



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A

EFFECTO DE INHIBIDORES DE BETA-LACTAMASAS
SOBRE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA
DE AMPICILINA Y AMOXICILINA PARA CEPAS DE
Staphylococcus aureus.

BO 1294/97
E:3

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA DEL PILAR RIVERA OSORIO

DIRECTORA DE TESIS: QFB GLORIA LUZ PANIAGUA C.

LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEX.

FEBRERO 1997





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi maravillosa y amada madre JULIA, por haber hecho posible lo que soy y agradeciéndole todo el apoyo y cariño brindados para poder hacer realidad uno de mis sueños.

A mis hijas JOCELYNE ZOE Y VANIA ZULEICA. Los amores de mi vida, mi orgullo y motivo de superación.

A mi querido esposo MARTIN:

Ese ser que con su apoyo y comprensión, me ayudó a alcanzar un triunfo que considero es de ambos.

Es una realización más, que compartimos juntos. MIL GRACIAS.

A mis hermanos:

ARISTEO
JESUS
REYNA
MAYRA
JAZMIN

Quienes siempre me han brindado su apoyo y cariño, confiando en que algún día culminara mi carrera profesional. Gracias a cada uno.

A mis compañeros: Eric, Alberto, Oscar, Edgar y Amanda. Por compartir conmigo mis tristezas y alegrías. Los quiero.

A mis amigos y aquellas personas que me motivaron a seguir adelante hasta alcanzar mi objetivo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora:

QFB. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS.

Por su apoyo y la confianza que depositó en mí para la elaboración de este trabajo, brindándome la portunidad de aprender con mayor amplitud el campo profesional de los análisis clínicos.

Al M en C SERGIO VACA PACHECO por las facilidades, apoyo y sobre todo por sus atinadas sugerencias que contribuyeron a mejorar el trabajo.

IN MEMORIAM A:

La persona que supo brindar cariño sincero a mi
hija: MI PADRE.

Mi querida amiga LUPITA.

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Características de <i>S. aureus</i>	2
Determinantes de patogenicidad	3
Resistencia a antibióticos β -lactámicos	6
DETECCIÓN DE β -LACTAMASAS	11
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
Origen de las cepas	14
Resistencia a antibióticos	14
Determinación de la CMI	15
RESULTADOS	16
Origen de las cepas	16
Resistencia a antibióticos	16
Multirresistencia a antibióticos	20
Producción de β -lactamasas	22
CMI de β -lactámicos con y sin inhibidor de β -lactamasas	22
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFIA	32

RESUMEN

En este trabajo se analizaron 70 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes que acudieron al laboratorio de Análisis Clínicos "El eritrocito". El 80% de las cepas se aislaron de la nasofaringe, 16% de vías urinarias y el resto de infecciones cutánea (1 cepa) y oculares (2 cepas).

Las cepas se identificaron por morfología colonial y microscópica y mediante pruebas bioquímicas. La susceptibilidad a antibióticos se determinó por el método de Kirby-Bauer, obteniendo los siguientes resultados: Todas las cepas fueron resistentes a los β -lactámicos penicilina y ampicilina; un poco más del 80% fueron resistentes a ceftazidima y cerca del 70% a eritromicina. Alrededor del 13% fueron resistentes a dicloxacilina y pefloxacina. Sólo 4.3% de las cepas fueron resistentes a cefuroxima y cefotaxima, la frecuencia de cepas resistentes a gentamicina fue muy baja (2.8%) y todas las cepas fueron sensibles a cefalotina. El 1.4% de las cepas mostraron multirresistencia a 9 antibióticos; los porcentajes mayores de cepas multirresistentes correspondieron a tetra-resistentes (31.4%), tri-resistentes (27.1%), penta-resistentes (21.4%), sexta-resistentes (12.9%), hepta-resistentes (5.9%) y nona-resistentes (1.4%). No se encontraron cepas resistentes a 8 antibióticos.

El 95.7% de las cepas de *S. aureus* produjeron β -lactamasa, y los inhibidores de β -lactamasas, ácido clavulánico y sulbactam, disminuyeron 8 veces las CMI₅₀ y CMI₉₀ de amoxicilina y ampicilina sobre la población de cepas estudiada. Las tres cepas no productoras de β -lactamasa (4.3%) mostraron una CMI idéntica ante estos β -lactámicos con y sin inhibidor de β -lactamasa.

Los datos presentados aquí muestran que *S. aureus* es una causa cada vez más frecuente de infecciones respiratorias y que las cepas son resistentes a los antibióticos considerados tradicionalmente como "de elección", especialmente a penicilina y ampicilina. Nuestros datos muestran también que todas las cepas estudiadas fueron multirresistentes y que de las dos estrategias utilizadas para combatir a las cepas productoras de β -lactamasas, la introducción de cefalosporinas fue menos eficaz que la combinación de β -lactámico + inhibidor de β -lactamasa.

INTRODUCCION.

Características de *S. aureus*

Los *Staphylococcus aureus* son cocos Gram positivos cuyo diámetro oscila entre 0.7 y 1.2 μm ; son aerobios facultativos, no móviles, fermentan la glucosa y forman parte de la flora normal de la piel y las membranas mucosas de los mamíferos. En medios de cultivo sólidos forman colonias opacas, redondas, regulares convexas y de color amarillo dorado debido a la producción de carotenoides. *S. aureus* crece en medios ricos en un amplio intervalo de pH (4.8-9.4) y temperatura (25-43°C) con un tiempo de duplicación mínimo de 30-40 min con aireación vigorosa. En condiciones aeróbicas produce catalasa y forma ácido a partir de glucosa, manitol, xilosa, lactosa, sacarosa maltosa y glicerol. *S. aureus* es la única especie del género *Staphylococcus* que fermenta al manitol en condiciones anaeróbicas. Posee una alta tolerancia a la sal y puede enriquecerse selectivamente en medios con 1.3 a 1.7 M de NaCl. (Novick, R. 1993).

Determinantes de patogenicidad

S. aureus produce varios factores de superficie y exoproteínas que han sido relacionados con su patogenicidad; algunas de las cepas producen **cápsula**, compuesta por ácido glucosaminurónico (Smith, R.M., *et al.*, 1977). Prácticamente todas las cepas de *S. aureus* poseen una proteína membranal de 42 kDa, denominada **proteína A**, que interacciona inespecíficamente con las inmunoglobulinas de todos los mamíferos produciendo anafilaxis, activación del complemento, liberación de histamina, mitogenicidad en los linfocitos B e inhibición de la fagocitosis. Se ha demostrado que la proteína A contribuye a la virulencia de *S. aureus* (Foster, T.J., *et al.*, 1990). Como otras bacterias, *S. aureus* posee proteínas de superficie específicas (**adhesinas**) que le permiten adherirse a proteínas de matriz (laminina, fibronectina y colágena) y a superficies del hospedero, facilitándole la colonización de la matriz intracelular y la invasión de las células (Wadstrom, T., J. *et al.*, 1990; Lindberg, M., *et al.*, 1990).

Entre las exoproteínas producidas por *S. aureus* se encuentran algunas toxinas, otras que atacan la matriz intercelular y otras que dañan a las células directamente. La mayoría de las cepas produce **coagulasa**, la cual convierte el fibrinógeno a fibrina en el plasma de muchas especies animales.

La **estafilocinasa** disuelve el coágulo al activar la conversión de la proenzima plasminógeno a la enzima fibrinolítica plasmina, el gen que la codifica reside en un profago (Sako, T. *et al.*, 1983). *S. aureus* produce también una **nucleasa** con actividad de endo y exonucleasa sobre DNA y RNA; una **lipasa** relacionada con la sobrevivencia de la bacteria sobre la piel. Asimismo, la mayoría de las cepas produce una o varias **proteasas**.

