilinas penicilinasas resistentes y definieron el concepto de *S. aureus* con susceptibilidad “borderline” o con bajo nivel de resistencia (BORSA). Esta propiedad puede resultar de por lo menos dos categorías de mecanismos biológicos, algunos extrínsecos dependientes de hiperproducción de β -lactamasas, y algunos intrínsecos dependientes de alteraciones de sus PBPs. Los mecanismos extrínsecos son probablemente más comunes entre los aislamientos clínicos de los BORSA.

Por ello, para poder detectarlos en el laboratorio clínico, se recomienda utilizar un disco de amoxicilina - ácido clavulánico para inhibir la sobreproducción de β -lactamasa (9,11).

El propósito de este trabajo es determinar la frecuencia de cepas de *S. aureus* intra hospitalarias sensibles, resistentes y con susceptibilidad “borderline” a la meticilina y comparar su susceptibilidad antimicrobiana a diversas drogas utilizadas frecuentemente en la clínica.

MATERIAL Y METODOS

Entre los meses de agosto de 1999 y enero del 2000, se obtuvieron y procesaron muestras procedentes de ventanas nasales, oro faringe y piel de pacientes y del personal de salud de los servicios de quemados, neonatología y pediatría del Hospital Regional Honorio Delgado de Arequipa.

Una vez obtenidas las muestras con hisopos estériles previamente humedecidos con caldo tripticasa - soya, se transportaron al Laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín, donde fueron sembrados en agar estafilococo (medio hiperosmolar - Difco Laboratories) que contiene un suplemento de cloruro de sodio, a 37 °C, por 24 horas. Posteriormente se consignaron características del cultivo, coloración de Gram y prueba de la coagulasa en tubo con plasma de conejo liofilizado (Difco Laboratories) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Se utilizó dos cepas de *S. aureus* con susceptibilidad y resistencia a la meticilina definidas previamente, para control de resultados. No se pudo disponer de cepas ATCC por su elevado costo.

Se identificaron 76 cepas de *S. aureus* (coagulasa positivos) a las que se sometió a los siguientes ensayos:

1. Determinación de MIC de oxacilina por el método de dilución en agar. Se utilizó agar Muller-Hinton (Difco Laboratories) con 2% de NaCl y oxacilina a las concentraciones de 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 μ g/ml; por un periodo de incubación de 24 horas

a 30°C y pH neutro, considerando como MIC a la primera concentración que inhiba completamente el desarrollo de colonia del *S. aureus*.

2. Determinación de sensibilidad a 16 antimicrobianos por el método de Bauer - Kirby modificado para detección de meticilino-resistencia (medio hiperosmolar en agar Muller-Hinton con 5% de NaCl, pH neutro, temperatura de 30°C, cultivo por 24 horas):
 - 7 drogas β -lactámicas: penicilina, ampicilina, amoxicilina-clavulanato, cefalotina, imipenem, oxacilina y meticilina (Difco Laboratories).
 - 9 drogas no β -lactámicas: vancomicina, ciprofloxacina, cotrimoxazol, rifampicina, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, eritromicina y lincomicina (Difco Laboratories).

De acuerdo a valores aceptados por el NCCLS para los halos de inhibición y MIC a oxacilina se clasificaron las 76 cepas en:

1. *S. aureus* meticilino-sensible (*MSSA*):
Sensible a oxacilina por difusión en disco (halo mayor a 13 mm) y MIC menor o igual a 2 ug/ml
2. *S. aureus* con susceptibilidad borderline (*BORSA*):
Resistente a oxacilina por difusión en disco y MIC mayor a 2 ug/ml.
Sensible a amoxicilina-clavulanato (halo de inhibición mayor o igual a 20 mm)
3. *S. aureus* meticilino-resistente (*MRSA*):
Resistente a oxacilina por difusión en disco y MIC mayor a 2 ug/ml.
Resistente amoxicilina-clavulanato (halo de inhibición menor a 20 mm)
4. *S. aureus* multiresistente: Si presenta por lo menos resistencia a más de 3 tipos de antimicrobianos de diferente mecanismo de acción.

Finalmente se comparó las frecuencias de resistencia a cada droga entre los tres grupos.

Se trabajó en el programa EPI INFO 6.04. Se aplicó la prueba del X^2 y la exacta de Fisher para el análisis

de significancia considerando un valor de $p < 0.05$ como límite.

RESULTADOS

De las 76 cepas de *S. aureus* aislados 36 (47.4%) fueron sensibles a la meticilina, 15 (19.7%) tuvieron susceptibilidad "borderline" y 25 (32.9%) fueron meticilino-resistentes.

En la Tabla N°1 se muestran los valores de la concentración inhibitoria mínima de las tres categorías de *S. aureus*. Los valores de frecuencia de susceptibilidad de los *S. aureus* de las tres categorías de resistencia a la meticilina a 16 drogas antimicrobianas son expresados en la Tabla N°2.

