



Benemérita Universidad



Autónoma de Puebla

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**Comparación de sensibilidad a antimicrobianos de cepas de
Staphylococcus aureus obtenidas de muestras clínicas de
humanos y 3 hospitales veterinarios**

Tesis para obtener el título de

Licenciado en Químico Farmacobiólogo

Presenta

Ivan Francisco Hernández Cano

Director

M.S.P. Claudy Lorena Villagrán Padilla

Asesor

M.C. Patricia Guadalupe Suárez Albores

H. Puebla de Z. Junio de 2014.

*Tenga mucho cuidado en confundir sus ganas,
con las probabilidades de que algo sea factible.*

Odin Dupuyron

Agradecimientos



A la fuerza que da orden y vida a todo en la tierra y el espacio...

A mis padres, a mis hermanos y familia...

A mi sino, por las experiencias gratificantes y otras no tanto...

A mis amigos, conocidos, desconocidos, enemigos y toda persona que ha tenido participación en algún capítulo en mi vida...

A Claudy y a Paty (si, las tuteo y ¿qué?) Por guiarme en este trabajo...

A Mary, Betty y Oscar (También los tuteo ¿y?) por participar en este trabajo como sinodales...

A Ros, por ser mi editora de redacción e imagen y gran amiga en esta última etapa...

Al Doc. Raúl, por su apoyo desinteresado...

Y al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas que me acogió en los últimos dos años, en particular a Claudy, Paty, Mary y Betty quienes agradezco las oportunidades brindadas, la confianza, las risas, los regaños y todo...

Eternamente agradecido...

Juan



Índice

| | |
|--|----|
| Introducción | 6 |
| Marco teórico | |
| Historia | 8 |
| Caracterización | 9 |
| Especies de importancia médica | 9 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> en humanos | 10 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> en animales | 11 |
| Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> | 11 |
| Factores de virulencia | 13 |
| Antibióticos | 16 |
| Clasificación de antibióticos | 17 |
| Resistencia bacteriana | 20 |
| Marco de referencia | 26 |
| Planteamiento del problema | 29 |
| Justificación | 31 |
| Objetivos | 32 |
| Diseño de investigación | 33 |
| Metodología | 34 |
| Resultados y discusión | 38 |
| Conclusiones | 46 |
| Bibliografía | 47 |

Introducción



A black and white illustration of a quill pen, positioned diagonally with its tip resting on the end of the word 'Introducción'. The quill has a detailed, feathered texture. A soft shadow is cast by the quill onto the surface below it. A thin, curved line underlines the word.

Desde que se tiene noticia de la presencia del hombre sobre la Tierra existen indicios del padecimiento de enfermedades producidas por microorganismos, lo que hoy denominamos Enfermedades Infecciosas. A lo largo de la Historia este tipo de procesos se han constituido en auténticos azotes de la humanidad y sin exageración se puede afirmar que han condicionado la existencia humana, constituyendo en ocasiones un claro instrumento de la selección natural. Pestes y plagas han influido tan decisivamente en la historia de algunas naciones que su presencia ha provocado migraciones, contribuido a victorias o derrotas en confrontaciones entre pueblos y en no pocos casos han representado el instrumento decisivo de su desaparición.

Si a lo que nos referimos es a las enfermedades infecciosas de los animales, el capítulo es muchísimo más diverso al variar el número de hospederos de referencia: animales domésticos, salvajes, de compañía, mamíferos, aves, reptiles, peces, etc. Como quiera que sea, los condicionantes son similares y las enfermedades infecciosas producen muerte, acortamiento del periodo de vida y, si se refieren a su relación con el hombre son fuente importante de enfermedades. ⁽⁴⁾

Sin embargo, el concepto que se usa normalmente para una zoonosis es: una enfermedad que puede ser transmitida de un animal vertebrado a un ser humano. Teniendo en cuenta que el huésped animal tiene que ser un animal vertebrado. La influenza porcina (H1N12009) era un virus zoonótico que se transmitió de los cerdos a los humanos (aunque el caso de la transmisión exacta no fue identificado), se adaptó al humano y causó una pandemia de influenza.

Un buen ejemplo fue que durante la epidemia de gripe porcina de 2009, hubo varios ejemplos en los que los trabajadores de las granjas porcinas habían adquirido el virus H1N12009 y luego infectaron a cerdos. Así que las estrategias que disminuyen los riesgos de transmisión de agentes patógenos protegen a los animales y al hombre. ⁽¹⁹⁾

Por lo anterior, es importante el monitoreo del comportamiento de cepas patógenas para los humanos y animales; así como analizar el comportamiento del perfil de antimicrobianos para un tratamiento de forma eficaz.

Marco teórico



Historia

El nombre de *Staphylococcus* (*staphyle*, racimo de uvas) fue presentado por Ogston (1883) para el grupo micrococos que causan inflamación y supuración. Él fue el primero en distinguir dos tipos de cocos piógenos: uno dispuestos en grupos o masas fue llamado "estafilococo" y otra dispuesta en cadenas fue nombrado "*Streptococcus* de Billroth". Una descripción formal del género *Staphylococcus* fue proporcionada por Rosenbach (1884). Él dividió el género en las dos especies de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus albus*.

En 1886, el género *Staphylococcus* se separó de *Micrococcus* por Flügge (1886). Se diferencian los dos géneros, principalmente sobre la base de su acción sobre la gelatina y en relación con su huésped. Estafilococos licuaba gelatina y eran patógenos, mientras que micrococos fueron variables en su acción sobre la gelatina y eran saprofitas. Los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Planococcus*, que contiene cocos grampositivos, catalasa positiva, se coloca más tarde en la familia *Micrococcaceae*.

Evans et al. (1955) propusieron la separación de estafilococos de micrococos sobre la base de su relación con el oxígeno. Los cocos anaerobios facultativos se colocaron en el género *Staphylococcus* y los cocos aerobios obligados en el género *Micrococcus*.

A mediados de la década de 1960, una clara distinción puede hacerse entre los estafilococos y micrococos sobre la base de su composición de bases del ADN. Los miembros del género *Staphylococcus* tienen un contenido de ADN de G+ C de 33-40% en moles, mientras que los miembros del género *Micrococcus* tiene un alto contenido de G+ C de alrededor de 70% en moles.

Otros estudios han demostrado que estafilococos se puede distinguir de micrococos y otros cocos catalasa positivo, como la base de su composición de la pared celular, el perfil de citocromo, el patrón de menaquinona, la susceptibilidad a la lisostafina y la eritromicina, bacitracina, y furazolidona. Estudios inmunoquímicos comparativos de catalasas, estudios de hibridación ADN-ADN, estudios de ADN-ARNr de hibridación, y comparativa de catalogación de oligonucleótidos de 16S rRNA demostraron claramente la diferencia epigenética y genética de estafilococos y micrococos.

Los miembros del género *Staphylococcus* forman un grupo coherente y bien definido de especies relacionadas que son ampliamente divergentes de las del género *Micrococcus*. Hasta principios de 1970, el género *Staphylococcus* consistió en tres especies: la especie coagulasa positivo *S. aureus* y especies coagulasa negativo *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, pero una mirada más profunda en las propiedades químico-taxonómicas y genotípicas de los estafilococos llevó a la descripción de muchas nuevas especies de estafilococos. Actualmente, 36 especies y varias subespecies son reconocidas en el género *Staphylococcus*.⁽⁸⁾

Caracterización

Los miembros del género *Staphylococcus* son cocos grampositivos (0,5-1,5 μ m de diámetro) que se reproducen solos, en pares, tétradas, cadenas cortas (tres o cuatro células), y racimo de uvas irregulares. Son inmóviles, no esporulados y por lo general son no encapsulados.

La mayoría de las especies son anaerobios facultativos y positivas para la catalasa y pruebas bencidina (con algunas excepciones), el crecimiento es más rápido y abundante en condiciones aerobias. El contenido de G+C del ADN está en el intervalo de 30-39% en moles. El tamaño del genoma es de 2000-3000 kb (George y Kloos, 1994; Kloos et al, 1998). Los estafilococos son generalmente susceptibles a la lisostafina, furazolidona y nitrofurano, y resistentes a la eritromicina y la bacitracina en niveles bajos.⁽⁸⁾

Especies de importancia médica

Existen especies de *Staphylococcus* que forman parte de la flora normal extendida sobre la superficie del cuerpo; y otras que son patógenos importantes. Algunas de las enfermedades más comunes causadas por especies de *Staphylococcus* son: impétigo, el síndrome de shock tóxico, bacteriemia, endocarditis, forúnculos y osteomielitis. Muchas especies de *Staphylococcus* tienen la capacidad de formar biopelículas que luego pueden colonizar estructuras tales como catéteres médicos, stents, válvulas cardiacas, prótesis, derivaciones, y válvulas.

Las especies de importancia clínica se separan generalmente en *Staphylococcus* coagulasa-positivos (*S. aureus*) y coagulasa-negativos (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus*).