S. aureus produce 4 **hemolisinas** que difieren en su especie especificidad contra eritrocitos. La α -hemolisina (α -toxina) es activa contra eritrocitos de conejo; se excreta como un monómero de 34 kDa que, al contacto con su receptor en la membrana (una sialoglicoproteína), forma un hexámero cilíndrico -cuya estructura es similar al complejo de ataque a la membrana (MAC) del complemento-, que penetra la membrana (Bhakdi, S. & J. Tranum-Jensen, 1984). La β -hemolisina es una proteína de 30 kDa que sólo es producida por 10-20% de las cepas clínicas de *S. aureus*, es activa sobre eritrocitos de carnero, humanos y de cobayo; rompe la esfingomielina originando N-acilesfingosina y fosforilcolina. La γ -hemolisina está formada por dos proteínas básicas, actúa sobre glóbulos rojos de conejo, humanos y de carnero. La δ -hemolisina se secreta como un polipéptido de 26 aminoácidos (Fitton, J.E. *et al.*, 1980), y se encuentra como un agregado

heterogéneo con subunidades de 5 kDa; no muestra especificidad de especie y actúa sobre varios tipos celulares: eritrocitos, leucocitos, células de mamífero cultivadas y protoplastos bacterianos; es producida por la mayoría de las cepas clínicas de *S. aureus*.

S. aureus produce también varias exotoxinas, entre las cuales se encuentra la **exfoliatina** (toxina epidermolítica), causante de lesiones dermatológicas, producida por aproximadamente 5% de las cepas y cuyo PM es 24 kDa. Esta toxina se presenta como dos variantes antigénicas, ETB codificada por un plásmido y ETA de origen cromosómico (Wiley, B.B. & M. Rogolsky, 1977). La mayoría de las cepas de *S. aureus* produce la **leucocidina** de Panton-Valentine, que lisa sólo a los polimorfonucleares y macrófagos humanos y de conejo. Las cepas de *S. aureus* sintetizan una serie de **exotoxinas pirogénicas** con actividad inmunosupresora debido a que son mitogénicas para los linfocitos T supresores. En este grupo se encuentran las exotoxinas pirogénicas A y B, los cinco serotipos distintos de enterotoxinas estafilococcicas y la toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1). Alrededor del 50% de las cepas de *S. aureus* producen una o más enterotoxinas, 15% producen TSST-1 y una pequeña fracción produce exotoxina pirogénica A o B (Novick, R. 1993).

Resistencia a antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos inhiben enzimas que participan en la biosíntesis de la pared celular y en la división celular. Se unen a proteínas de la membrana citoplásmica bacteriana (PBPs, por penicillin binding proteins). Las bacterias Gram negativas son intrínsecamente resistentes a muchos β -lactámicos debido en parte a la incapacidad de los antibióticos para difundir a través de los poros de la membrana externa (Chopra, I. & P.R. Ball. 1982) y, en parte, a niveles bajos de β -lactamasa codificada en el cromosoma (Ohmori, H. *et al.*, 1977; Curtiss, N.A.C. *et al.*, 1981). La resistencia a los β -lactámicos adquirida por las cepas clínicas puede deberse a β -lactamasas codificadas por plásmidos o a mutaciones cromosómicas que alteran la cantidad o afinidad de las PBPs, o (en las bacterias Gram negativas) a mutaciones que aumentan la impermeabilidad de la membrana externa (Godfrey, A.J. & L.E. Bryan. 1982; Harder, K.J. *et al.*, 1981; Komatsu, Y. *et al.*, 1981). Se han descrito mutaciones que alteran las PBPs confiriéndole a *S. aureus* resistencia a cefradina (Georgopapadakou, N.H. *et al.*, 1982). Un posible mecanismo adicional de resistencia a las cefalosporinas insensibles a β -lactamasa se debe a la capacidad de la enzima

periplásmica de unirse al antibiótico, impidiéndole alcanzar su blanco (Then, R.L. & P. Angehrn, 1982).

La resistencia a penicilina debida a la producción de β -lactamasa en *S. aureus* apareció a principios de los años 1950, seguida rápidamente por resistencia a otros antibióticos (macrólidos, aminoglucósidos y tetraciclina). Es probable que los genes responsables de estas resistencias estuviesen presentes en las poblaciones de estafilococos y otras bacterias desde antes del uso masivo de los antibióticos, lo que explicaría la rapidez con la que prevalecieron los microorganismos resistentes. Por ejemplo, del 5 al 10% de las cepas de *S. aureus* almacenadas en la era pre-antibiótica son resistentes a penicilina debido a que producen β -lactamasa (Novick, R. 1993). La introducción de compuestos derivados de penicilina resistentes a β -lactamasa, como meticilina, en 1960 fue seguida rápidamente por la emergencia de cepas resistentes, principalmente en los hospitales. La resistencia a meticilina se debe, probablemente, a la proteína PBP2a que tiene una afinidad extremadamente baja por los compuestos β -lactámicos (Hartman, B.J. & A. Tomasz, 1984; Fasola, E.L. *et al.*, 1995).

La mayoría de las cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina lo son por que producen β -lactamasas, usualmente codificadas por plásmidos. Se

han descrito cuatro variantes de penicilinasa en *S. aureus* (A a D) (Richmond, M.H., 1965). Las enzimas son, predominantemente, penicilinasas; hidrolizan rápidamente a la bencilpenicilina y la ampicilina, pero muy poco a la meticilina, oxacilina y cloxacilina. Con excepción de la enzima de tipo D, cuya expresión es constitutiva, (Rosdahl, V.T., 1973), todas son inducibles y la mayoría de su actividad es extracelular (Richmond, M.H. 1965).

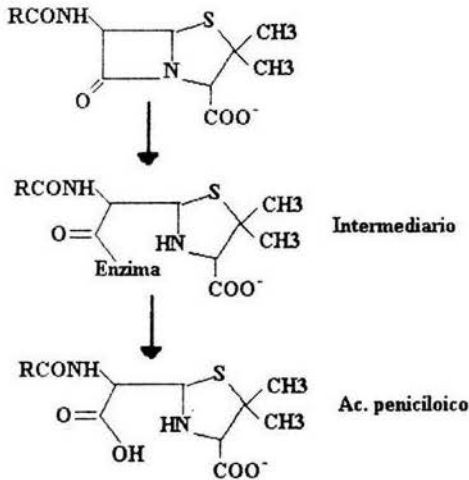
Se asume que las 4 penicilinasas detectadas en cepas de *S. aureus* son muy similares y difieren sólomente en pocos aminoácidos, lo que conduce a tasas de hidrólisis distintas (Dyke, K.H.G., 1979).

Tasas de hidrólisis relativa de antibióticos β -lactámicos por β -lactamasas de *Staphylococcus aureus*.

β -lactamasa	Bencilpenicilina	Ampicilina	Oxacilina	Meticilina	Cefaloridina
A	100	185	4.5	1.5	10
B	100	185	4.5	1.5	10
C	100	-	1	0.6	-

En *S. aureus* se ha descrito un transposón que codifica para una β -lactamasa. Este elemento genético móvil, designado Tn552, está constituido por 6700 pares de bases y se encuentra tanto en plásmidos como en el cromosoma (Rowland, S.J. & K.G. Dyke, 1989).

El mecanismo de hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos por las β -lactamasas consiste en la formación de un intermediario acil-enzima con la subsecuente liberación de ácido penicilinoico:



Para lidiar con las cepas bacterianas productoras de β -lactamasas se han seguido dos estrategias: i) Incorporación de inhibidores de β -lactamasas en las formas farmacéuticas de antibióticos β -lactámicos, particularmente combinaciones de ampicilina + sulbactam o amoxicilina + ácido clavulánico. ii) Síntesis de β -lactámicos resistentes a la acción de β -lactamasas (cefalosporinas).

Actualmente existen antimicrobianos resistentes a las β -lactamasas. Un grupo incluye las penicilinas semisintéticas meticilina, oxacilina, nafcilina y otras, que son resistentes a las penicilinasas producidas por *S. aureus* (Richmond, M.H. 1979). También se han desarrollado las cefalosporinas, cuyo grado de resistencia a β -lactamasas es variable; éstas incluyen a las cefalosporinas de segunda generación (cefexitina, cefamandol y cefuroxima) y a las de tercera generación (cefotaxima, moxolactam, cefoperazona y otras).

