



Resistencia a meticilina y susceptibilidad a vancomicina de *Staphylococcus aureus* aislados de sangre

Jonathan Rodríguez-Pineda,^{a,†} José Juan Terrazas-Estrada,^b Elena Urdez-Hernández,^a Eva Aurora Hernández-Sánchez,^c Sandra Leticia Sánchez-Tejeda^d

Methicillin resistance and vancomycin susceptibility pattern among blood isolates of *Staphylococcus aureus*

Background: *Staphylococcus aureus* is capable of acquiring resistance against all antimicrobial agents. Vancomycin has been the cornerstone therapy for serious methicillin-resistant *S. aureus* infections. However, vancomycin treatment failures have been reported.

Methods: From March to August 2010, *S. aureus* blood isolates were included to determine methicillin-resistance and the vancomycin susceptibility by using a standard microdilution method. To detect methicillin-resistance, a Mueller-Hinton agar plate added with oxacillin 4 µg/mL and 2 % NaCl, and an agglutination test were used. Growth of *S. aureus* on the agar plate and/or reactive agglutination defined a methicillin-resistant organism. Vancomycin susceptibility was assessed by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) in Mueller-Hinton agar plates prepared with dilutions ranging from 16 to 0.5 µg/mL.

Results: A total of 25 blood-isolates of *S. aureus* were included. A 60 % was methicillin-resistant. All isolates were vancomycin-susceptible (MIC ≤ 2 µg/mL) showing the next MICs distribution: 48 % ≤ 0.5 µg/mL; 44 % 1 µg/mL, and 8 % 2 µg/mL.

Conclusion: The high proportion of methicillin-resistance among *S. aureus* and the presence of vancomycin susceptible phenotypes (MIC of 2 µg/mL) not only claim for an enforcement of standard precautions and antimicrobial control, but also for a regular surveillance of vancomycin susceptibility pattern using a reference method.

S. aureus (SA) ha demostrado que tiene una gran capacidad tanto para desarrollar resistencia a todos los antimicrobianos como para causarle infecciones graves al hombre, particularmente cuando la bacteria adquiere resistencia a la meticilina (SARM).¹ Para tratar estas infecciones, principalmente las nosocomiales, la vancomicina ha sido el glucopéptido de elección durante casi 50 años. Sin embargo, desde 1999 se están reportando casos de falla terapéutica^{2,3,4,5,6} entre pacientes infectados por SARM cuya concentración mínima inhibitoria (CMI) a vancomicina no solo se ha determinado como resistente (CMI ≥ 16 µg/mL) e intermedia (CMI 4-8 µg/mL), sino también dentro del rango de susceptibilidad (CMI ≤ 2 µg/mL). Aunque la disminución en la susceptibilidad al glucopéptido es un rasgo que suele ocurrir en la SARM, también puede generarse entre *S. aureus* sensibles a meticilina.⁷ Para determinar la resistencia a la meticilina y el perfil de susceptibilidad a vancomicina de *S. aureus* mediante un método de referencia, se efectuó el presente estudio.

Métodos

De marzo a agosto del 2010, se incluyeron los *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos, en el laboratorio de Bacteriología del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Los microrganismos se identificaron por el método estándar.⁸

La susceptibilidad a antimicrobianos se determinó mediante la dilución del antimicrobiano en agar, de acuerdo con los lineamientos del Instituto para los Estándares de los Laboratorios Clínicos (CLSI, por sus siglas en inglés).⁹

La meticilino-resistencia se investigó de dos formas. La primera, mediante una placa de agar Mue-

Keywords

Vancomycin resistance
Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

Palabras clave

Resistencia a la vancomicina
Staphylococcus aureus resistente a meticilina

^{a,†} Servicio de Infectología Adultos, Hospital de Infectología

^b Servicio de Infectología, Hospital de Especialidades

^c Sección de Bacteriología, Laboratorio Clínico, Hospital de Infectología

^d Sección de Bacteriología, Laboratorio Clínico, Hospital de Especialidades

Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal, México

Comunicación con: Elena Urdez-Hernández

Teléfono: (55) 5211 27 73

Correo electrónico: elena_urdez_hdz@yahoo.com.mx

Introducción: el *Staphylococcus aureus* es capaz de desarrollar resistencia a todos los antimicrobianos. La vancomicina es clave para tratar infecciones graves causadas por *S. aureus* meticilino-resistente. Sin embargo, últimamente se reportan fallas terapéuticas. El objetivo fue establecer la resistencia a la meticilina y el perfil de susceptibilidad a la vancomicina del *S. aureus*.