Staphylococcus aureus

Es un coco grampositivo, no móvil. No forma esporas, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce catalasa, coagulasa y crece rápidamente en agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas.⁽⁶⁾

***Staphylococcus aureus* en humanos**

S. aureus coloniza narinas en adultos de 20-40%, pliegues cutáneos intertriginosos, perineo, axilas y vagina. Posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. Además, causa septicemia, impétigo y fiebres.⁽⁶⁾

Los factores que pueden predisponer a infecciones graves son:

- Defectos congénitos o adquiridos en la quimiotaxis de los leucocitos.
- Defectos en la opsonización por anticuerpos secundarios a hipogamaglobulinemias adquiridas, congénitas, defectos o deficiencia en componentes del complejo.
- Defectos en la muerte celular intracelular de bacterias seguida de la fagocitosis.
- Lesiones cutáneas.
- Enfermedad crónica subyacente.
- Administración profiláctica o terapéutica de antibióticos.⁽¹⁰⁾

La mayor incidencia de las infecciones se presentan en niños, principalmente neonatos y lactantes, así como en pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas, incrementándose el número de infecciones nosocomiales. ⁽⁹⁾

***Staphylococcus aureus* en animales**

Staphylococcus aureus ya no es un problema asociado exclusivamente a la salud humana, ahora es asociado a la comunidad debido a infecciones causadas por este en animales de compañía. En general, las cepas de *Staphylococcus aureus* de animales de compañía difieren de los de la ganadería y de la carne de animales de producción. Esto es probablemente debido a que en los animales de compañía, la adquisición de *Staphylococcus aureus* es principalmente una *humanosis* debido a que las cepas desarrolladas por los propietarios se transmiten a sus animales

Históricamente, las infecciones por *Staphylococcus aureus* en animales de compañía, implica cepas parecidas a las cepas nosocomiales de humanos, cuando se observaron en los perros se supuso que la propagación había sido desde el hombre a los animales (*humanosis*). Existen pocos estudios epidemiológicos sobre la prevalencia de *Staphylococcus aureus* en animales. ⁽¹³⁾

Identificación de *Staphylococcus aureus*

La identificación rápida y directa de *S. aureus* es crucial para el manejo adecuado de los pacientes con infecciones de la piel, abscesos, septicemia/bacteriemia, endocarditis, síndrome del shock tóxico y ciertas intoxicaciones alimentarias. En los países en desarrollo, las pruebas fenotípicas son el pilar en el diagnóstico de las infecciones por estafilococos, en lo que la prueba de coagulasa suele ser confirmatoria de *S. aureus*.

Caracteres clave ahora utilizados para las especies y subespecies de identificación incluyen los siguientes: morfología de la colonia, los requerimientos de oxígeno, coagulasa, factor de aglutinación, nucleasa termoestable (termonucleasa), hemolisinas, catalasa, oxidasa, fosfatasa alcalina, ureasa, descarboxilasa de ornitina, arilamidasa pirrolidonilo, B-

galactosidasa, la producción de acetoína, reducción de nitrato, esculina hidrólisis, la producción de ácido aeróbico de una variedad de hidratos de carbono incluyendo D-trehalosa, D-manitol, D-manosa, D-turanosa, D-xilosa, D-celobiosa, L-arabinosa, maltosa, a-lactosa, sacarosa y rafinosa.

Se pueden utilizar pruebas bioquímicas relativamente sencillas (por ejemplo: reacciones positivas para la coagulasa, proteína A, nucleasa termoestable y fermentación de manitol) para diferenciar *S. aureus*. Las muestras clínicas se deben inocular en medios de agar enriquecidos complementados con sangre de carnero. Crecen rápidamente en los medios no selectivos, tanto aerobia como anaerobiamente, y se pueden apreciar colonias lisas de gran tamaño en el plazo de 24 horas, las colonias de *S. aureus* adquieren gradualmente una coloración dorada, en especial cuando los cultivos se incuban a temperatura ambiente. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen hemólisis en el agar sangre de carnero; cuando la muestra contiene una mezcla de varios microorganismos se puede aislar de forma selectiva *S. aureus* en un agar sal y manitol, ya que el cloruro sódico inhibe el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos y el manitol es fermentado por *S. aureus*, pero no por la mayoría de las restantes especies de estafilococos. ⁽¹⁴⁾

Ya que no es la única especie que fermenta el manitol, a las colonias fermentadoras se les realizan las pruebas de coagulasa y DNasa para determinar que sea *S. aureus*, resultando estas pruebas positivas; en la tabla 1 se muestran las características de las cepas del género de *Staphylococcus* de importancia médica.

Tabla 1. Diferenciación de especies clínicamente importantes del género *Staphylococcus*. ⁽¹⁰⁾

| PRUEBAS | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. saprophyticus</i> |
|----------------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|
| Color de las colonias | Amarillo-blanco | Blanco | Blanco |
| Hemólisis en agar sangre | + | +/- | - |
| Crecimiento anaerobio | + | + | +/- |
| Coagulasa y DNasa | + | - | - |
| Fermentación de la glucosa | + | + | + |
| Fermentación del manitol | + | - | +/- |
| Novobiocina | Sensible | Sensible | Resistente |

Factores de virulencia.

S. aureus produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de éstas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal de estas proteínas puede ser la de ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina.⁽²⁰⁾

Los factores de virulencia participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped en lo que se han clasificado en tres categorías:

- 1) Los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa.
- 2) Aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares.
- 3) Los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ .

Los factores de virulencia más importantes son:

- ✓ La coagulasa producida en dos formas, una forma unida (llamada también factor de aglomeración) y una forma libre. La coagulasa unida a la pared celular del estafilococo se une a la protrombina, este complejo trasforma el fibrinógeno en fibrina insoluble y esto provoca la aglomeración de los estafilococos. La coagulasa libre reacciona con el factor reactivo de la coagulasa (CRF), presente en el plasma, dando lugar a un complejo análogo a la trombina que reacciona con el fibrinógeno formando el coagulo de fibrina. La coagulasa se utiliza como marcador de la virulencia y permite diferenciar a *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies estafilocócicas (coagulasa negativas). La importancia en la enfermedad radica

cuando se forma una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, localizando la infección y protegiendo a la bacteria de la fagocitosis.

- ✓ Las enterotoxinas estafilocócicas, forman parte del grupo de toxinas conocidas como superantígenos toxina pirogénicos (PTSAgs), ya que tienen actividad biológica de pirogenicidad y superantigenicidad. Cuando se consumen alimentos contaminados con *S. aureus*, las enterotoxinas causan gastroenteritis, estimulan el sistema nervioso central, que se manifiesta por vómitos, los cuales acompañan a la enfermedad gastrointestinal.
- ✓ La toxina 1 del síndrome del shock tóxico de *S. aureus* suprime la quimiotaxis de neutrófilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema reticuloendotelial. La toxina actúa estimulando la liberación de varias citocinas, prostaglandinas y leucotrienos, los cuales producen los signos y síntomas del síndrome. Los síntomas típicos del síndrome del shock tóxico son: fiebre alta, dolor de cabeza, vómito, diarrea, mialgias y rash eritematoso. Otros síntomas incluyen meningitis, faringitis, conjuntivitis, vaginitis, edema, artralgia, irritabilidad, fatiga y dolor abdominal. En adultos puede producir síndrome de dificultad respiratoria, coagulación intravascular y falla renal. El síndrome del shock tóxico puede ser menstrual (por coincidir con el periodo menstrual), y está asociado con el uso de tampones, o bien ser no menstrual en cuyo caso se pueden producir abscesos, celulitis, bursitis, infecciones posparto, procedimientos post-quirúrgicos e infecciones vaginales.
- ✓ La leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) La leucocidina es una proteína citotóxica para los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares del humano, esta forma poros en la membrana plasmática de los leucocitos, lo que provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente produce la lisis de la célula. La lisis de los leucocitos produce la liberación de mediadores de la inflamación, con una consecuente respuesta inflamatoria grave.
- ✓ La toxina α o hemolisina α es citolítica para un gran número de células, entre las que se encuentran los monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas y células endoteliales. La toxina α es secretada por *S. aureus* y se integra en la membrana de las células blanco, formando heptámeros cilíndricos que son capaces de lisar las

células eucariontes. Los poros que produce permiten la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas que eventualmente producen la muerte de las células nucleadas y la lisis osmótica de los eritrocitos. La formación de poros también produce eventos secundarios que promueven el desarrollo de secuelas patológicas. Estos eventos incluyen la activación de endonucleasas y liberación de citocinas y mediadores inflamatorios. La producción de tromboxano y prostaciclina activa los mecanismos de vasoconstricción. Además, al romper la integridad celular aumenta la permeabilidad vascular. El efecto final en el hospedero es el edema pulmonar o síndrome de dificultad respiratoria. La toxina α es dermonecrótica y neurotóxica y puede ser letal para ciertos animales.