La utilización de β -lactámicos insensibles a las β -lactamasas, y de combinaciones de β -lactámico + inhibidor de β -lactamasas constituyen un factor de selección a favor de bacterias productoras de β -lactamasas presentes en nuevas cepas, expresadas a niveles más altos, codificadas por plásmidos, y con propiedades catalíticas alteradas, de tal forma que posean mayor afinidad por sustratos considerados no hidrolizables, o con afinidad reducida por los inhibidores de β -lactamasas (Jacoby, G.A., 1994). Así, se ha reportado que las β -lactamasas tradicionales codificadas por plásmidos, restringidas inicialmente a las enterobacterias, se han diseminado a otros géneros y especies, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*. Éstas enzimas son capaces de

hidrolizar a las cefalosporinas de segunda y tercera generación y, por supuesto, a los viejos antibióticos β -lactámicos; de modo que las cepas que las producen son resistentes a prácticamente todos los β -lactámicos, con excepción de los carbapenems (Garau, J. 1994). No obstante, aparentemente no ha ocurrido aún un incremento en la producción de β -lactamasas resistentes a inhibidores, toda vez que en una revisión de 1500 artículos publicados sobre este tópico entre 1978 y 1993 se encontró que si bien aumentó la frecuencia de cepas productoras de β -lactamasa resistentes a ampicilina y amoxicilina, no hay evidencia, publicada en este período, de que se haya incrementado la resistencia a la combinación amoxicilina + clavulánico (Rolinson, G.N. 1994).

DETECCIÓN DE β -LACTAMASAS

La detección de β -lactamasas en enterobacterias tiene muy poco valor predictivo acerca de la posible resistencia o sensibilidad a los diferentes antibióticos β -lactámicos debido a que, incluso una misma cepa puede producir varias β -lactamasas con distintas especificidades de sustrato (Sykes, R.B. & M. Mathew, 1976). Sin embargo, en otras bacterias resistentes a penicilina, por ejemplo *Neisseria gonorrhoeae* (Ashford, W.A. et al., 1976), *S. aureus* (Adam, A.P. et al., 1970), *Moraxella (Branhamella)*

catarrhalis (Malmvall, B.E. *et al.*, 1977) y cepas de *Haemophilus influenzae* (Skinner, A. & R. Wise, 1977), las cepas sólo producen una β -lactamasa y, por ello, la determinación de la actividad enzimática permite hacer una predicción sobre la sensibilidad o resistencia a los β -lactámicos al menos 24 horas antes de tener los resultados del antibiograma.

OBJETIVOS

- Determinar la resistencia a antibióticos, por el método de Kirby Bauer, a 70 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes que acudieron al Laboratorio Clínico “El eritrocito”.
- Determinar la producción de β -lactamasa por las cepas de *S. aureus*, mediante la producción de color por hidrólisis de un β -lactámico cromogénico.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ampicilina y amoxicilina para las cepas de *S. aureus* por el método de dilución en placa.
- Cuantificar el efecto de los inhibidores de β -lactamasas sulbactam y ácido clavulánico sobre la CMI de ampicilina y amoxicilina, respectivamente, sobre las cepas de *S. aureus*, mediante dilución en placa.

MATERIAL Y METODOS

1. Origen de las cepas. Las cepas de *Staphylococcus aureus* se aislaron de pacientes que acudieron al Laboratorio Clínico "El eritrocito". Se identificaron por morfología colonial y microscópica y por ser positivos a la prueba de la coagulasa.

2. Resistencia a antibióticos. La resistencia a los siguientes 12 antibióticos se determinó por el método de Kirby-Bauer (Bauer, A.W. *et al.*, 1966).

Tabla 1.
ANTIBIOTICOS UTILIZADOS CONTRA LAS CEPAS DE *S. aureus*

ANTIBIÓTICO	ABREV	FAMILIA	ACCIÓN ^a	DIAM. HALO DE INH. (mm) ^b		
				R	I	S
Ampicilina	AMP	Aminopenicilina	1	< 28		> 29
Cefalotina	CF	Cefalosporina de 1a. generación	1	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima	CTX	Cefalosporina de 3a. generación	1	≤ 14	15-22	≥ 23
Ceftazidima	CAZ	Cefalosporina de 3a. generación	1	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefuroxima	CXM	Cefalosporina de 2a. generación	1	≤ 14	15-17	≥ 18
Dicloxacilina	CLOX	Penicilina semisintética	1	≤ 10	11-12	≥ 13
Eritromicina	ERI	Macrólido	3	≤ 13	14-17	≥ 18
Gentamicina	GEN	Aminoglucósido	3	≤ 12	13-14	≥ 15
Pefloxacina	PEF	Quinolona	4	≤ 14	15-22	≥ 23
Penicilina	PEN	Penicilina	1	≤ 28		≥ 29
Tetraciclina	TET	Tetraciclina	3	≤ 14	15-18	≥ 19
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT	Combinación de diaminopirimidina y sulfonamida	4	≤ 10	11-15	≥ 16

^a 1 Inhibición de la formación de la pared celular. 3 Interferencia en la síntesis de proteínas.

4 Inhibición del metabolismo de los ácidos nucleicos.

^b R= Resistente, I= Intermedia, S= Sensible.

3. Determinación de la CMI.

La concentración mínima inhibitoria de ampicilina, ampicilina + sulbactam, amoxicilina y amoxicilina + ácido clavulánico se determinó por el método de dilución en placa en agar Mueller-Hinton. La inoculación de los cultivos de fase estacionaria se efectuó con un sembrador múltiple, conforme a lo reportado por Vaca *et al.*, (1995). La CMI es la mínima concentración del antibiótico que inhibe el crecimiento visible después de incubar 24 h a 37°C. Las combinaciones de β -lactámico+inhibidor de β -lactamasas utilizadas fueron: Clavulin (SmithKline Beecham Farmacéutica, S.A. de C.V.; el cual contiene amoxicilina + 25% de clavulanato de potasio) y Unasyna (Pfizer, S.A. de C.V.; la cual contiene ampicilina y 66.8% de sulbactam).

4. Detección de β -lactamasa. Para detectar la β -lactamasa se utilizaron discos impregnados con la cefalosporina cromogénica nitrocefín (BBL). Este compuesto cambia de color amarillo a rojo cuando el enlace amida del anillo β -lactámico es hidrolizado por la β -lactamasa.

Un disco impregnado con nitrocefín se humedeció con una gota de agua y enseguida se le colocaron con una asa estéril varias colonias aisladas de la cepa de *S. aureus*. Se observó la ocurrencia de cambio de color durante un período máximo de 1 h y mínimo de 1 min.

RESULTADOS

Origen de las cepas

En este trabajo se analizaron 70 cepas de *Staphylococcus aureus* que aislamos a partir de pacientes que acudieron al Laboratorio de Análisis Clínicos “El eritrocito”. Como se muestra en la gráfica 1, ochenta por ciento de las cepas se aislaron de la nasofaringe, 16% de vías urinarias y el resto de una infección cutánea (1 cepa) y de infecciones oculares (2 cepas).

En la gráfica 2 puede observarse que la mayoría de los pacientes fueron niños y jóvenes; cerca del 70% tienen 30 años o menos. El grupo etario más abundante fue el de 0-10 años (28%), seguido por el de 11-20 años (20%). Los grupos minoritarios fueron: 61-70 años y 71-80 (1.4% en cada caso).

Resistencia a antibióticos.