Métodos: de marzo a agosto del 2010, se determinó la meticilino-resistencia y la susceptibilidad a vancomicina de *S. aureus* aislados de hemocultivos, mediante el método estándar de microdilución. Para la meticilino-resistencia se utilizó una placa de agar Mueller-Hinton con 4 µg/mL de oxacilina, más NaCl al 2 % y una prueba de aglutinación. El desarrollo bacteriano o la aglutinación positiva identificaron al microorganismo

meticilino-resistente. Para la susceptibilidad a vancomicina se determinó la concentración mínima inhibidora (CMI) en placas de agar Mueller-Hinton con dilución de 16 a 0.5 µg/mL.

Resultados: en total se incluyeron 25 *S. aureus*. El 60 % fue meticilino-resistente; el 100 % sensible a vancomicina (CMI ≤ 2 µg/mL), con las siguientes CMI: el 48 %, ≤ 0.5 µg/mL; 44 %, 1 µg/mL; y el 8 %, 2 µg/mL.

Conclusión: la proporción alta de meticilino-resistencia y la evidencia de fenotipos sensibles a la vancomicina, pero asociados a falla terapéutica (CMI 2 µg/mL), demandan no solo el reforzamiento continuo de las precauciones estándar y el control de antimicrobianos sino también la vigilancia sistemática del patrón de susceptibilidad a la vancomicina con un método de referencia.

Resumen

ller-Hinton con sal analítica de oxacilina (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) a una concentración de 4 µg/mL más NaCl al 2 %. El inóculo se preparó a base de una suspensión equivalente al estándar 0.5 de MacFarland, de las bacterias estudiadas con 24 horas de desarrollo en gelosa sangre; se efectuaron diluciones para obtener un inóculo final de 1×10^4 UFC, el cual se depositó en la placa. Las cepas control fueron *S. aureus* ATCC 29213, meticilino-sensible, y *S. aureus* ATCC 43300, meticilino-resistente. Previo secado al aire, las placas se incubaron a 35 °C, durante 24 horas. El desarrollo de ≥ 1 UFC definió al aislado como resistente a la meticilina. La segunda determinación de resistencia se llevó a cabo al detectar la PBP2a codificada por el gen de la meticilino-resistencia (*mecA*), mediante la prueba Slidex MRSA, en la que partículas de látex sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal contra la PBP2a se pusieron en contacto con los microorganismos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (bioMerieux, Durham, North Carolina, Estados Unidos). La evidencia de aglutinación definió a la bacteria como meticilino-resistente.

La susceptibilidad a la vancomicina se determinó en placas de agar Mueller-Hinton con sal de vancomicina (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) diluida a concentraciones decrecientes de 16 a 0.5 µg/mL. Previa preparación de una suspensión equivalente al 0.5 de MacFarland, las placas se inocularon con 10^4 UFC de los aislados clínicos, con posterior incubación a 35 °C durante 24 horas. El *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, sensible a vancomicina, y *E. faecalis* ATCC 51299, también resistente a vancomicina, se incluyeron como controles. El crecimiento de al menos 1 UFC caracterizó al microorganismo como resistente. Las categorías consideradas fueron: sensible (CMI ≤ 2 µg/mL), intermedia (CMI de 4-8 µg/mL) y resistente (CMI ≥ 1 µg/mL) a vancomicina.

Resultados

Durante seis meses se detectaron 25 aislados de *Staphylococcus aureus* en hemocultivos. El 60 % de los estafilococos expresó resistencia a meticilina, tanto por su desarrollo en la placa de oxacilina como por aglutinación. Las CMI a vancomicina se distribuyeron de la siguiente forma: 48 %, ≤ 0.5 µg/mL; 44 %, 1 µg/mL; y 8 %, 2 µg/mL. La CMI50 y la CMI90 fueron de 1 µg/mL. Por lo tanto, los 25 aislados se categorizaron como sensibles a la vancomicina (CMI ≤ 2 µg/mL).

Discusión

Entre las bacteriemias nosocomiales, el *Staphylococcus aureus* ocupa los primeros lugares como agente causal, tanto en América como en Europa,¹⁰ con una morbilidad mayor cuando el microorganismo es resistente a meticilina.^{11,12} Por esto, la vancomicina se ha considerado de elección para tratar las infecciones graves causadas por el SARM desde hace más de cuatro décadas. Sin embargo, el decremento de susceptibilidad al glucopéptido en dichos microorganismos¹³ y la asociación con fallas terapéuticas^{3,4} han preocupado a los médicos durante los últimos años.