- ✓ La hemolisina β tiene actividad de fosfolipasa C, la cual es específica para la esfingomielina y liso-fosfatidilcolina. La diferencia en la susceptibilidad de los eritrocitos a la hemolisina β se debe al diferente contenido de esfingomielina en los eritrocitos. Su función durante la enfermedad no está determinada claramente. Sin embargo, se ha visto que le produce una ventaja selectiva a la bacteria.
- ✓ La hemolisina γ afecta a neutrófilos, macrófagos y a una gran variedad de eritrocitos de mamíferos. No se sabe si induce la liberación de mediadores de la inflamación.
- ✓ La hemolisina δ es capaz de causar daño en la membrana de un gran número de células de mamíferos. El 97% de las cepas de *S. aureus* produce hemolisina δ . Esta toxina es capaz de hidrolizar eritrocitos y otras células, así como estructuras subcelulares rodeadas por membrana como esferoplastos y protoplastos. Tiene actividad dermonecrótica y puede ser letal en animales de laboratorio a concentraciones elevadas. Se ha propuesto que la hemolisina δ actúa como un surfactante disgregando la membrana celular. ⁽⁶⁾

Se han descrito tres mecanismos que explican la resistencia de *S. aureus* a β -lactámicos: hiperproducción de β -lactamasa, modificación de las PBPs (PBP, siglas en inglés de *penicillin-binding proteins*), y resistencia intrínseca a meticilina.

- Hiperproducción de β -lactamasa o resistencia borderline (borderline resistant *Staphylococcus aureus*-BORSA): Fue descrita inicialmente por McDougal. Su mecanismo es una hiperproducción de penicilinas estafilocócica normal, mediada

por plásmidos. Estas cepas producen altas cantidades de enzima, lo que hace que oxacilina y meticilina, que fueron desarrolladas para resistir la acción hidrolítica de la penicilinasas, sean lenta aunque apreciablemente degradadas, presentando una resistencia límite a oxacilina con CMI (concentración mínima inhibitoria de 1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y meticilina con CIM de 2-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta resistencia se encuentra avalada por la ausencia de PBP 2a en su pared celular y por la observación de que la asociación con ácido clavulánico o sulbactam disminuye las CIMs de oxacilina y meticilina en varias veces. Las cepas hiperproductoras de β -lactamasas pertenecen casi exclusivamente al fagogrupo 94/96 y poseen un plásmido común de β -lactamasa de 17,2 Kb que codifica a la β -lactamasa estafilocócica del tipo A. Se cree que la acción de resistencia no es sólo debida a una hiperproducción, sino también a una nueva β -lactamasa cuyo gen no se ha identificado aún.

- Modificación de las PBPs: Descrito por Tomas y colaboradores, corresponde a una modificación mínima (modified *S. aureus*, MODSA), de las PBPs 1, 2 y 4 de peso molecular normal pero con baja afinidad por antibióticos β -lactámicos. Al igual que el mecanismo anterior, la resistencia observada es limitada.
- Resistencia intrínseca a meticilina: Este tipo de resistencia se debe a la incorporación en el ADN bacteriano de un gen, el *mecA*. Este gen es un trozo de ADN cromosomal adicional de 30 a 50 Kb, que posee dos elementos regulatorios (*mecR1* y *mecI*) que controlan la transcripción del gen *mecA*. (7)

Antibióticos

El término antibiótico fue acuñado por Selman Abraham Waksman (1888-1973), que lo definió como “toda sustancia química derivada o producida por microorganismos que tiene la capacidad, a bajas concentraciones, de inhibir el desarrollo o de destruir las bacterias u otros microorganismos”. Anteriormente, Erlich había definido la quimioterapia como “la parte de la farmacología que estudia las sustancias de composición química definida que se administra al organismo para combatir los estados infecciosos y destruir los bacterias causales, sin ser tóxicos ni perjudiciales para células y tejidos del organismo”. En los años 40 aparecieron en terapéutica los primeros antibióticos, penicilina y estreptomicina. La

investigación ha hecho posible el descubrimiento de numerosas sustancias con actividad antibiótica, sin embargo, solo una parte de ellas tiene uso clínico. ⁽¹⁾

Los antibióticos actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos. La especificidad de acción depende de que el fármaco bloquee una enzima o sustrato no presente en las células eucariotas humanas o sea suficientemente distinto. ⁽¹²⁾

Clasificación de antibióticos

Los antibióticos actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos. La especificidad de acción depende de que el fármaco bloquee una enzima o sustrato no presente en las células eucariotas humanas.

1. Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana

Con la excepción de la familia *Chlamydiaceae* (géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila*), *Mycoplasma*, *Ehrlichia* y *Anaplasma*, las bacterias poseen una pared externa constituida por al menos 2 capas de una estructura glucoprotéica denominada peptidoglucano, que les da forma y confiere resistencia osmótica. En la síntesis de este compuesto participan al menos 30 enzimas, que ejercen su función en compartimientos celulares distintos.

Mecanismo de acción

La unidad básica, sintetizada en el citoplasma celular y en la superficie interna de la membrana citoplasmática, está constituida por un disacárido de N-acetil-glucosamina y ácido N-acetil-murámico, en cuyo residuo de ácido murámico va enlazado un pentapéptido cuyos aminoácidos terminales son D-ala-D-ala (NacGlu-NacMur-5pep). Esta molécula se transporta hasta la superficie externa de la membrana citoplasmática tras la unión a un lípido conductor denominado fosfato de undecaprenilo. Una vez en el exterior, una serie de transglucosilasas alargan las cadenas glucídicas y enlazan el residuo de NacMur del nuevo precursor al residuo de NacGlu del peptidoglucano ya formado. Finalmente, las cadenas polisacáridas se unen entre sí mediante una reacción de transpeptidación que crea un enlace peptídico entre el cuarto residuo de D-alanina de los pentapéptidos de una cadena y un grupo amino libre del tercer aminoácido de los pentapéptidos de otra. Los centros catalíticos de estas 2 últimas actividades residen a menudo en lugares distintos de varias

enzimas bifuncionales, que se encuentran ancladas en la superficie externa de la membrana citoplasmática. Estas enzimas, junto a algunas otras que posibilitan reacciones auxiliares de carboxipeptidación, se conocen con el nombre de proteínas fijadoras de penicilina (PBP, siglas en inglés de *penicillin-binding proteins*). La denominación hace referencia a la propiedad que tiene una serina situada en el centro catalítico de las transpeptidasas y las carboxipeptidasas de formar un enlace covalente con el anillo betalactámico de penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Esta unión impide que el sustrato natural D-ala se fije a esa serina y determina la inhibición irreversible de la enzima. La resistencia a los betalactámicos es a menudo mediada por enzimas que abren el anillo betalactámico (betalactamasas), modificaciones de las PBP que reducen la afinidad por estos antibióticos o la incorporación de PBP supernumerarias sin afinidad por los betalactámicos, pero capaces de llevar a cabo las reacciones de transpeptidación.

Varias clases de antibióticos actúan inhibiendo la síntesis del peptidoglucano, ya sea por bloqueo directo del lugar catalítico de alguna enzima, o mediante la formación de complejos con determinados sustratos. Todos los betalactámicos actúan en el último paso de la síntesis del peptidoglucano, e inhiben las reacciones de transpeptidación catalizadas por varias PBP. Entre los antibióticos betalactámicos se encuentran: penicilina, ampicilina, dicloxacilina, cefalotina, cefotaxima, cefepime y cefuroxina.

2. Inhibidores de la síntesis proteica

Varios antibióticos inhiben la síntesis proteica y la mayoría lo hacen uniéndose a distintas bases nitrogenadas del ARN ribosómico (ARNr) que forman parte del centro de decodificación, del centro de formación de enlaces peptídicos (peptidiltransferasa) o de la región próxima de la entrada al túnel de salida del péptido recién sintetizado.

Mecanismo de acción

En el ribosoma bacteriano, el centro de decodificación se halla en una pequeña región del ARNr 16S de la subunidad 30S, mientras que el lugar de formación de péptidos y la entrada al túnel de salida de la proteína recién formada están constituidos por nucleótidos contenidos en un bucle del dominio V del ARNr 23S de la subunidad 50S. El ácido fusídico actúa por un mecanismo distinto, se une al factor de elongación G y estabiliza el complejo formado entre ese factor y el difosfato de guanosina, lo cual impide que el ARNr pueda

desplazarse desde el centro de decodificación al centro de formación de enlaces peptídicos. Constituye otra excepción la mupirocina, un antibiótico de uso exclusivamente tópico que inhibe la sintetasa de isoleucil-ARNt, una enzima que cataliza la formación de isoleucil-ARNt a partir de isoleucina y ARNt. La mupirocina impide la incorporación de isoleucina a los péptidos en formación y determina el bloqueo de la síntesis proteica.

Dentro de los antibióticos que inhiben la síntesis proteica se encuentran:

- **Aminoglucósidos** (ej. gentamicina). Los aminoglucósidos se unen a un lugar próximo al sitio catalítico del centro de decodificación, y originan un cambio de conformación de éste en virtud del cual aumenta su afinidad por moléculas de ARNt, cuyos anticodones no son las parejas apropiadas de los codones del ARNm. El resultado es una traducción errónea que posibilita la incorporación de aminoácidos equivocados.
- **Tetraciclinas:** Las tetraciclinas, incluida la recientemente introducida tigeciclina (una glucilciclina derivada de la minociclina), actúan también uniéndose al centro de decodificación en un lugar distinto al de los aminoglucósidos, e impiden la incorporación del ARNt o promueven su expulsión tras haberse fijado.
- **Macrólidos y cetólidos** (ej. eritromicina): Distintas bases del dominio V del ARNr 23S constituyen las dianas. Un mecanismo de resistencia que afecta con frecuencia a los macrólidos consiste en la metilación de las bases de adenina críticas y, en estas circunstancias, se produce resistencia cruzada a la clindamicina y se pierde la actividad bactericida de las estreptograminas. Los cetólidos poseen un punto de anclaje adicional a una adenina del dominio II del ARNr que, en general, les permite seguir bloqueando el túnel de salida, a pesar de que las adeninas del dominio V se hayan modificado.

3. Inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos

Estos antibióticos tienen como dianas específicas varias enzimas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos.

Dentro de los antibióticos que inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos se encuentran:

- **Quinolonas** (ej. levofloxacin): Las quinolonas impiden la reparación del ADN una vez cortado, lo cual conlleva una serie de respuestas que determinan la degradación

del genoma. El resultado es la muerte rápida de la bacteria. La diana primaria de las diversas quinolonas depende del derivado en cuestión y del tipo de bacteria. Por lo general, en los bacilos gramnegativos, la diana primaria es la girasa, mientras que en los cocos grampositivos es la topoisomerasa IV.

- **Rifamicinas.** Las rifamicinas se fijan a la subunidad beta de la polimerasa del ARN dependiente del ADN y bloquean la elongación de ARNm cuando ésta alcanza 2 o 3 nucleótidos.
- **Sulfamidas y trimetoprima.** Las sulfamidas y la trimetoprima interfieren en la síntesis de los ácidos nucleicos por un mecanismo diferente. Las bacterias, los protozoos y *Pneumocystis jirovecii* son incapaces de obtener ácido fólico del entorno y han de sintetizarlo. Las sulfamidas y la trimetoprima inhiben esta síntesis, lo cual interfiere en última instancia con la producción de nucleótidos, particularmente de timina. ⁽¹²⁾

Resistencia bacteriana

Para la década de 1950, con la aparición de una gama importante de antimicrobianos, se pensaba que virtualmente todas las infecciones bacterianas eran tratables con éxito. Poco tiempo después el mundo se vio obligado a abandonar esa idea, debido a la aparición de resistencias a antibióticos de patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*. Muchos han sido los factores que han contribuido al incremento de cepas multirresistentes a antibióticos, como su uso inadecuado, migración nacional e internacional que facilita la diseminación, entre otros.

El aumento de bacterias resistentes, ha aumentado el conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia antimicrobiana, por lo que se detectan nuevos blancos terapéuticos y se generan fármacos nuevos.

Los mecanismos de resistencia se pueden clasificar como: Resistencia intrínseca y resistencia adaptativa. Las bacterias pueden ser resistentes intrínsecamente a uno o más agentes antimicrobianos, pueden adquirir la resistencia por mutaciones de *novo* o por genes de resistencia de otros organismos, así como por adaptaciones metabólicas al fármaco.

Resistencia intrínseca: Pueden capacitar a la bacteria para que produzca enzimas que destruyan al fármaco antibacteriano, expresar sistemas de excreción que eviten que el fármaco alcance su blanco intracelular, modificar el sitio blanco del antimicrobiano o generar una vía metabólica alterna que evite la acción del fármaco.

La adquisición de material genético por las bacterias susceptibles a antimicrobianos de bacterias con resistencia ocurre a través de conjugación, transformación o transducción con transposones que a menudo facilitan la incorporación de genes de resistencia múltiple al genoma o plásmido. El uso de agentes antimicrobianos también crea una presión selectiva para el surgimiento de cepas resistentes. *S. aureus* es un ejemplo claro de esta situación. En la era previa a los antibióticos, la mortalidad de pacientes era del 80% al 70%, y para la década de 1940, con la llegada de la penicilina, el pronóstico de los pacientes con infecciones estafilocócicas era muy alentador. Sin embargo, ya desde 1942 se identificaron cepas resistentes, primero en los hospitales y después en la comunidad. Para la década de 1960, más del 80% de los estafilococos aislados eran resistentes a la penicilina. La resistencia a la penicilina está mediada por el gen *blaZ*, cuyo producto es la β -lactamasa, que hidroliza el anillo β -lactámico de la penicilina y lo inactiva, como se presenta en la figura 1. En la tabla 2 se presentan otros genes de *Staphylococcus aureus* que actúan contra los antibióticos.

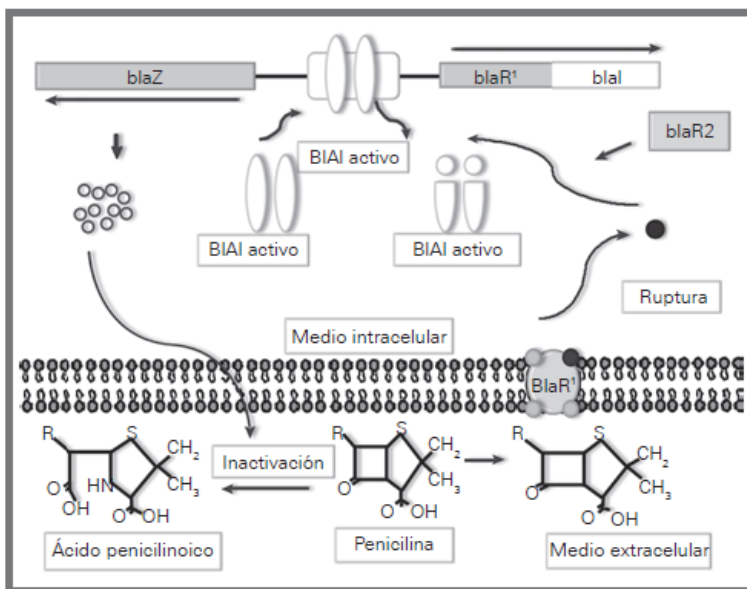


Figura 1: La resistencia a la penicilina está mediada por el gen *blaZ* que codifica para una β -lactamasa, ⁽²⁾

Tabla 2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en *S. aureus* y genes asociados. ⁽²⁾

| Antibiótico | Diana | Genes de resistencia | Mecanismo |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|
| β-lactámicos | β-lactamasa | <i>blaZ</i> | Hidrólisis enzimática del núcleo β-lactámico |
| | PBP2a | <i>mecA</i> | Baja afinidad para PBPs |
| Aminoglucósidos | RNAr 30S | <i>aacA-aphD, aadA, aadD,</i> | Modificación por acetiltransferasas, adeniltransferasas o |
| | | <i>aadD, aphA, aphC, spc, strA.</i> | alteración ribosomal de las fosfotransferasas |
| Glucopéptidos | Complejos D-Ala-D-Ala | <i>Desconocido</i> <i>vanA</i> | Secuestro por la pared celular |
| Macrólidos, lincosamidas | RNAr 50S | <i>ermA, ermB, ermC, msrA</i> | Metilación del RNAr. |
| | | | Bombas de expulsión |
| Sulfonamidas | Síntesis de ácido tetrahidrofólico | <i>sulA</i> | Sobreproducción de ácido paminobenzoico |
| Tetraciclinas | RNAr 30S | <i>tetA(K), tetA(L), tetA(M)</i> | Bombas de expulsión |
| | | | Protección ribosomal |
| Trimetoprim | Síntesis del ácido tetrahidrofólico | <i>dfrA</i> | Bypass, por una dihidrofolato reductasa |

Otro mecanismo de resistencia importante es evitar que el antibiótico se incorpore a la célula bacteriana y lo exporte activamente al medio extracelular, sin permitir el alcance de la molécula diana por el fármaco (bombeo de excreción [BE]). Los genes y proteínas de las BE están presentes en todos los organismos. En las bacterias, los genes que codifican las bombas se localizan en el cromosoma o los plásmidos. Existen cinco superfamilias de proteínas de BE:

- 1) Familia de caset de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés, ATP binding cassette)
- 2) Superfamilia del facilitador mayor (MFS, major facilitator superfamily)

- 3) Familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE, multidrug and toxic-compound extrusion)
- 4) Familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR, small multidrug resistance)
- 5) Familia de resistencia a división por nodulación (RND, resistance nodulation division)

Entre las bacterias grampositivas que expresan BE clínicamente relevantes se encuentran *S. aureus* y *S. pneumoniae*. La sobreexpresión de BE NorA (familia MFS) en *S. aureus* confiere resistencia a cloranfenicol y fluoroquinolonas, así como pigmentos y biocidas, como ceftrimida. De los antibióticos utilizados para el tratamiento de *S. aureus* susceptibles y resistentes a metilina, sólo fluoroquinolonas y ciprofloxacina son sustratos de NorA. Varios estudios han encontrado cepas aisladas resistentes a la fluoroquinolona y norfloxacina sobreexpresada NorA.

Resistencia adaptativa: En contraste con la resistencia intrínseca que resulta de mutaciones de genes propios de la bacteria o adquiridos de manera externa, la adaptativa es sobre todo fenotípica, aunque algunos factores genéticos predisponen al microorganismo a activar este mecanismo. Dentro de estas resistencias se encuentran las adaptaciones fenotípicas, sea por el estado metabólico de la bacteria, o por ser secundaria a su capacidad de producir biopelículas.