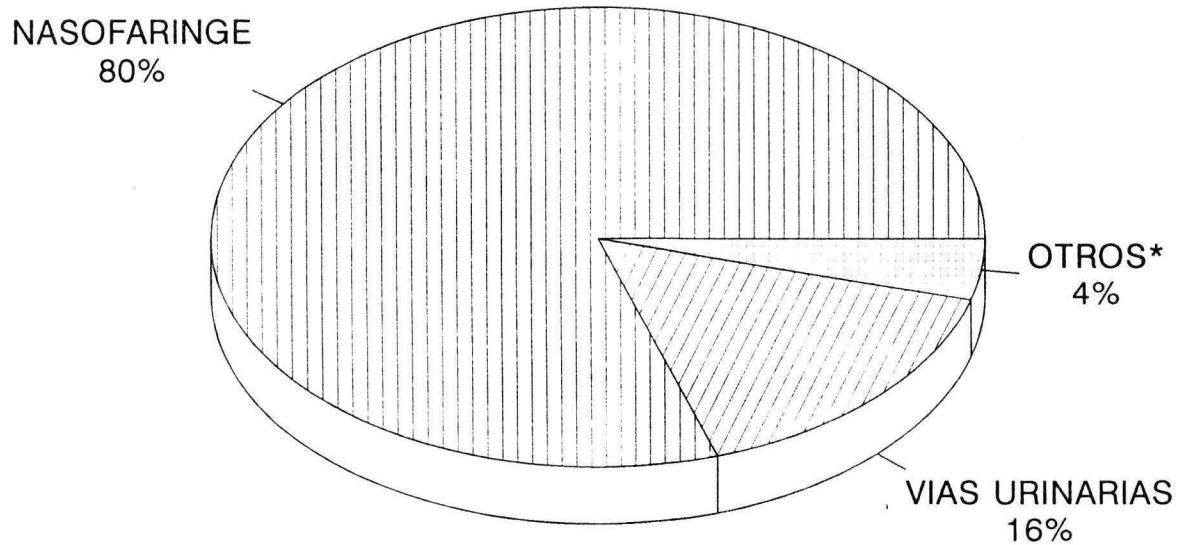
Con el propósito de determinar la resistencia a antibióticos a las cepas de *S. aureus* se utilizó el método de Kirby-Bauer. Los antibióticos utilizados y los criterios de resistencia, según el diámetro del halo de inhibición, se muestran en la tabla 1.

Todas las cepas fueron resistentes a los β -lactámicos penicilina y ampicilina (gráfica 3), un poco más de 80% fueron resistentes a la

GRAFICA 1

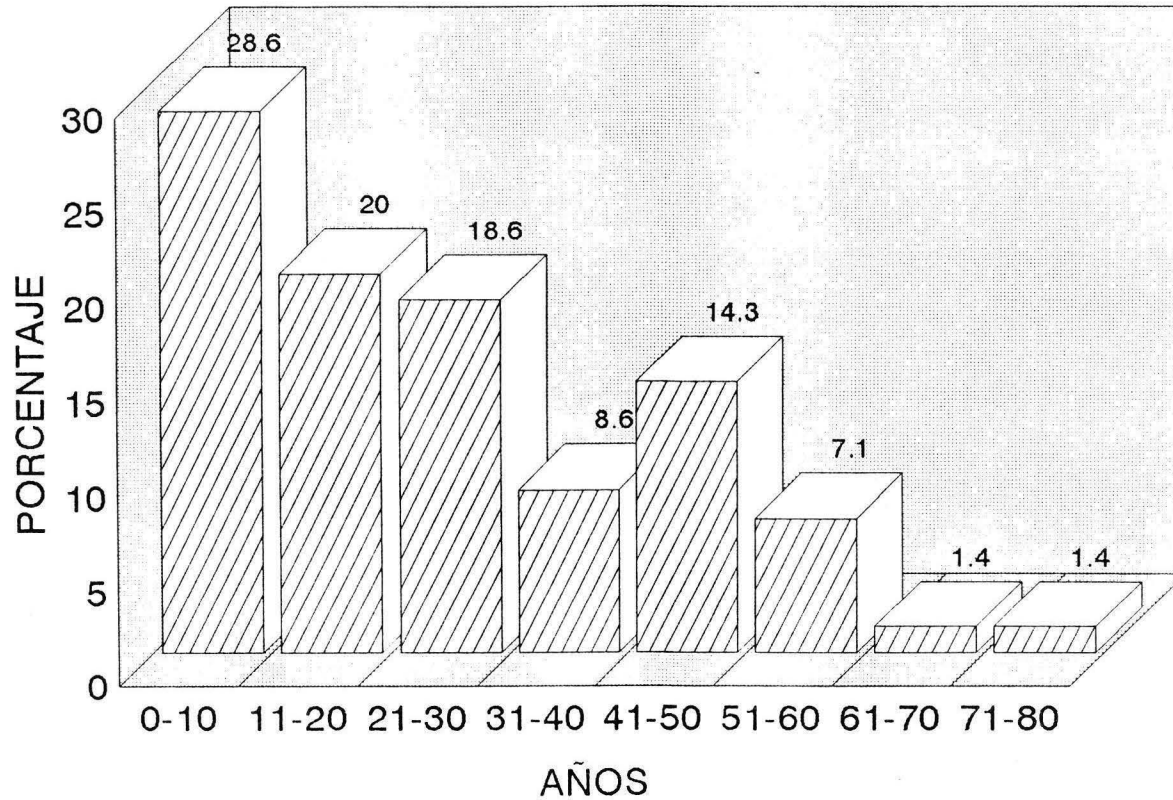
ORIGEN DE LAS CEPAS

17



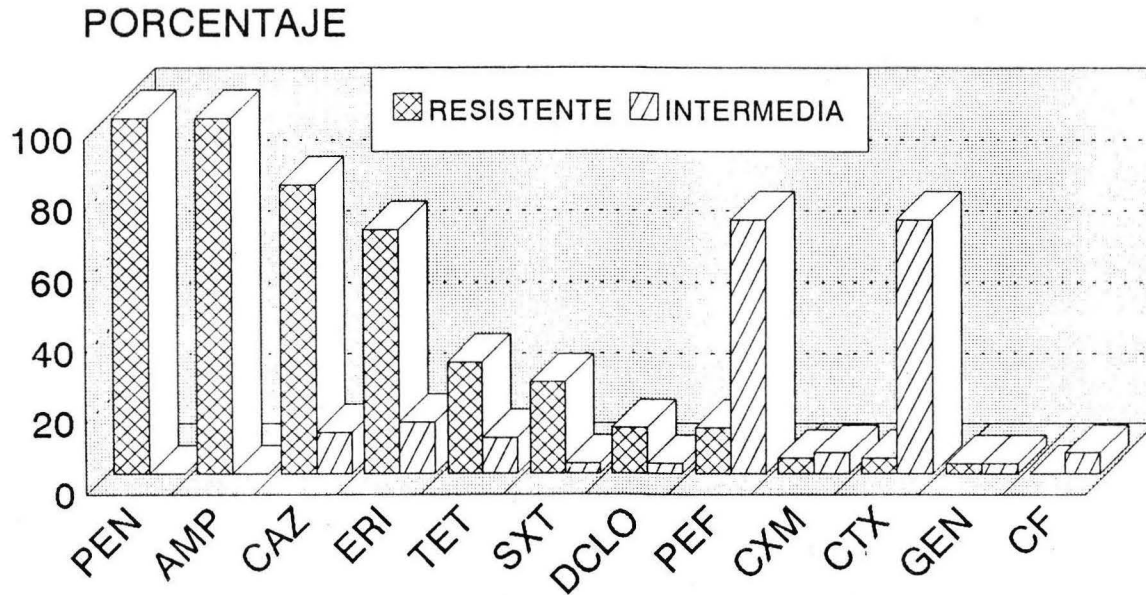
* CULT. PIEL: 1 CEPA; CULT. OCULAR 2 CEPAS

GRAFICA 2 EIDADES DE LOS PACIENTES



GRAFICA 3

RESISTENCIA DE LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* A ANTIBIOTICOS



RESISTENTE	100	100	81.4	68.6	31.4	25.7	12.8	12.8	4.3	4.3	2.8	0
INTERMEDIA	0	0	11.4	14.3	10	2.8	2.8	71.4	5.7	71.4	2.8	5.7
SENSIBLE	0	0	7.2	17.1	58.6	71.4	84.3	15.7	90	24.3	94.3	94.3

cefalosporina de 3a. generación ceftazidima y cerca del 70% al macrólido eritromicina. Aproximadamente 1/3 de las cepas mostraron resistencia frente a tetraciclina y 1/4 frente a trimetoprim+sulfametoxazol. Alrededor del 13% fueron resistentes a la penicilina semisintética dicloxacilina o a la quinolona pefloxacina. Sólo 4.3% de las cepas fueron resistentes a las cefalosporinas cefuroxima (2a. generación) o cefotaxima (3a. generación). La frecuencia de cepas resistentes al aminoglucósido gentamicina fue muy baja (2.8%) y todas las cepas fueron sensibles a la cefalosporina de 1a. generación cefalotina. Los porcentajes más altos de sensibilidad intermedia correspondieron a la quinolona pefloxacina y a la cefalosporina cefotaxima (71.4% para cada antibiótico; ver gráfica 3).