DISCUSION

Se detectó 32.9 % de cepas *MRSA* de un total de 76 cepas. Este valor es menor al encontrado por otros investigadores en el país, así Guerra y col. (1) encontraron 50% de *MRSA* en aislamientos clínicos del Hospital Carrión, Sánchez y col.(2) 59.0% en el Hospital Loayza, Cornejo y col.(3) 71.4% en Hospital Nacional de Arequipa de ESSALUD, Sigua y col.(4) 90% en el Hospital Almenara, Vásquez y Luchetti (5) 85% en el Hospital Rebagliatti y Echevarría y col.(6) hasta 63.3% de resistencia a meticilina en cepas provenientes de cuidados intensivos de 6 hospitales de Lima. El menor valor descrito se debe a la detección de cepas con susceptibilidad "borderline", a las modificaciones culturales que se tuvo en cuenta y principalmente al tipo de selección de muestra ya que detectamos cepas que colonizaban a pacientes y personal de salud y no de aislamientos clínicos.

Se encontró diferencia en la concentración inhibitoria mínima a la oxacilina entre las cepas *BORSA* con las *MRSA*; los *BORSA* presentaron MIC en rango de resistencia baja (mayor de 2 y menor de 8 ug/ml) y los *MRSA* obtuvieron rangos de resistencia elevada (mayor

Tabla N° 1. Distribución de los *Staphylococcus aureus* según la categoría de resistencia a meticilina y Concentración Inhibitoria Mínima a la oxacilina.

TIPO	C.I.M. DE LA OXACILINA (ug/ml)								TOTAL
	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0	32		
• MSSA	8	16	12	0	0	0	0	36	
• BORSA	0	0	0	10	4	1	0	15	
• MRSA	0	0	0	0	0	3	22	25	
TOTAL	8	16	12	10	4	4	22	76	

Tabla N° 2. Susceptibilidad antimicrobiana de los tres grupos de *S. aureus*.

ANTIMICROBIANO	MSSA		BORSA		MRSA		Valor de p (*)
	N°	%	N°	%	N°	%	
Oxacilina	36	100.0	0	0.0	0	0.0	0.0000
Amox-ac. clav	35	97.2	15	100.0	0	0.0	0.0000
Meticilina	35	97.2	0	0.0	0	0.0	0.0000
Penicilina	05	13.8	0	0.0	0	0.0	0.0510
Ampicilina	01	2.7	0	0.0	0	0.0	0.5695
Cefalotina	33	91.6	12	80.0	0	0.0	0.0000
Imipenem	36	100.0	15	100.0	16	64.0	0.0000
Vancomicina	36	100.0	15	100.0	25	100.0	1.0000
Ciprofloxacina	34	94.4	13	86.7	11	44.0	0.0001
Cotrimoxazol	35	97.2	11	73.3	13	52.0	0.0002
Rifampicina	34	94.4	11	73.3	07	28.0	0.0000
Eritromicina	32	88.8	13	86.7	05	20.0	0.0000
Tetraciclina	33	91.6	09	60.0	05	20.0	0.0000
Cloranfenicol	29	80.5	11	73.3	08	32.0	0.0004
Lincomicina	26	72.2	8	53.3	08	32.0	0.0079
Gentamicina	25	69.4	0	0.0	0	0.0	0.0000

de 16 ug/ml); esta diferencia encontrada fue altamente significativa y cumple con lo que se describe en la literatura (15). Los MSSA por definición operacional del trabajo tuvieron MIC a la oxacilina igual o menor a 2 ug/ml.

Con excepción de la penicilina, ampicilina y vancomicina; todos los demás antimicrobianos presentan diferencia estadísticamente significativa entre cada categoría de *S. aureus* con respecto a sus susceptibilidad a la meticilina, siendo más sensibles los MSSA que los BORSA, y estos más que los MRSA.

En cuanto a la susceptibilidad a β -lactámicas es importante destacar el alto porcentaje de sensibilidad alcanzado por el imipenem, tanto en los MSSA, BORSA e incluso el MRSA. En la década de los ochentas se describió que imipenem era activo in vitro contra cepas de MRSA, aunque tales cepas fueron mucho menos sensibles que las cepas de *S. aureus* meticilino-sensible. Sin embargo esta droga induce resistencia intrínseca en algunas cepas de MRSA que originalmente parecían ser sensibles. En el Hospital Regional Honorio Delgado el imipenem se ha utilizado poco en los servicios estudiados, por lo que creemos que nuestros resultados son similares a los encontrados en años anteriores (13). Se deja claro el concepto de que todo *S. aureus* catalogado como MRSA es resistente a todas las drogas β -lactámicas incluidos los carbapenems.

En los BORSA, el imipenem podría ser aún, una alternativa terapéutica, dada su alta sensibilidad (100%) en nuestra serie. Este resultado concuerda con el

estudio de Zelaya y col.(14) en 1996, quienes encontraron hasta 94.6% de sensibilidad a imipenem en cepas de *S. aureus* aisladas de fosas nasales y 92.8% en aislamientos de manos del personal de salud de un hospital de Ica. Sería de utilidad la diferenciación de este tipo de resistencia del *S. aureus* en todos los aislamientos clínicos. Esta propuesta tiene que ser validada con ensayos clínicos.