En el presente estudio se encontró que aunque un 60 % de los *S. aureus* aislados de sangre fue meticilino-resistente, el 100 % fue sensible a la vancomicina.

Con respecto a la meticilino-resistencia, la proporción encontrada fue mayor a lo observado en otras comunidades, como, por ejemplo, la Unión Europea, donde la tasa entre los países oscila de 1 a más del 40 %,¹⁴ y Australia, donde dicha proporción fue del 20 %.¹⁵ En México, la tasa reportada del 2000 al 2004, en el Instituto Nacional de Ciencias

Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, alcanzó el 45 %.¹⁶ Tal diferencia pudiera ser determinada por la flexibilidad con que se aplican las medidas de control epidemiológico intrahospitalarias, si se considera que los principales reservorios de SARM son los sujetos infectados o colonizados, y que la transmisión de la bacteria se lleva a cabo, predominantemente, de persona a persona.¹⁷ El método estándar para el control epidemiológico del SARM endémico implica las siguientes estrategias: identificar los portadores, eliminar los reservorios, detener la transmisión y reducir el uso de antibióticos.¹⁷ Aunque tales estrategias son complementarias, el apego estricto a las precauciones estándar (tercera estrategia), particularmente la desinfección de las manos de los trabajadores de la salud después de tener contacto con los pacientes o de manejar materiales contaminados, pudiera impedir la mayoría de transmisiones cruzadas del SARM, sin la necesidad primaria de identificar a los portadores. Sin embargo, el apego promedio del personal de la salud a la recomendación sobre la higiene de las manos se aproxima al 40 %.¹⁸ Por lo tanto, en comunidades donde las políticas de control del SARM incluyen el cribaje universal de este, combinado con aislamiento físico y descolonización del paciente portador, las tasas de bacteriemia por SARM se han reducido,¹⁹ mientras que en los países donde solo se aplican las precauciones estándar, dichas tasas se mantienen altas. Aumentar el apego por la higiene de las manos es una meta codiciada, pero difícil si se considera que los determinantes de dicha conducta, aunque han sido estudiados,²⁰ todavía no se han definido.

Con respecto a la susceptibilidad a la vancomicina, todos los estafilococos fueron sensibles. Sin embargo, la tasa de microorganismos con CMI $\geq 1\mu\text{g/mL}$ representó el 52 % (13 de 25). Esta proporción es inferior al rango de 86-92 %, referido por el Programa de Vigilancia Antimicrobiana del SENTRY (programa universal para monitorear las enfermedades infecciosas), durante 2002-2006, respectivamente, para otros centros médicos latinoamericanos.²¹ Tal diferencia pudiera estar determinada por dos características intrínsecas de las unidades médicas: la presión selectiva ejercida por el uso de la vancomicina o el método con el cual se determina la susceptibilidad a dicho antimicrobiano. La presión selectiva de la vancomicina data de 1958, cuando se aprobó su empleo en la clínica. Sin embargo, no fue sino hasta 22 años después que se inició el gradual incremento en la utilización del antimicrobiano, hasta 100 veces mayor de 1975 a 1995.²² Predominantemente, dos entidades clínicas han justificado el extenso empleo de la vancomicina, la colitis pseudomembranosa y las infecciones cau-

sadas por el SARM y el *Streptococcus pneumoniae*, que es resistente a penicilina.²³ En la primera, el glucopéptido parenteral se empezó a emplear oralmente antes de salir al mercado. En las segundas, particular importancia tienen las infecciones causadas por el SARM, para las cuales la vancomicina se ha considerado desde 1980 como el glucopéptido de elección en el tratamiento parenteral de las infecciones graves.²⁴ El procedimiento utilizado para determinar la susceptibilidad a la vancomicina depende de los recursos de las unidades médicas. El método de referencia es la dilución en caldo o en agar.⁹ Sin embargo, la prueba E y los métodos automatizados son los más utilizados en los laboratorios clínicos. Mientras que la prueba E categoriza los microorganismos susceptibles como “intermedios”, los métodos automatizados, como el Vitek 2, clasifican las bacterias con susceptibilidad intermedia como “sensibles a la vancomicina”.^{25,26}

Por consiguiente, ya que tanto en el presente trabajo como en el SENTRY la susceptibilidad a la vancomicina se determinó con el método de referencia, la menor proporción de los aislados con CMI $\geq 1\mu\text{g/mL}$ encontrada (52 frente a 86-92 %) pudiera relacionarse con una presión selectiva menor sobre la población bacteriana estudiada.