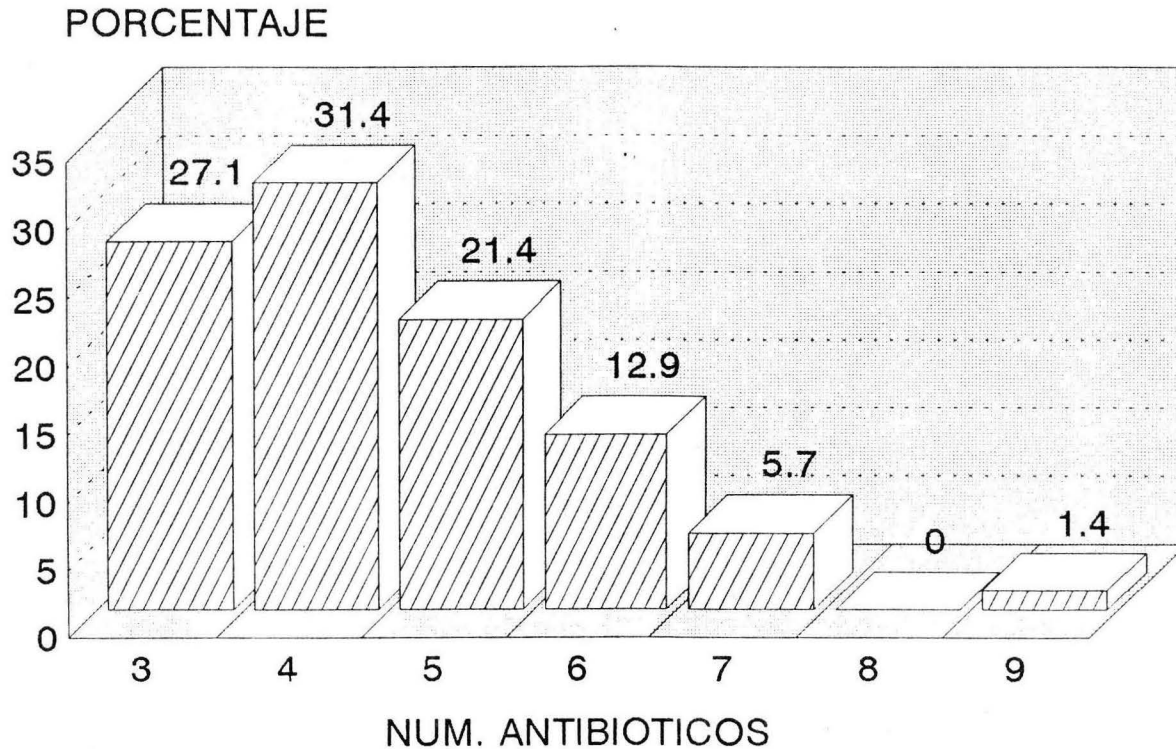
Multirresistencia a antibióticos.

Todas las cepas probadas fueron resistentes a 3 o más antibióticos (gráfica 4), una de ellas (1.4%) mostró resistencia frente a 9 antimicrobianos. Los porcentajes mayores de cepas multirresistentes correspondieron a tetra-resistentes (31.4%), tri-resistentes (27.1%), penta-resistentes (21.4%); en tanto que los menores fueron: sexta-resistentes (12.9%), hepta-resistentes (5.9%) y nona-resistentes (1.4%). No se encontraron cepas resistentes a 8 antibióticos (gráfica 4).

GRAFICA 4

MULTIRRESISTENCIA DE LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* a ANTIBIOTICOS

21



Producción de β -lactamasas.

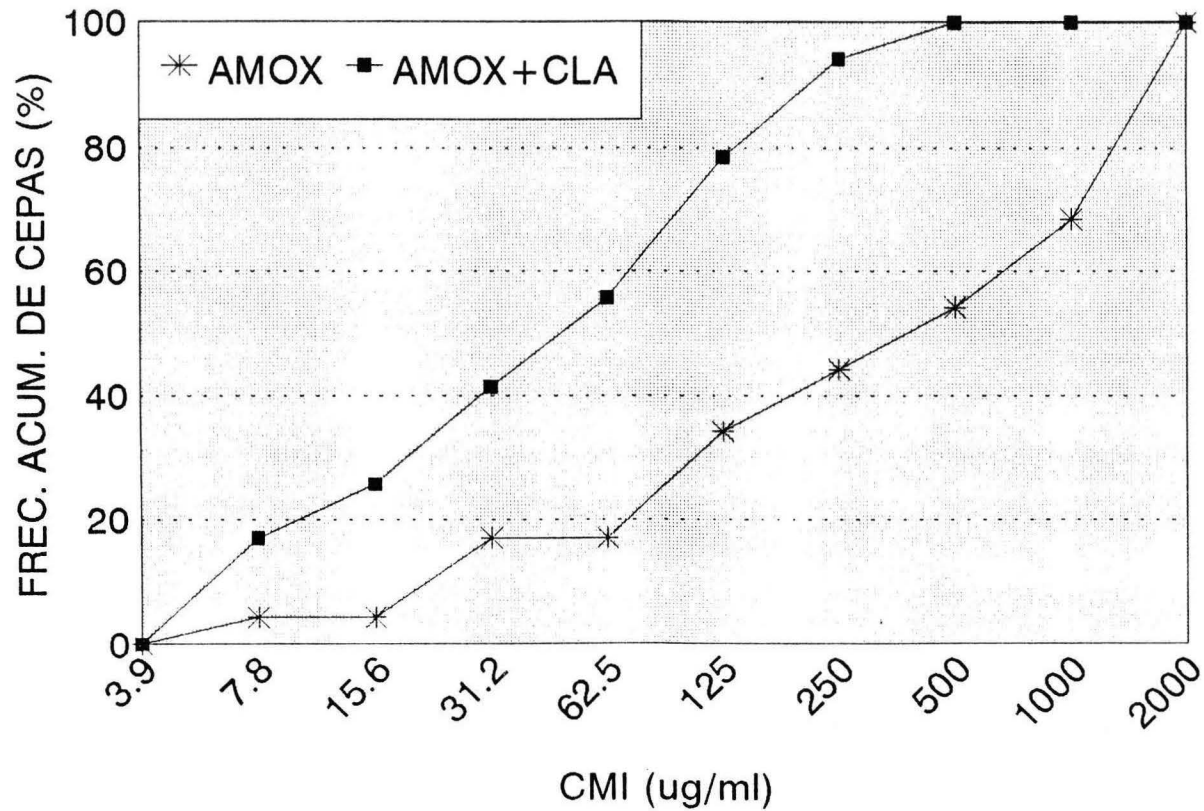
Con el propósito de determinar la producción de β -lactamasas por las cepas de *S. aureus* se determinó, cualitativamente, la capacidad de éstas para hidrolizar a la cefalosporina cromogénica nitrocefín. La mayoría de las cepas fueron productoras de β -lactamasa (95.7%). Sólo 3 cepas (4.3%) no produjeron β -lactamasa.