Las bacterias que no se están dividiendo no son eliminadas por los fármacos. Este fenómeno, que Walsh McDermott denominó “indiferencia al fármaco”, no se limita a la familia de antibióticos β -lactámicos. Las bacterias que no se dividen, y/o no tienen suficientes nutrientes para un metabolismo activo, son parcial o completamente resistentes a antibióticos bactericidas.

Es conocido que los antibióticos no eliminan a todas las bacterias aún en crecimiento activo. Conforme pasa el tiempo, el rango de eliminación declina en fracción sustancial de la población bacteriana que sobrevive al encuentro con ese fármaco. Este fenómeno se denomina persistencia bacteriana, resistencia adaptativa o tolerancia fenotípica. Se han propuesto varios mecanismos para explicar por qué deja de replicarse un subconjunto de

bacterias (SOS systems) y así adopta el fenotipo de resistencia. Otro mecanismo sería que, durante el curso de crecimiento, las poblaciones bacterianas incluyesen células en proceso de reparación de su ADN y no se estuviesen dividiendo, lo que generaría un fenotipo resistente.

Aunque los genes de resistencia y sus productos son los principales mecanismos de resistencia a antibióticos, existen otros menos explorados, como el relacionado con la producción de biopelículas. Las biopelículas son agregados adherentes que se forman en superficies bióticas o abióticas. Se ha demostrado que las cepas que producen biopelículas son significativamente más resistentes a antibióticos y agresores antimicrobianos, incluso con respuesta del hospedero. ⁽²⁾

Marco de

referencia



| | |
|--|--|
| <p>2002; Chile. Martín, V y colaboradores; Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. ⁽¹¹⁾</p> | <p>Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de Chile. Se encontró una resistencia en los antibióticos penicilina, ampicilina, amoxicilina y estreptomicina, en un promedio del 50% de las cepas aisladas.</p> |
| <p>2009; Bogotá, Colombia. Sánchez, G. y colaboradores; Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta. ⁽¹⁸⁾</p> | <p>Especialistas y epidemiólogos establecen perfiles de resistencia a antimicrobianos de <i>S. aureus</i> en pacientes humanos del 2000 al 2005. Se observa una resistencia a estos antimicrobianos en más del 85% de las cepas obtenidas. Cefalexina, Ciprofloxacina, Clindamicina y Trimetoprim-sulfametoxazol.</p> |
| <p>2009; Zaragoza, España. Ortega, C. y colaboradores; Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. ⁽¹⁵⁾</p> | <p>El departamento de Patología animal realiza un estudio de caracterización y riesgos para la salud pública de la antibiorresistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en la cunicultura intensiva. Se detecta una resistencia del 100% a tetraciclina, 60% a gentamicina, y un promedio de 50% a estreptomicina, clindamicina, eritromicina, norfloxacina, ciprofloxacina, amoxicilina, penicilina y ampicilina.</p> |
| <p>2010; Caracas, Venezuela. Borga, G. y colaboradores; Universidad Central de Venezuela y Hospital Universitario de Caracas. ⁽⁵⁾</p> | <p>En el Hospital Universitario de Caracas se realiza la comparación de frecuencia y resistencia bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> en infecciones nosocomiales de cepas aisladas en los años 2004 y 2007. Se observa un aumento de la resistencia del 50% en el antibiótico eritromicina y del 64% en ciprofloxacina entre las cepas obtenidas.</p> |

2010; Colombia.

Pérez, N. y colaboradores; Grupo de Investigación de Villavicencio del Hospital Departamental de Villavicencio. ⁽¹⁷⁾

En el Hospital Departamental de Villavicencio se comparan los perfiles de resistencia de antibióticos de cepas de *S. aureus* obtenidas de los años 2005 al 2009.

Se encontró un mayor grado de resistencia múltiple, especialmente para gentamicina, ciprofloxacina, clindamicina y eritromicina.

2011; Michoacán, México.

Bedolla, E. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ⁽³⁾

Se realiza un estudio en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, para determinar la resistencia a antimicrobianos en cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis.

Como resultado se encuentra que en un promedio el 25% de las cepas son resistentes a ampicilina y penicilina y del 10% a eritromicina.

2011; Córdoba, Argentina.

Pellegrino, M. y colaboradores; Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. ⁽¹⁶⁾

Realizan la evolución de resistencia a antimicrobianos en cepas de *S. aureus* obtenidas de vacas con mastitis.

El 58,7% de las cepas de *S. aureus*, mostraron resistencia *in vitro* a uno o más antibióticos como a eritromicina, penicilina y estreptomina; fueron sensibles a gentamicina, ampicilina/sulbactam, rifampicina y oxacilina.

Planteamiento

del problema



Staphylococcus aureus es el agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteriemia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genitourinario. Por su ubicuidad y en función de los procedimientos médicos y uso de antimicrobianos, se confiere especial énfasis al aislamiento y estudio epidemiológico de *S. aureus*, considerando su rol primordial en las infecciones nosocomiales.

En grandes centros médicos es una importante causa de infección nosocomial, difícil de erradicar cuando se ha introducido en los hospitales y su incidencia ha ido aumentando progresivamente.

El incremento de la incidencia implica un serio problema terapéutico. Estos microorganismos, con sus amplios patrones de resistencia, que incluyen agentes antibacterianos de diversos grupos, han estimulado la búsqueda de tratamientos alternativos constituyendo una extensa línea de investigación en los últimos años. Por lo general, la mayoría presenta resistencia a antimicrobianos como eritromicina, tetraciclina, estreptomycin y clindamicina. Los antibióticos glicopeptídicos han constituido una excelente herramienta terapéutica para estas infecciones, si bien ya se han descrito cepas resistentes. ⁽⁷⁾

Lo anterior nos motiva para analizar la comparación entre las sensibilidades a los antibióticos entre las cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de distintas fuentes.

¿Existe diferencia significativa entre la sensibilidad a antimicrobianos de las cepas obtenidas de humanos y animales?

Justificación



Varios factores han favorecido el incremento del número de animales de compañía, como: la demanda de mascotas para llenar espacios afectivos en los entornos familiares, el aumento en la capacidad económica de las clases sociales, permitiéndoles asumir gastos anteriormente no contemplados en su presupuesto y el fenómeno de desplazamiento de poblaciones campesinas desde las áreas rurales, trayendo consigo la cultura de la posesión de animales.

El aumento desmedido de mascotas en las ciudades plantea problemas de cohabitación, a la vez que requiere de la revisión de las interrelaciones que derivan de esta situación sus repercusiones en la salud pública y en la salud individual, para así establecer medidas necesarias para minimizar los factores de riesgo de zoonosis. Sin embargo, a pesar de las dificultades que pueda traer estas poblaciones masivas de animales es importante hacer una reflexión en torno al porque esta relación hombre-animal es tan estrecha lo que ha llevado a que las mascotas tengan una gran aceptación en la vida del ser humano.

Por tal motivo se debe establecer el comportamiento de las cepas que causan algún problema de salud en los animales de compañía y así determinar si son causados por cepas provenientes de humanos, o por cepas provenientes de otros animales informándonos la fuente de las cepas multirresistentes.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

- Comparación de sensibilidad a antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de muestras clínicas de humanos y 3 hospitales veterinarios

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar cepas de *Staphylococcus aureus* de muestras clínicas provenientes de humanos.
- Recuperar cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de muestreos de superficies inertes de 3 hospitales veterinarios.
- Realizar la sensibilidad de cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas.
- Realizar la comparación de los perfiles de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas aisladas.

Diseño de investigación

Tipo de estudio:

- Descriptivo
- Prospectivo
- Transversal
- Comparativo

Universo de estudio:

- Cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de humanos
- Cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de superficies inertes de tres hospitales veterinarios (obtenidas en el trabajo anterior: “Estudio microbiológico de superficies inertes, vivas, soluciones y ambiente en tres hospitales veterinarios para pequeñas especies de la ciudad de Puebla”)

Tamaño de la muestra:

- 100 muestras clínicas de humanos, para la búsqueda de *Staphylococcus aureus*
- 100 muestras de superficies inertes de tres hospitales veterinarios, para la búsqueda de *Staphylococcus aureus*

Criterio de inclusión

- Todas las cepas obtenidas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras clínicas de humanos y las obtenidas de las superficies de los hospitales veterinarios.

Criterios de exclusión

- Todas las cepas diferentes a *Staphylococcus aureus* obtenidas de las anteriores

Recursos humanos

- Ivan F. Hernández Cano
- M.S.P. Claudy L. Villagrán Padilla
- M. C. Patricia G. Suárez Albores

Metodología

1. CEPAS HUMANAS

Las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron obtenidas de las diversas muestras clínicas que se procesaron en el departamento de Microbiología.

2. CEPAS ANIMALES

- Las cepas de *Staphylococcus aureus* se obtuvieron de las superficies inertes de tres hospitales veterinarios.