Finalmente, todos los aislados estudiados fueron sensibles a la vancomicina; sin embargo, el 8 % (2 de 25) mostró una CMI de 2 $\mu\text{g/mL}$. Este dato es relevante porque se evidencia la existencia actual de un fenotipo asociado con mayor mortalidad entre los enfermos con bacteriemia causada por SARM cuya CMI a la vancomicina es $> 1\mu\text{g/mL}$ cuando son tratados con dicho glucopéptido.⁶

Conclusión

Aunque son pocos los aislados estudiados, la proporción de meticilino-resistencia y la existencia de fenotipos sensibles a la vancomicina, pero relacionados con pobre respuesta terapéutica entre los pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* demandan no solo el reforzamiento continuo de las precauciones estándar y del control de antimicrobianos, sino también de la vigilancia sistemática del patrón de susceptibilidad a la vancomicina con un método de referencia.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno en relación con este artículo.

Referencias

1. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis. 2008;46 suppl 5:350-8.
2. Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, Perl TM, et al. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. United States, 1997-2001. Clin Infect Dis. 2003;36:429-39.
3. Howden BP, Ward PB, Charles PG, Korman TM, Fuller A, du Cros P, et al. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. Clin Infect Dis. 2004;38:521-8.
4. Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schentag I, Forrest A, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of Vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. J Clin Microbiol. 2004;42:2398-402.
5. Sievert DM, Rudrik KT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. Clin Infect Dis. 2008;46:668-74.
6. Soriano A, Marco F, Martínez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP, et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis. 2008;46:193-200.
7. Pillai SK, Wennersten C, Venkataraman L, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Karchmer AW. Development of reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2009;49:1169-74.
8. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM; 1999. pp. 264-82.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA, USA: CLSI; 2010.
10. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;50:59-69.
11. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2003;36:53-9.
12. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005;26:166-74.
13. Hussain FM, Boyle-Vavra S, Shete PB. Evidence for a continuum of decreased vancomycin susceptibility in unselected *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Infect Dis. 2002;186:661-7.
14. Tiemersma EW, Bronzwaer S, Lyytikäinen O, Degerter JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. Emerg Infect Dis. 2003;10:1627-34.
15. Douglas MW, Lum G, Roy J, Fischer DA, Anstey NM, Currie BJ. Epidemiology of community-acquired and nosocomial bloodstream infections in tropical Australian: a 12-month prospective study. Trop Med Int Health. 2004;7:795-804.
16. Sifuentes-Osornio J, Pérez-Patrigon S. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: la sombra de una amenaza permanente. Rev Invest Clin. 2006;58:598607.
17. Humphreys H, Grundmann H, Skov R, Lucet JC, Cauda R. Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2009;15:120-4.
18. Boyce JM, Pittet D. Guideline for hand hygiene in health-care settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Morb Mortal Wkly Rep. 2002;51:1-45.
19. Lawes T, Edwards B, López-Lozano JM, Gould I. Trends in *Staphylococcus aureus* bacteraemia and impacts of infection control practices including universal MRSA admission screening in a hospital in Scotland, 2006-2010: retrospective cohort study and time-series intervention analysis. BMJ Open. 2012;2:e000797.doi:10.1136/bmjopen-2011-000797.
20. De Wandel D, Maes L, Labeau S, Vereecken C, Blot S. Behavioral determinants of hand hygiene compliance in intensive care units. Am J Crit Care. 2010;19:230-9.
21. Picao R, Sader H, Jones R, Andrade S, Gales A. Analysis of resistance and vancomycin "reverse creep" in Latin American *Staphylococcus aureus*: ten-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2006). Clin Microbiol Infect. 2008; 14 suppl 7:173.
22. Kirst HA, Thompson DG, Nicas TI. Historical yearly usage of vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42:1303-4.
23. Levine DP. Vancomycin: a history. Clin Infect Dis. 2006;42 suppl 1:5-12.
24. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. Clin Infect Dis. 2011;52:e18-e55.
25. Swenson JM, Anderson KF, Lonsway DR, Thompson A, McAllister SK, Limbago BM. Accuracy of commercial and reference susceptibility testing methods for detecting vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2009;47:2013-7.
26. Toyokawa M, Francisco M, Nishi I, Sunada A, Ueda A, Sakata T, et al. Accuracy of commercial susceptibility testing method measuring vancomycin MIC against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Labmedicine. 2011;473-7.