Concentraciones mínimas inhibitorias de β -lactámicos con y sin inhibidor de β -lactamasas.

Para cuantificar el efecto de los inhibidores de β -lactamasas sulbactam y ácido clavulánico sobre la CMI de ampicilina y amoxicilina, respectivamente, se midieron las CMIs de cada antibiótico, solo y combinado con el inhibidor, para las cepas de *S. aureus*.

Como puede observarse en la gráfica 5, la CMI₅₀ de amoxicilina (concentración que inhibe al 50% de las cepas) fue 500 $\mu\text{g/ml}$ y la CMI₉₀ fue de 2000 $\mu\text{g/ml}$. La adición de ácido clavulánico a la amoxicilina disminuyó 8 veces la CMI₅₀(62.5 $\mu\text{g/ml}$) y la CMI₉₀ (250 $\mu\text{g/ml}$) (Gráfica 5).

GRAFICA 5
CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE BETALACTAMICO
CON Y SIN INHIBIDOR DE BETA LACTAMASAS



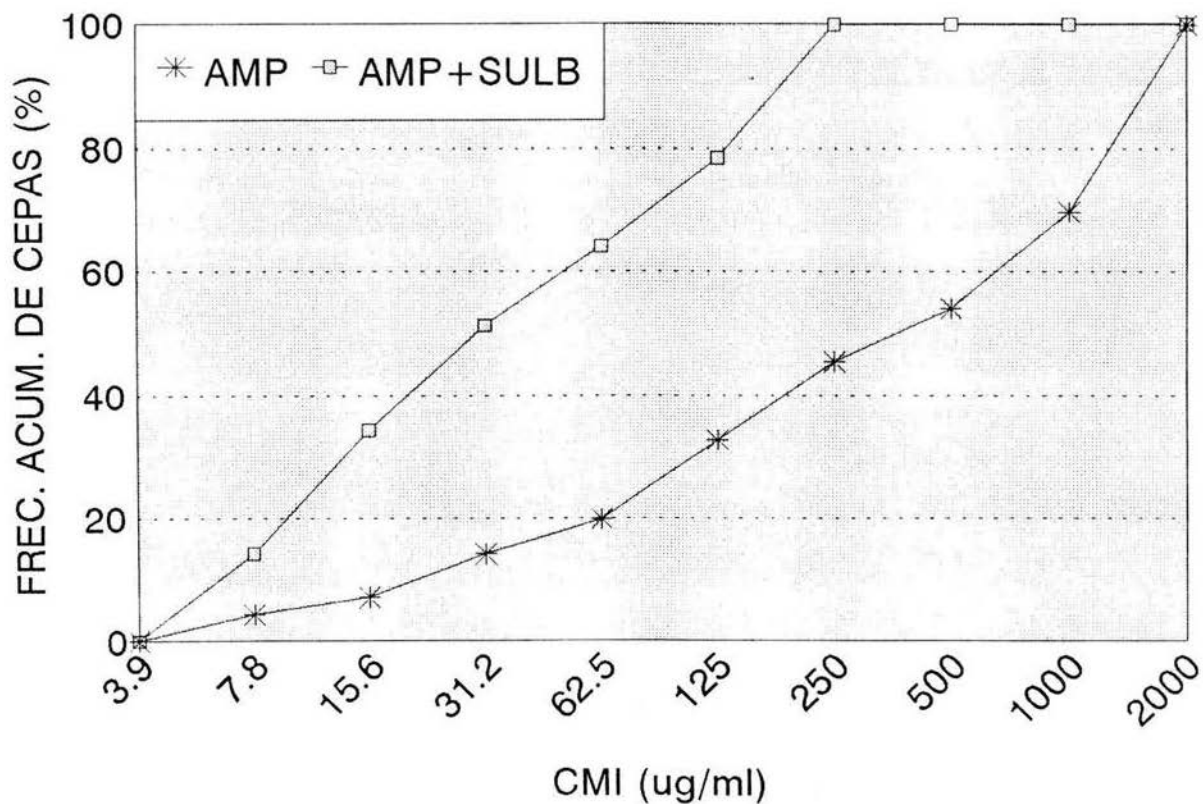
La CMI₅₀ de ampicilina correspondió a 500 µg/ml y la CMI₉₀ a 1727 µg/ml (gráfica 6). La adición de sulbactam a la ampicilina disminuyó 8 veces la CMI₅₀ (31.2 µg/ml) y la CMI₉₀ (216 µg/ml) (Gráfica 6).

Variedad de β-lactamasas producidas por la población de cepas de *S. aureus*

No obstante que las CMI₅₀ y CMI₉₀ de ampicilina y amoxicilina disminuyen 8 veces por efecto del inhibidor de β-lactamasas sulbactam o ácido clavulánico, respectivamente, al analizar el cociente CMI-β-lactámico/CMI β-lactámico+inhibidor de β-lactamasa, se observa que las β-lactamasas producidas por las cepas estudiadas difieren en la sensibilidad al inhibidor correspondiente. Así, podemos ver en la gráfica 7 que la disminución en la CMI de la ampicilina por el sulbactam tiene una distribución cuya media corresponde a 11 veces en un intervalo de 2 a 64 veces, con 3 cepas (4.3%) cuya CMI no se altera.

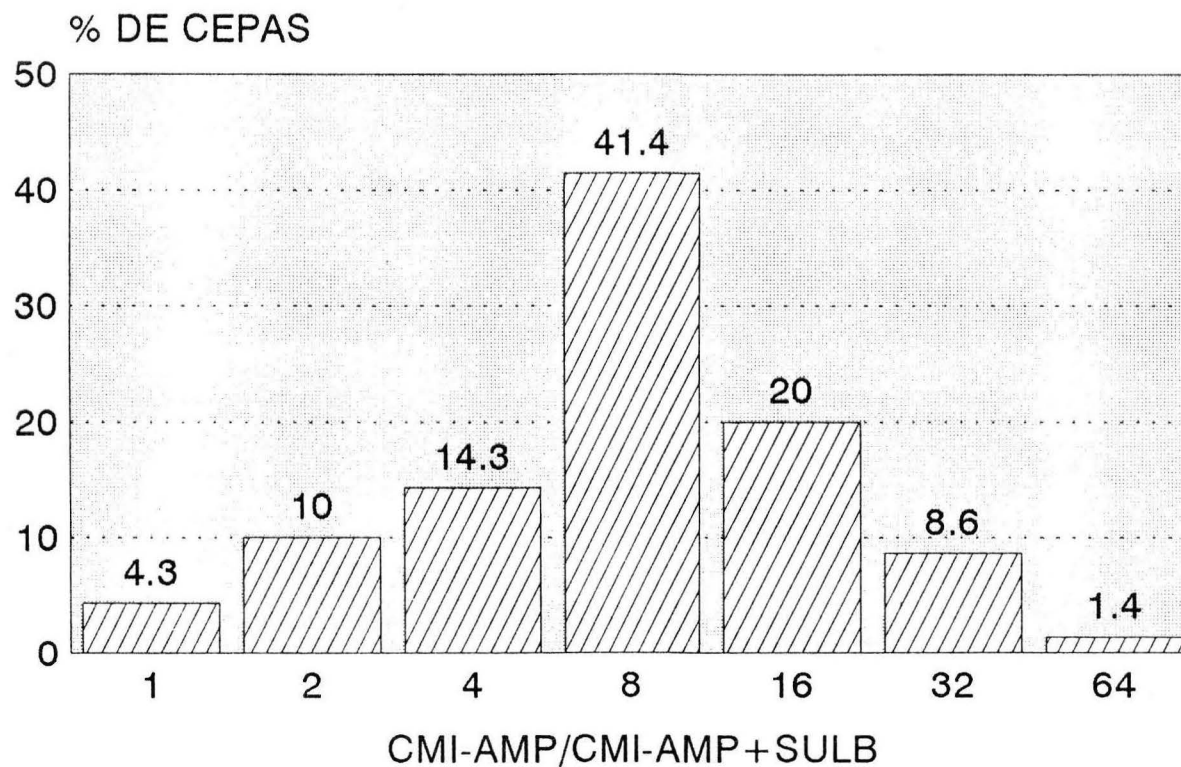
Se obtuvo una distribución similar para el cociente CMI-amoxicilina/CMI-amoxicilina+ácido clavulánico, con una media de 8.3 veces en un intervalo de 2 a 32 veces y con **las mismas 3 cepas** cuya CMI no disminuye por efecto del clavulánico (gráfica 8).