La metodología de identificación será:

- † Tinción de gram: Se observaron cocos grampositivos
- † Prueba de catalasa: La prueba debe ser positiva.
- † Siembra y crecimiento en Agar Sal y Manitol: Las colonias obtenidas 24 horas después incubadas a una temperatura de 37°C serán de color amarillo, indicando la fermentación del manitol como primer punto de identificación a la especie de *S. aureus*
- † Siembra en Agar DNasa: La asada inoculada después de 24 horas después incubadas a una temperatura de 37°C, se revela con ácido clorhídrico al 0.1 N, después de 5 minutos se observará la turbidez en el medio y como prueba positiva un halo transparente alrededor de la asada del microorganismo.
- † Prueba de Coagulasa: Se realizó la prueba de coagulasa, utilizando plasma fresco de humanos. Se inoculó una asada de la bacteria y después de 3 horas de incubación a 37°C se leyó la prueba, esta será positiva si se observa la formación de un coágulo en el plasma.

Diagrama de trabajo 1: Pruebas de identificación y diferenciación de *Staphylococcus aureus*

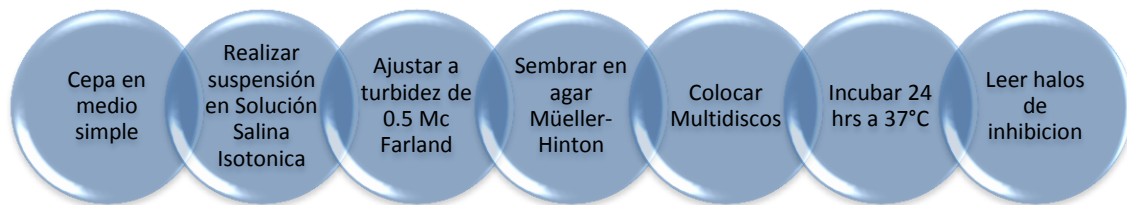


3. TÉCNICA MODIFICADA DE KIRBY BAUER

Se ocupó la técnica de difusión en agar, utilizando multidisco de antibióticos para grampositivos.

- i. Medio: Se utilizó como medio de siembra Agar Müeller-Hinton
- ii. Se hizo la suspensión del microorganismo en tubos con solución salina isotónica mediante el ajuste de turbidez en la escala de McFarland a 0.5 y se inoculó la placa en forma masiva con ayuda de un hisopo estéril.

Diagrama de trabajo 2. Técnica modificada de Kirby Bauer



4. COMPARACIÓN

Se realizó la comparación de los datos recolectados de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos, estos datos fueron los halos de inhibición de las cepas frente a los antibióticos empleados.

Resultados y

discusión



De las muestras clínicas de humanos

Se analizaron 16 cepas de *Staphylococcus aureus* que se obtuvieron de exudados faríngeos de niños, a las cuales posteriormente se les realizaron pruebas de sensibilidad contra distintos antibióticos utilizando la técnica modificada de Kirby Bauer. A continuación en la tabla 3 se presentan los porcentajes de sensibilidad y resistencia contra los antibióticos evaluados.

Tabla 3. Porcentaje de resistencia y sensibilidad a los antibióticos empleados frente a cepas obtenidas de humanos.

| Antibiótico | % Sensibilidad | % Resistencia |
|----------------------------|-----------------------|----------------------|
| Cefalotina | 100.00 | 0.00 |
| Levofloxacina | 93.75 | 6.25 |
| Gentamicina | 93.75 | 6.25 |
| Cefuroxima | 93.75 | 0.00 |
| Tetraciclina | 93.75 | 6.25 |
| Trimetoprim-sulfametoxazol | 93.75 | 0.00 |
| Cefotaxima | 68.75 | 31.25 |
| Eritromicina | 43.75 | 18.75 |
| Ampicilina | 12.50 | 87.50 |
| Cefepime | 6.25 | 43.75 |
| Dicloxacilina | 0.00 | 100.00 |
| Penicilina | 0.00 | 100.00 |

Como se puede observar en la tabla anterior (tabla 3), el 100% de las cepas fueron sensibles a cefalotina que es una cefalosporina de primera generación que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular, en contraste con una resistencia del 100% a los betalactámicos penicilina y dicloxacilina.

Comparando los resultados obtenidos con los reportados en otros estudios, se observan diferencias, éstas pueden estar en función de la cantidad de muestras analizadas, el origen de las muestras clínicas o la población. Con respecto a la eritromicina Borja y colaboradores en el 2010 reportan una resistencia a este antibiótico del 21%, resultado cercano al obtenido en este estudio (18.75%), y difiere al obtenido por Norton y colaboradores que en el mismo año reportan una resistencia del 31%. Sánchez y

colaboradores en el 2009, reportan una resistencia del 85% al antibiótico trimetoprim-sulfametozaxol y un año después Norton y colaboradores reportan una resistencia del 11.8% al mismo, estos datos contrastan al obtenido en este estudio, donde se observó una ausencia de la resistencia a este antibiótico (0%). Norton y colaboradores también evaluaron la resistencia contra gentamicina obteniendo el 25% de resistencia, en comparación con el obtenido en el trabajo cinco veces menor aproximadamente que el reportado por Norton (6.25%).

De los muestreos a 3 hospitales veterinarios

Se analizaron 13 cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de jaulas de animales de los hospitales veterinarios, a las cuales posteriormente se les realizaron pruebas de sensibilidad contra distintos antibióticos utilizando la técnica modificada de Kirby Bauer. A continuación en la tabla 4 se presentan los porcentajes de sensibilidad y resistencia contra los antibióticos evaluados.

Tabla 4. Porcentaje de resistencia y sensibilidad a los antibióticos empleados frente a cepas obtenidas de superficies inertes

| Antibiótico | % Sensibilidad | % Resistencia |
|----------------------------|-----------------------|----------------------|
| Cefalotina | 100.00 | 0.00 |
| Levofloxacin | 100.00 | 0.00 |
| Tetraciclina | 100.00 | 0.00 |
| Gentamicina | 100.00 | 0.00 |
| Eritromicina | 92.30 | 7.70 |
| Trimetoprim-sulfametoxazol | 92.30 | 7.70 |
| Cefuroxima | 84.61 | 0.00 |
| Cefotaxima | 69.23 | 0.00 |
| Ampicilina | 30.76 | 69.23 |
| Cefepime | 30.76 | 7.70 |
| Dicloxacilina | 0.00 | 100.00 |
| Penicilina | 0.00 | 100.00 |

Como se puede observar en la tabla anterior (tabla 4), las cepas mostraron frente a cefalotina, levofloxacin, tetraciclina y gentamicina el 100% de sensibilidad a estos antibióticos, y frente a los betalactámicos dicloxacilina y penicilina el 100% de resistencia.

Con respecto al antibiótico ampicilina, Ortega y colaboradores en el 2009 obtienen una resistencia del 50% en su investigación, cercano al obtenido en este trabajo (69.23%) y Bedolla en el 2011 reporta un resultado 3 veces menor (21.9%). Ortega también trabajó con los antibióticos de gentamicina obteniendo una resistencia del 60%, completamente diferente al obtenido en este trabajo (0%) y tetraciclina reportando un 100% de resistencia, un resultado totalmente distinto con el de este trabajo, donde se obtuvo una resistencia del 0%. Y por último Bedolla reporta una resistencia del 29% a la penicilina, Ortega reporta una resistencia del 50% al mismo y en este estudio se obtuvo una resistencia del 100% al antibiótico.

Tabla 5. Porcentaje de resistencia y sensibilidad a los antibióticos empleados frente a cepas obtenidas de muestras clínicas y superficies inertes

| Antibiótico | Muestras Clínicas | | Superficies Inertes | |
|----------------------------|-------------------|------------------|---------------------|------------------|
| | % Sensibilidad | % Resistencia | % Sensibilidad | % Resistencia |
| Ampicilina | 12.50 | 87.50 | 30.76 | 69.23 |
| Cefalotina | 100.00 | 0.00 | 100.00 | 0.00 |
| Cefepime | 6.25 | 43.75 | 30.76 | 7.70 |
| Cefotaxima | 68.75 | 31.25 | 69.23 | 0.00 |
| Cefuroxima | 93.75 | 0.00 | 84.61 | 0.00 |
| Dicloxacilina | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 100.00 |
| Eritromicina | 43.75 | 18.75 | 92.30 | 7.70 |
| Gentamicina | 93.75 | 6.25 | 100.00 | 0.00 |
| Levofloxacina | 93.75 | 6.25 | 100.00 | 0.00 |
| Penicilina | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 100.00 |
| Tetraciclina | 93.75 | 6.25 | 100.00 | 0.00 |
| Trimetoprim-sulfametoxazol | 93.75 | 0.00 | 92.30 | 7.70 |

En la tabla 5 se puede observar la comparación entre los porcentajes de sensibilidad y resistencia de los grupos de cepas ante los antibióticos empleados. Podemos observar que existen un 100% de resistencia de los dos grupos a los antibióticos dicloxacilina y a penicilina y una 100% de sensibilidad a los antibióticos cefalotina por parte de ambos grupos. Se observan comportamientos similares en la resistencia de los antibióticos ampicilina (87.5% vs 69.23%) y eritromicina (18.75% vs 7.70%). Y en el antibiótico cefepime se encontró una mayor resistencia por parte de las cepas obtenidas de muestras

clínicas (43.75%) casi 4 veces mayor en comparación con la resistencia de las cepas de superficies inertes (7.70%).