Encontramos diferencia en la sensibilidad entre las cepas BORSA y MRSA, siendo las primeras más sensibles a casi todos los antimicrobianos ensayados. La sensibilidad fue igual para ambas categorías sólo en los casos de gentamicina, con sensibilidad nula, y vancomicina, con 100% de sensibilidad. En los MRSA, además de vancomicina, sólo imipenem logró una susceptibilidad mayor del 50%. Otros antimicrobianos considerados como de segunda línea después de glucopeptidos, como ciprofloxacina, cotrimoxazol, rifampicina, lincomicina y gentamicina, tuvieron sensibilidades menores de 50%. Esto no se dio en los BORSA.

La totalidad de los MRSA fueron multi-resistentes, mientras que sólo lo fueron el 53% de los BORSA y el 11% de los MSSA. El locus *mec*, que alberga el gen *mec A*, posee regiones donde puede anclar transposones que codifican para la resistencia de otros antimicrobianos, como los BORSA por concepto no lo poseen, no desarrollarían tal multirresistencia por este mecanismo (15,16). Fue precisamente en los MRSA que se desarrolló la resistencia intermedia a vancomicina (VISA) en Japón y Estados Unidos (16,17).

Nuestros resultados apoyan la necesidad de categorizar a los *S. aureus* aislados según su resistencia a meticilina (oxacilina) para lograr un manejo terapéutico más acertado, ya que se podría ahorrar recursos utilizando medicamentos más accesibles para tratar un MSSA o un *BORSA* y propiciar un uso más racional de antibióticos.

Recomendamos el uso de las condiciones de cultivo utilizadas en el presente estudio para la detección de meticilino resistencia en el *S. aureus*.

Correspondencia:

Alberto Mendoza Ticona,
Jn Ricardo Palma 576 Urb. Ingeniería
San Martín de Porres
Lima, Perú
Teléfono: 381-8979

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Guerra J, Sánchez I, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina en el Hospital Carrión. Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales-SPEIT 1997;6:40.
- Sánchez H, Carrillo L, Quispe V, Godoy A. Resistencia antibiótica de estafilococos en el Hospital Arzobispo Loayza de Lima, Perú. Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales 1998;5:9-10.
- Cornejo M, Azpilcueta, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina en el servicio de medicina interna del HNSA. Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales-SPEIT 1995;4:66.
- Siguas A, Salazar N, et al. Susceptibilidad del *Staphylococcus* en un servicio de medicina. Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales-SPEIT 1997;6:41.
- Vásquez H, Luchetti A. Sensibilidad del *Staphylococcus aureus* en cultivos de heridas, esputo y úlceras, HNERM, 1997. Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales-SPEIT 1997;6:43.
- Echevarria JE, Ore L, Zerpa R, Campana C, Quispe V, Tamariz J, Prada A, Guerra H, Casas J. Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus* strains, in Hospitalized patients and susceptibility to Teicoplanin in Lima Peru. 20th International Congress of Chemotherapy. Sidney- Australia. Junio 1997. International Society of Chemotherapy.
- Moreira B, Daum R. Antimicrobial Resistance in *Staphylococci* - Antimicrobial Resistance in Pediatrics. Pediatrics Clinics of North America; 1995;42:619-43
- Chambers HF. Methicillin Resistance in *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. Clinical Microbiology Reviews 1997;10:781- 791.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS approved standard M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 1999.
- Mc Douglas L, Thornsberry C. New recommendations for disk diffusion antimicrobial susceptibility test for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. J Clin Microbiol 1984; 19: 482-488.
- Massidda O, Montanari M, Mingoia M, Varaldo P. Borderline Methicilli-Susceptible *Staphylococcus aureus* strains havemore in common than reduced suscetibility to penicillinase-resistant penicillins. Antimicrob. Agents Chemoter 1996;40:2769-2774.
- Lowy F. *Staphylococcus aureus* Infections. The New England Journal of Medicine 1998; 339:520-532.
- Brumfitt W, Hamilton Miller J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 1989; 320:1188-1196.
- Zelaya L, Zelaya JL, Miranda U, Guillermo J y Hernández D. Portadores nasales de *Staphylococcus aureus* y sensibilidad a los antimicrobianos. Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales 2001;1:16-20.
- Montanari MP, Tonin E, et al. Further characterization of borderline methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and anallysis of penicillin binding proteins. Antimicrob Agents Chemoter 1990;34:911-913.
- Gutman M. Methicillin-resistant *S. aureus* and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. Lancet 1997; 349: 1901-06
- Smith T, Pearson M, Wilcox K, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. The New England Journal of Medicine 1999; 340(7):493-501.
- Sieradzki K, Roberts R, Haber S, et al. The Development of Vancomycin Resistance in a Patient with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. The New England Journal of Medicine 1999; 340:517-523.