GRAFICA 6
CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE BETALACTAMICO CON Y SIN INHIBIDOR DE BETA LACTAMASAS 25



GRAFICA 7

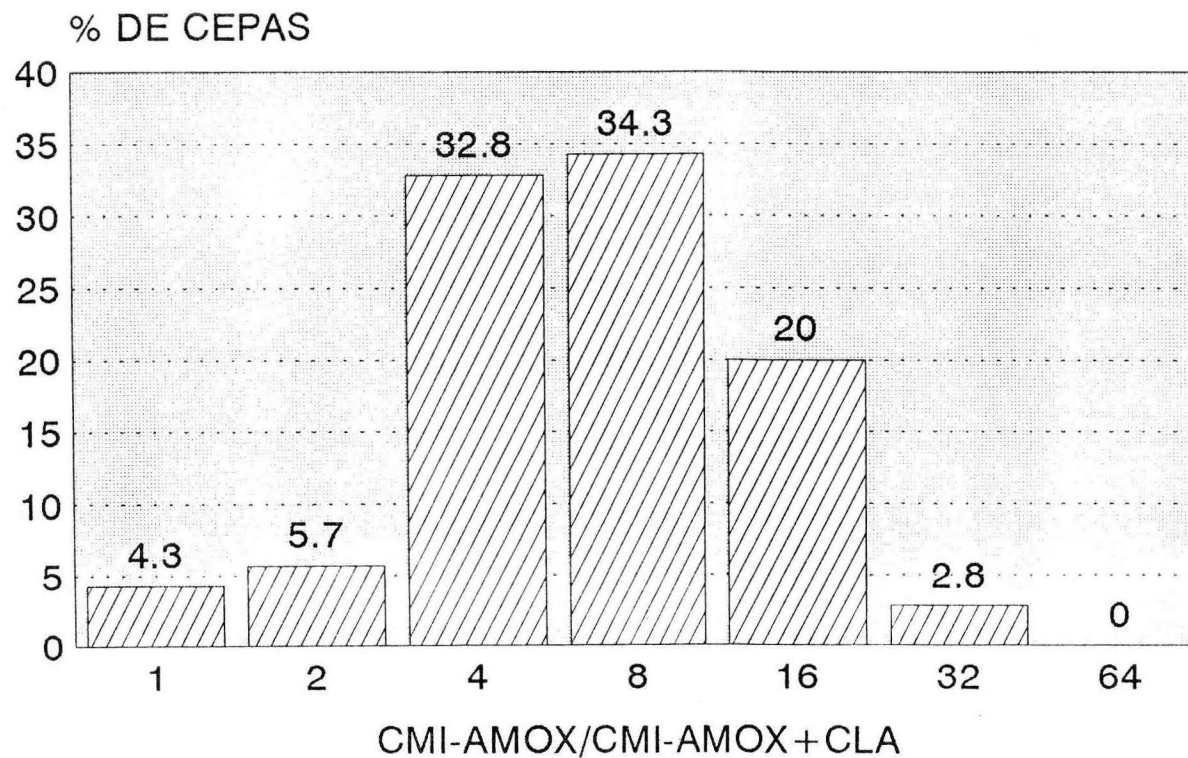
EFFECTO DEL SULBACTAM SOBRE LA CMI DE AMPICILINA



GRAFICA 8

EFFECTO DEL ACIDO CLAVULANICO SOBRE LA CMI DE AMOXICILINA

27



DISCUSIÓN

Origen de las cepas

El 80 % de las cepas de *S. aureus* estudiadas fueron aisladas de la nasofaringe, lo que pone de manifiesto la alta incidencia de este patógeno como agente causal de infecciones respiratorias. Esta alta frecuencia de infecciones respiratorias causadas por *S. aureus* es consistente con la reportada en un amplio estudio previo (Jiménez, E., 1996) en el que se analizaron 1454 cepas bacterianas -aisladas de pacientes de la CUSI-I durante un período de 7 años- de las cuales 816 (55.7%) se aislaron de la nasofaringe y de éstas 618 (75.7%) correspondieron a *S. aureus*. De las 651 cepas totales de *S. aureus* estudiadas por Jiménez (1996), el 92.6% (603 cepas) se aislaron de la nasofaringe.

A pesar de que los niños y ancianos son los más susceptibles a las infecciones respiratorias, la mayoría de las cepas reportadas aquí se aislaron de niños de 10 o menos años de edad (28.8%) y jóvenes (38.6% para el grupo de 11-30 años), y -en una aparente contradicción- un porcentaje muy bajo (2.8%) de ancianos (61-80 años). Este bajo porcentaje de cepas aisladas de personas de la tercera edad refleja sólo que este grupo etario fue el menos abundante en la población de pacientes que acudieron a “El eritrocito”.

Resistencia a antibióticos

El 100% de las cepas de *S. aureus* reportadas en este trabajo fueron resistentes a los antibióticos β -lactámicos penicilina y ampicilina (gráfica 7), porcentaje que rebasa al 80% reportado hasta ahora en otras partes del mundo (O'Brien, T.F., 1986) y podría reflejar, quizá, que estos antimicrobianos han sido utilizados con mayor abundancia y durante tiempos más prolongados por los habitantes de la comunidad a la que pertenecen los pacientes estudiados, en cuyo caso, la población bacteriana habría sido seleccionada como resistente, debido mayoritariamente a la producción de β -lactamasas.

La resistencia a algunos antibióticos “insensibles a β -lactamasas” también fue elevada: un poco más de 80% de las cepas fueron resistentes a la cefalosporina de 3a. generación ceftazidima, alrededor del 13% fueron resistentes a la penicilina semisintética dicloxacilina. Por el contrario, sólo 4.3% de las cepas fueron resistentes a las cefalosporinas cefuroxima (2a. generación) o cefotaxima (3a. generación) y todas las cepas fueron sensibles a la cefalosporina de 1a. generación cefalotina. Estas diferencias notables en resistencia a cefalosporinas nuevas y sensibilidad frente a las viejas cefalosporinas indican claramente que, a despecho de lo que sugeriría el sentido común, la fecha de introducción de un antibiótico al mercado no es,

por sí misma, ninguna garantía de su efectividad, ya que en el fenómeno de selección de cepas resistentes influyen grandemente el mal uso y abuso de los antimicrobianos. Nuestros datos demuestran nuevamente, que ya no es posible considerar, a priori, antibiótico alguno como de primera elección.

Los antibióticos ante los cuales la frecuencia de cepas resistentes fue más baja, o nula, fueron el aminoglucósido gentamicina (2.8%) y la cefalosporina de 1a. generación cefalotina (0%) (gráfica 3).

Todas las cepas probadas fueron resistentes a 3 o más antibióticos, siendo la frecuencia más alta para las resistentes a 4 (31.4%, gráfica 4), lo que probablemente refleja que poseen plásmidos.

Efecto de los inhibidores de β -lactamasas sobre la CMI de β -lactámicos

En este trabajo reportamos que 95.7% de las cepas de *S. aureus* produjeron β -lactamasas, y que los inhibidores de β -lactamasas ácido clavulánico y sulbactam disminuyen 8 veces la CMI₅₀ y CMI₉₀ de amoxicilina y ampicilina sobre la población de cepas de *S. aureus* estudiadas (gráficas 5 y 6). Sin embargo, el análisis más detallado permite distinguir 6 (gráfica 7) o 5 (gráfica 8) subpoblaciones, que probablemente corresponden a cepas productoras de β -lactamasas con distinta sensibilidad al inhibidor o, a enzimas producidas en concentración diferente.