Dado que los anteriores resultados son importantes medicamente hablando, debido a que sirve para orientar sobre cuál es el antibiótico de mejor elección ante un microorganismo patógeno, se procedió a evaluar los halos de inhibición de cada grupos de bacterias obtenidas, realizando estadísticos para obtener la media aritmética y la desviación estándar de los halos frente a cada antibiótico de cada grupos de cepas trabajadas. Los resultados se presentan en las tablas 6 y 7 a continuación.

Tabla 6. Halos de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus* aislados de muestras clínicas de humanos frente a antibióticos

| Muestra | CF | LEV | E | AM | TE | SXT | CTX | GE | CXM | FEP | DC | PE |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|----|
| 1 | 34 | 34 | 9 | 17 | 36 | 34 | 26 | 22 | 20 | 12 | 0 | 0 |
| 2 | 40 | 32 | 22 | 22 | 26 | 30 | 24 | 24 | 30 | 16 | 0 | 0 |
| 3 | 35 | 30 | 20 | 26 | 24 | 30 | 26 | 18 | 32 | 16 | 0 | 0 |
| 4 | 30 | 34 | 0 | 13 | 26 | 32 | 30 | 18 | 36 | 18 | 0 | 0 |
| 5 | 24 | 32 | 20 | 10 | 26 | 30 | 22 | 18 | 30 | 16 | 0 | 0 |
| 6 | 26 | 10 | 24 | 0 | 24 | 22 | 22 | 0 | 30 | 14 | 0 | 0 |
| 7 | 22 | 28 | 24 | 0 | 26 | 14 | 20 | 20 | 24 | 10 | 0 | 0 |
| 8 | 28 | 32 | 24 | 13 | 26 | 32 | 22 | 20 | 30 | 16 | 0 | 0 |
| 9 | 36 | 26 | 24 | 26 | 24 | 32 | 30 | 20 | 30 | 15 | 0 | 0 |
| 10 | 24 | 24 | 20 | 10 | 10 | 32 | 25 | 20 | 28 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 25 | 25 | 23 | 14 | 24 | 25 | 30 | 20 | 30 | 14 | 0 | 0 |
| 12 | 25 | 30 | 20 | 11 | 26 | 30 | 20 | 20 | 30 | 15 | 0 | 0 |
| 13 | 30 | 30 | 24 | 15 | 24 | 30 | 30 | 24 | 30 | 16 | 0 | 0 |
| 14 | 30 | 28 | 22 | 30 | 26 | 30 | 30 | 20 | 30 | 16 | 0 | 0 |
| 15 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 20 | 0 | 0 |
| 16 | 25 | 30 | 0 | 14 | 24 | 30 | 30 | 20 | 30 | 15 | 0 | 0 |
| Media | 29.00 | 28.44 | 21.86 | 17.93 | 25.13 | 28.94 | 26.06 | 20.93 | 29.38 | 15.27 | 0 | 0 |
| Des Est | 5.11 | 5.71 | 4.55 | 7.34 | 5.05 | 4.89 | 3.97 | 3.10 | 3.40 | 2.31 | 0 | 0 |

CF= Cefalotina, LEV= Levofloxacina, E= Eritromicina, AM= Ampicilina, TE= Tetraciclina, SXT= Trimetoprim-Sultametoxazol, CTX= Cefotaxima, GE= Gentamicina, CXM = Cefuroxima, FEP= Cefepime, DC= Dicloxacilina, PE= Penicilina.

Dado que la desviación estándar de los datos nos indica que tan dispersos se encuentran nuestros datos analizados, se puede observar (tabla 6) que en el antibiótico de ampicilina hay mayor variación de los datos, al tener un dato menor “10” y un dato mayor “30”, lo que nos dice que las cepas se comportaron distintito a un mismo antibiótico. Y también se observa que en el cefepime la variación de los datos es menor siendo el dato menor “10” y el dato mayor “16”, lo que nos indica que se comportaron de manera similar las cepas ante el antibiótico.

Tabla 7. Halos de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus* aislados de muestras de superficies inertes frente a antibióticos

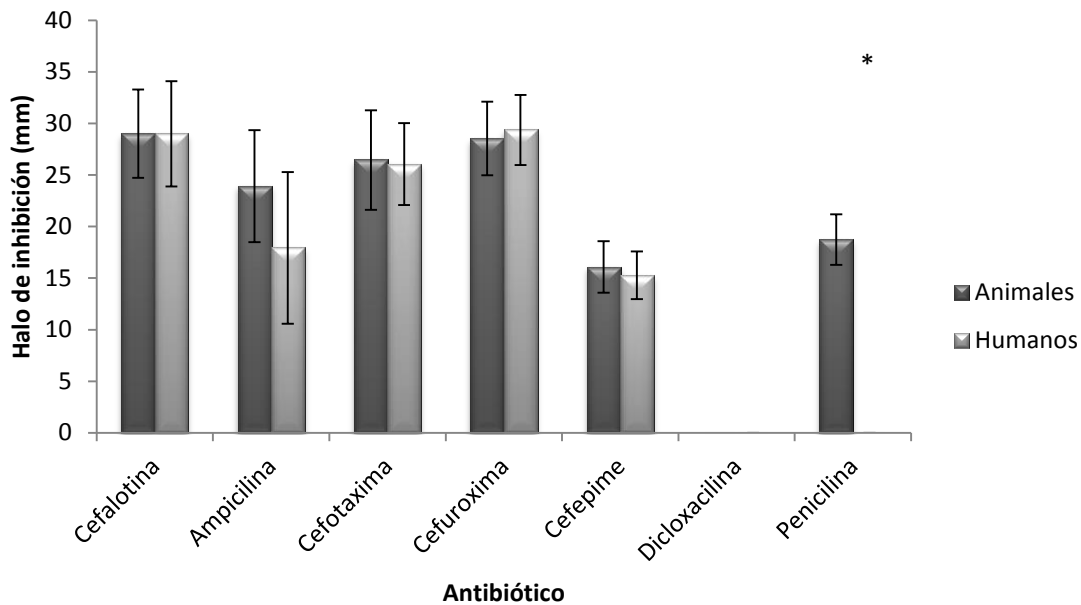
| Muestra | CF | LEV | E | AM | TE | SXT | CTX | GE | CXM | FEP | DC | PE |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|-------|
| 1 | 34 | 26 | 24 | 23 | 30 | 30 | 20 | 24 | 30 | 18 | 0 | 20 |
| 2 | 30 | 28 | 26 | 25 | 30 | 30 | 24 | 24 | 30 | 16 | 0 | 20 |
| 3 | 34 | 26 | 0 | 11 | 30 | 0 | 18 | 28 | 30 | 12 | 0 | 0 |
| 4 | 20 | 28 | 24 | 24 | 30 | 34 | 21 | 26 | 30 | 20 | 0 | 21 |
| 5 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 20 | 14 | 0 | 17 |
| 6 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 15 | 0 | 20 |
| 7 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 18 | 0 | 20 |
| 8 | 30 | 30 | 30 | 20 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 17 | 0 | 12 |
| 9 | 30 | 30 | 30 | 22 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 14 | 0 | 19 |
| 10 | 20 | 28 | 24 | 24 | 30 | 34 | 21 | 26 | 30 | 20 | 0 | 17 |
| 11 | 30 | 29 | 30 | 30 | 30 | 29 | 30 | 30 | 21 | 14 | 0 | 20 |
| 12 | 30 | 30 | 30 | 20 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 17 | 0 | 20 |
| 13 | 29 | 30 | 29 | 22 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 14 | 0 | 19 |
| Media | 29.00 | 28.85 | 28.08 | 23.92 | 30.00 | 30.58 | 26.46 | 28.31 | 28.54 | 16.08 | 0 | 18.75 |
| Des Est | 4.28 | 1.51 | 2.71 | 5.43 | 0 | 1.62 | 4.82 | 2.42 | 3.57 | 2.49 | 0 | 2.45 |

CF= Cefalotina, LEV= Levofloxacina, E= Eritromicina, AM= Ampicilina, TE= Tetraciclina, SXT= Trimetoprim-Sultametoxazol, CTX= Cefotaxima, GE= Gentamicina, CXM = Cefuroxima, FEP= Cefepime, DC= Dicloxacilina, PE= Penicilina.

En la tabla anterior (tabla 7) podemos analizar también el comportamiento de los datos, debido a la variación de los halos de inhibición, se observa que las cepas frente a la ampicilina tienen una mayor variación de datos ya que la desviación estándar es alta en comparación de los datos generados contra el antibiótico levofloxacina que muestra una

desviación estándar baja, indicándonos que esta última tiene una dispersión menor de los datos y se comportan de manera semejante ante el antibiótico. Mención aparte merece los datos generados por el antibiótico tetraciclina donde no se observa variación de los datos generando una desviación estándar de 0, dado que los datos son los mismos.