Las tres cepas no productoras de β -lactamasa (4.3%) mostraron una CMI idéntica ante el β -lactámico con y sin inhibidor de β -lactamasa, de modo que el cociente de ambas CMI fue igual a 1 (gráficas 7 y 8). A pesar de que estas tres cepas no produjeron β -lactamasa, fueron resistentes a penicilina y ampicilina. Estos datos sugieren fuertemente que la resistencia a ambos β -lactámicos se debe a la ausencia o alteración de las PBPs.

CONCLUSIONES

En suma, los datos presentados aquí muestran que *S. aureus* es una causa cada vez más frecuente de infecciones respiratorias y que las cepas son resistentes a los antibióticos considerados tradicionalmente como “de elección”, especialmente a penicilina y ampicilina. Nuestros datos muestran también que todas las cepas estudiadas fueron multirresistentes. Por último, de las dos estrategias utilizadas para combatir a las cepas productoras de β -lactamasas, la introducción de cefalosporinas fue menos eficaz que la combinación de β -lactámico + inhibidor de β -lactamasas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Adam, A.P., A.L. Barry & E. Benner, 1970. A simple rapid test to differentiate penicillin-susceptible from penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 122:544-546.
2. Ashford, W.A., R.G. Golash & V.G. Hemming. 1976. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet ii:657-658.
3. Bauer, A.W., W.M. Kirby, J.C. Sherris & M. Turk. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496.
4. Bhakdi, S. & J. Tranum-Jensen, 1984. citado en Novick, R. 1993. *Staphylococcus*, p.17-33. En: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch & R. Losick (eds.), *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, USA.
5. Curtiss, N.A.C., D. Orr, M.G. Boulton & G.W. Ross, 1981. Penicillin binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. Comparison of two strains differing in their resistance to β -lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 7:127-136.
6. Chopra, I. & P.R. Ball. 1982. Transport of antibiotics into bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. 23:183-240.
7. Dyke, K.H.G., 1979. β -Lactamases of *Staphylococcus aureus*, p. 291-310. En: Hamilton-Miller, J.M.T & J.T. Smith (ed.) Beta-lactamases. Academic Press. London.
8. Fasola, E.L., C.E. Fasching & L.R. Peterson, 1995. Molecular correlation between in vitro and in vivo activity of beta-lactam and beta-lactamase

- inhibitor combinations against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Lab. Clin. Med. 125:200-211.
9. Fitton, J.E., A. Dell & W.V. Shaw, 1980. The amino acid sequence of the delta haemolysin of *Staphylococcus aureus*. FEBS Lett. 115:209-212.
 10. Foster, T.J., M. O'Reilly, P. Phonimdaeng, J. Cooney, A.H. Patel & A.J. Bramley, 1990. Genetic studies of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. Properties of coagulase and γ -toxin, α -toxin, β -toxin and protein A in the pathogenesis of *S. aureus* infection, p. 403-420. En: Novick, R.P. (ed.), Molecular biology of the *Staphylococci*. VCH. Publishers, New York.
 11. Garau, J. 1994. Beta-lactamases: current situation and clinical importance. Intensive Care Med. 20(suppl.3):5-9.
 12. Georgopadakou, N.H., S. A. Smith & D.P. Bonner, 1982. Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific β -lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 22:172-175.
 13. Godfrey, A.J. & L.E. Bryan. 1982. Mutation of *Pseudomonas aeruginosa* specifying reduced affinity for penicillin G. Antimicrob. Agents Chemother. 21:216-223.
 14. Harder, K.J., H. Nikaido & M. Matsubishi. 1981. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the *ompF* porin. Antimicrob. Agents Chemother. 20:549-552.
 15. Hartman, B.J. & A. Tomasz, 1984. Low-affinity penicillin binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 158: 513-516.
 16. Jacoby, G.A., 1994. Extrachromosomal resistance in gram-negative organisms: the evolution of beta-lactamase. Trends Microbiol. 2:357-360

17. Jiménez, E. 1996. Patrones de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de pacientes de la Clínica Universitaria Iztacala durante 7 años. Tesis de Licenciatura, ENEP-I, UNAM.
18. Komatsu, Y., K. Murakami & T. Nichikawa. 1981. Penetration of moxalactam into its target proteins in *Escherichia coli* K-12: comparison of a highly moxalactam-resistant mutant with its parent strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20:613-619.
19. Lindberg, M., K. Jonsson, H. Muller, H. Jonsson, C. Signas, M., Hook, R. Raja, G. Raucci & G.M. Anantharamaiah, 1990. Fibronectin-binding proteins in *S. aureus*, p. 327-356. En: Novick, R.P. (ed.), *Molecular biology of the Staphylococci*. VCH. Publishers, New York.
20. Malmvall, B.E., J.E. Brorsson & J. Johnsson, 1977. *In vitro* sensitivity to penicillin V and β -lactamase production of *Branhamella catarrhalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 3:374-375.
21. Novick, R. 1993. *Staphylococcus*. p.17-33. En: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch & R. Losick (eds.), *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, USA.
22. O'Brien, T.F and The the International Survey of Antibiotic Resistance Group, 1986. Resistance to antibiotics at medical centers in different parts of the world. *J. Antimicrob. Chemother* 18(Suppl. C):243-253.
23. Ohmori, H., A. Azuma, Y. Zuzuki & Y. Hashimoto, 1977. Factors involved in beta-lactam antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12:537-539.
24. Richmond, M.H. 1979. β -lactam antibiotics and β -lactamases: two sides of a continuing story. *Rev. Infect. Dis.* 1:30-36.

25. Richmond, M.H., 1965. Wild-type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* 94:584-593.
26. Rolinson, G.N. 1994. A review of the microbiology of amoxicillin/clavulanic acid over the 15 year period 1978-1993. *J. Chemother.* 6:283-318.
27. Rosedahl, V.T. ,1973. Naturally occurring constitutive β -lactamase of a novel serotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 77:229-231.
28. Rowland, S.J. & K.G. Dyke, 1989. Characterization of the staphylococcal β -lactamase transposon Tn552. *EMBO J.* 8:2761-2773.
29. Sako, T., S. Sawaki, T. Sakurai, S. Ito, Y. Yoshizawa & I. Kondo, 1983. Cloning and expression of the staphylokinase gene of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *Molec. Gen. Genet.* 190:271-277.
30. Skinner, A. & R. Wise, 1977. A comparison of three rapid methods of β -lactamase activity in *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Pathol.* 30:1030-1032
31. Smith, R.M., J.T. Parisi, L. Vical & J.N. Baldwin, 1977. Nature of the genetic determinant controlling encapsulation in *Staphylococcus aureus* Smith. *Infect. Immun.* 17:231-234.
32. Sykes, R.B. & M. Mathew, 1976. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2:115-157.
33. Then, R.L. & P. Angehrn, 1982. Trapping of nonhydrolyzable cephalosporins by cephalosporinases in *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* as a possible resistance mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21:711-717.

34. Vaca, S., R. Miranda & C. Cervantes, 1995. Inorganic-ion resistance by bacteria isolated from a Mexico City freeway. *Antonie van Leeuwenhoek* 67:333-337.
35. Wadstrom, T., J. Erdei, M. Paulsson & A.S. Naidu 1990. Binding of collagen and vitronectin to *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci (CNS), p. 357-371. En: Novick, R.P. (ed.), *Molecular biology of the Staphylococci*. VCH. Publishers, New York.
36. Wiley, B.B. & M. Rogolsky, 1977. Molecular and serological differentiation of staphylococcal exfoliative toxin synthesized under chromosomal and plasmid control. *Infect. Immun.* 18:487-494.