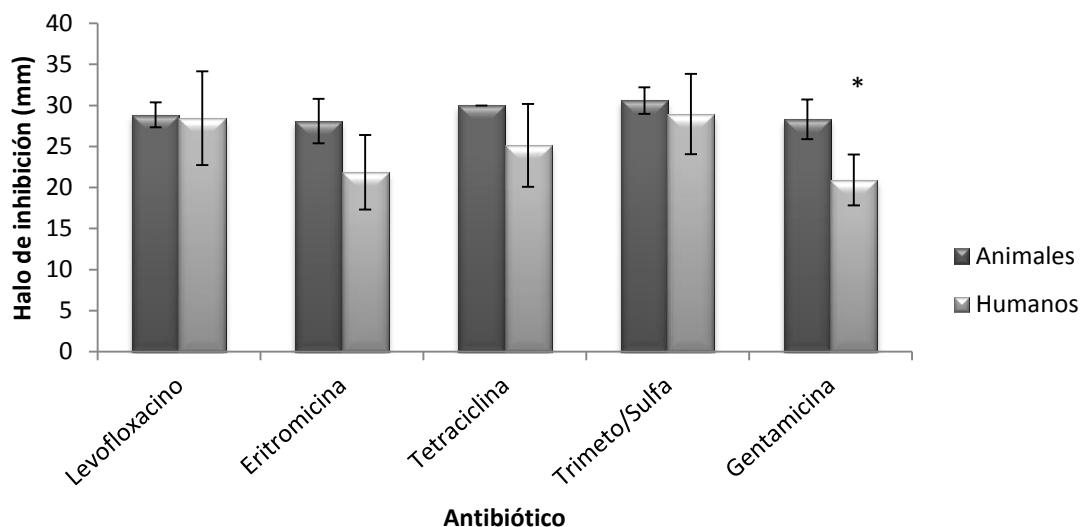
Gráfico 1. Comparación de los halos de inhibición mediante las medias aritméticas y desviación estandar



En el gráfico anterior (gráfica 1) podemos visualizar que las medias aritméticas de los halos de inhibición de cada uno de las cepas frente a los antibióticos cefalotina, cefotaxima, cefuroxima, cefepime y dicloxacilina son cercanos, por lo que se recurre al análisis con la media más/menos la desviación estándar para comparar si llegara a obtenerse alguna diferencia significativa y tal como se observa no existe ninguna diferencia significativa, por lo que se observa que las medias con los antibióticos antes mencionados son semejantes. En cuanto a la ampicilina, se observa una diferencia entre las medias de los halos de inhibición, por lo tanto se recurre de igual manera para comparar si existe diferencia significativa de las medias, al igual que en las anteriores no se observa diferencia significativa de las medias, por lo que se concluye que son semejantes. También podemos observar que la variación de los halos de inhibición obtenidos de las cepas de humanos es

mayor en comparación a las cepas obtenidas de superficies inertes. Y por último, en la comparación de la penicilina, se observa que existe una diferencia significativa de las medias, al no presentar halo de inhibición en las cepas obtenidas de humanos en comparación con las obtenidas de las superficies inertes. En el caso de las diferencias entre los halos frente a la penicilina, claramente se puede observar una resistencia total al antibiótico de parte de las cepas provenientes de muestras clínicas humanas, esto dado que *Staphylococcus aureus* posee y activa el gen *BlaZ*, que codifica una betalactamasa que destruye el anillo betaláctamico funcional del antibiótico y por tal motivo este no puede ejercer su acción en las bacterias.

Gráfico 2. Comparación de los halos de inhibición mediante las medias aritméticas y desviación estandar



En el gráfico anterior (gráfica 2) podemos visualizar que las medias aritméticas de los halos de inhibición de cada una de las cepas frente a los antibióticos levofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol son similares, por lo que se realiza el análisis comparando la media más/menos la desviación estándar y no se observa diferencia significativa de los halos de inhibición por lo que se concluye que son semejantes. En cambio con los halos de inhibición generados ante los antibióticos eritromicina, tetraciclina y gentamicina se

observa una diferencia mayor entre las medias, al igual que las anteriores se realiza el análisis y los resultados señalan que no existe diferencia significativa en los halos de inhibición generados frente a los antibióticos de eritromicina y tetraciclina, sin embargo en el antibiótico gentamicina si existe diferencia significativa por lo que se concluye que las medias de los halos frente a eritromicina y tetraciclina son semejantes y las medias de los halos frente a gentamicina son diferentes. Se puede notar también que las variaciones de los datos son mayores en las cepas de muestras de humanos que en la de superficies inertes.

Por lo anterior, podemos suponer que las cepas aisladas de las superficies inertes de los hospitales y las cepas obtenidas de las muestras clínicas de humanos se comportan de manera similar, al no haber diferencia significativa entre las medias aritméticas de los halos de inhibición frente a los antibióticos empleados.

Debido a que las superficies inertes (jaulas) están en mayor contacto con los animales que con el personal que labora en los hospitales, se puede suponer que estas cepas obtenidas provienen de los animales que estuvieron en los mismos, y al observar que se comportan de manera similar las cepas frente a los antibióticos se puede decir que éstas, fueron transmitidas por los humanos, afirmando así lo que redacta Morgan⁽¹³⁾ en su artículo: “...históricamente, las infecciones por *Staphylococcus aureus* en animales de compañía, implica cepas parecidas a las cepas de humanos, cuando se observaron en los perros se supuso que la propagación había sido desde el hombre a los animales...”, por lo que es importante realizar análisis molecular para conocer un poco más del comportamiento de los cepas estudiadas.

Conclusiones

- De las cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de humanos el 100% de fue sensible a cefalotina y el 100% fue resistente a dicloxacilina y penicilina
- De las cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de superficies inertes el 100% de fue sensible a cefalotina, levofloxacin, tetraciclina y gentamicina, y el 100% fue resistente a dicloxacilina y penicilina
- Existe una similitud de los halos de inhibición frente a los antibióticos empleados del 83%, una diferencia de los halos de inhibición frente a los antibióticos empleados del 17% por lo que se puede observar que existe una similitud entre las cepas obtenidas de muestras clínicas de humanos y de las superficies inertes de los hospitales veterinarios.
- Estadísticamente las cepas se comportaron de igual manera

Bibliografía

1. Ahumada, J., Santana, M., Serrano, J. (2002). Farmacología práctica. Editorial Díaz de Santos.
2. Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., Hernández, I. (2009) Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 29 (2): 70-76.
3. Bedolla, E. (2011). Tesis: *Resistencia antibiótica de Staphylococcus aureus aislados de leche de vacas con mastitis de Téjaro*, (Tesis doctoral inédita) Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo. Michoacán.
4. Bertrand, G., Carbajo, L., Fernández-Mardomingo, B., Mínguez, O., Rodríguez, E., Rojo, F. (2010). Enfermedades emergentes y reemergentes en sanidad animal y zoonosis. Madrid. Ed. Instituto Tomás Pascual Sanz.
5. Borga, G., Cabrera, G., Fernández, M., González, F., Silva, M., Caldera, J., Pitteloud, J. (2010). Frecuencia y resistencia bacteriana de *Staphylococcus aureus* en infecciones nosocomiales en el Hospital Universitario de Caracas, años 2004 y 2007. Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana. 15(1): 28-30.
6. Bustos-Martínez, J., Hamdan-Partida, A., Gutiérrez-Cárdenas, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Revista Biomed. 17:287-305.
7. Gil, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Revista Chilena Infectología. 17 (2): 145-152
8. Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K. (2006). The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. Prokaryotes. 4:5-75.
9. Hernández Betancourt, O., Ulloa Cuesta, Y., Méndez, D., Galdós, M. (2005). *Staphylococcus aureus* y su identificación en los laboratorios microbiológicos. Archivo Médico de Camagüey. 9 (1): 1025-0255
10. Koneman, E. (2006). Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology. 6° Edition.

11. Martín, V., Kruze, J., Morales, M., Agüero, H., Leon, B., Espinoza, S., Iragüen, D., Puga, J., Borie, C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Archivos Médicos Veterinarios*. 34(2): 221-234.
12. Martínez, J., Sánchez, F. (2007). Mecanismo de acción de los antibióticos. *Jano*. (Versión electrónica) N.º 1.660.
13. Morgan, M. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62, 1181–1187
14. Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2009). *Medical Microbiology*. 7º Edition.
15. Ortega, C., Simón, M., Alonso, J., Mateo, A. (2009). Caracterización y riesgos para la salud pública de la antibiorresistencia de *Staphylococcus aureus* en la cunicultura intensiva. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 28 (3), 1119-1128.
16. Pellegrino, M., Frola, I., Odierno, L., Bogni, C. (2011). Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. *Revista electrónica de Veterinaria*. (versión electrónica) 12(7).
17. Pérez, N., Pavas, N., Rodríguez, E. (2010). Resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos en un hospital de la Orinoquia Colombiana. *Asociación Colombiana De Infectología*. 14(3): 167-173.
18. Sánchez, G., Porras, L., Pedraza, A., Colorado, C. (2009). Perfil de resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en un centro de referencia nacional en dermatología. *Revista Panamericana Infectología*. 11(1):17-20.
19. Speare, R., Breinl, A. (2011). Understanding zoonotic disease: Minimising infection risk for animal management officers. *Annual Conference on Urban Animal Management*. (Versión electrónica)
20. Verdaguer, R. (2009). *Staphylococcus lugdunensis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(1): 33-36.