

Primer informe de *Staphylococcus haemolyticus* con susceptibilidad reducida a vancomicina aislado de un paciente con neuroinfección neonatal en una institución mexicana

Jesús Reyna-Figueroa,* Araceli Ramírez-Landin, Graciela Villeda-Gabriel y Federico Javier Ortiz-Ibarra

Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología
"Dr. Isidro Espinosa de los Reyes", México, D.F., México

RESUMEN

La susceptibilidad reducida a vancomicina ha sido encontrada en estudios previos de aislamientos clínicos de pacientes con evolución médica inadecuada. Presentamos un caso con aislamiento de una cepa de *staphylococcus haemolyticus* con susceptibilidad reducida a vancomicina obtenida de un paciente recién nacido con neuroinfección a los 17 días de vida con evolución clínica adecuada después de 21 días de tratamiento. Se realizó análisis de susceptibilidad intermedia a 44 cepas de *staphylococcus coagulasa negativa* mediante las técnicas descritas por Wong (método de disco en agar adicionado con sal de vancomicina en concentración $\geq$ de 8 $\mu\text{g/ml}$ en el que se demuestra satelitismo alrededor de un disco de aztreonam). La cepa fue susceptible a vancomicina al analizar la sensibilidad por un método automatizado (Sistema MicroScan[®], Dade Behring).

Este es el primer informe de heteroresistencia en México y una alerta temprana de la posible emergencia de *staphylococcus* con algún tipo de resistencia a vancomicina.

Palabras clave:

Staphylococcus, sepsis, resistencia, vancomicina, meningitis, recién nacido

SUMMARY

Reduced susceptibility to vancomycin has been reported among clinical isolates of *Staphylococcus* in previous studies. The present study describes a heteroresistant *Staphylococcus* strain from the cerebrospinal fluid of a 17 day-old premature male infant with neonatal meningitis. Screening was done for 44 strains of coagulase-negative staphylococci using Wong's techniques (Disk-agar method with vancomycin-salt agar to demonstrate satellitism around an aztreonam disk). Strains were susceptible to vancomycin as disclosed by an automated antimicrobial susceptibility test (Microscan[®] System Dade Behring).

This is the first report of heterogeneous resistance to vancomycin in Mexico and an early warning for the possible emergence of vancomycin resistance among coagulase-negative staphylococcus in our country.

Keywords:

Susceptibility, staphylococcal, sepsis, resistance, Vancomycin, meningitis, newborns

Introducción

El término de heteroresistencia fue acuñado para definir la presencia de una pequeña subpoblación de bacterias que muestran resistencia en un cultivo y crecen más lentamente que las colonias susceptibles.¹ Esta expresión heterogénea puede conducir a un error de muestreo que comprometa la detección de resistencia en el laboratorio. Para los *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN), las cepas que desarrollan *in vitro* crecimiento en presencia de vancomicina, en particular a una concentración $\geq$ de 8 $\mu\text{g/ml}$ luego de haber sido sometidas a selección positiva con β -lactámicos, se consideraron heteroresistentes.¹⁻³

Este fenómeno ha sido reportado con especies de *Staphylococcus aureus* en diferentes regiones geográficas donde la vancomicina es el medicamento de elección para infecciones por estos agentes, dando como resultado el replanteamiento de los esquemas antimicrobianos que se utilizan en las unidades de cuidados intensivos.⁴⁻⁸

En *Staphylococcus*, el mecanismo exacto de resistencia a vancomicina aún no se conoce y no se ha logrado encontrar los plásmidos que codifican para el gen Van A.^{6,9,10}

Puede ser difícil detectar las células de crecimiento *in vitro* en un cultivo que expresa resistencia a vancomicina usando los métodos de susceptibilidad comunes; la prueba de Kirby Bauer (difusión en disco) y el método automatizado de Micro-

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Jesús Reyna Figueroa, Montes Urales 800, Col. Lomas Virreyes, Del. Miguel Hidalgo, 11000 México, D.F., México. Tel: (52 55) 5520-9900 Ext. 322.

Scan no son capaces de detectar estos aislamientos; por esta razón, los SCN aislados que se ven con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) a vancomicina de 8 a 16 µg/ml, son importantes para detectar heteroresistencia.¹¹⁻¹³

En la actualidad, se han reportado aislamientos de *S. haemolyticus* y *S. epidermidis* con disminución de susceptibilidad a glucopéptidos. En algunas poblaciones, los patrones de heteroresistencia a vancomicina están asociados con fallas terapéuticas y, de manera anecdótica, se ha comentado el tratamiento con esquemas potenciados con rifampicina tratando de disminuir la exposición de SCN a los glucopéptidos.¹³⁻¹⁷

En el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), los SCN representan entre el 43 y el 62% del total de los aislamientos en neonatos con sepsis, presentando cifras de morbilidad altas sobre todo en pacientes prematuros.¹⁸⁻²⁰

Hace 12 años que, en el INPer, se utiliza vancomicina como antimicrobiano de elección junto con cefotaxima ante la sospecha de infección sistémica nosocomial. Por ello es necesario saber si existen, en nuestro medio, cepas de SCN heteroresistentes a vancomicina.

Material y métodos

Se realizó, durante los años 2004 a 2005, un estudio observacional descriptivo en el que se incluyeron cepas de SCN aislados de hemocultivo y/o líquido cefalorraquídeo en pacientes recién nacidos atendidos en la unidad de cuidados intensivos neonatales y en la unidad de cuidados intermedios neonatales con sospecha de sepsis nosocomial (estancia intrahospitalaria mayor a 48 horas).

Para descartar contaminación y considerar únicamente las cepas procedentes de pacientes sépticos por SCN, se tomaron en cuenta los criterios de Mahieu²¹ creados para identificar sepsis nosocomial.

Se consiguió, de los recién nacidos seleccionados, muestra de sangre y de líquido cefalorraquídeo para cultivo, de acuerdo con el protocolo institucional del paciente con sospecha de sepsis. Se sembraron las cepas de ambas muestras en medio de cultivo de sangre de carnero para una incubación posterior en la estufa de CO₂ a 37° C. Las bacterias grampositivas catalasa positiva y coagulasa negativa se identificaron mediante el sistema de panel de identificación de MicroScan.

Detección de cepas con potencial heteroresistencia a vancomicina²²

Se preparó un agar con sal de vancomicina (adicionando 4 µg/mL de vancomicina y cloruro de sodio al 4%) en agar Muller-Hinton. El agar se colocó en cajas Petri de 85 mm con una profundidad de 4 mm. Un cultivo en agar sangre incubado durante la noche de los aislamientos se utilizó para preparar una suspensión bacteriana con una turbidez al 1 de McFarland en solución salina al 0.9%. El agar se inoculó con un hisopo de algodón dentro de la suspensión, presionando firmemente sobre el extremo del tubo para remover el exceso del hisopo. Cinco minutos después, se colocó un disco de aztreonam de 30 µg (BBL sensi-disco; Becton Dickinson) sobre la superficie

del agar. Las placas se incubaron a 37° C por 48 horas. Luego, para determinar la concentración mínima inhibitoria por E-test A, se picaron las colonias únicas sobre el agar con vancomicina que demostraron satelitismo alrededor del disco de aztreonam; se confirmó por macro dilución si la CMI de vancomicina por E-test fue ≥ 4 µg/mL.

Todo el procedimiento se reprodujo por completo dos veces como un medio de control para asegurar que los resultados fuesen confiables. Se tomó como control negativo una cepa de *S. aureus* (ATCC 25923).

Resultados

Cepas

Se encontraron 68 cepas de pacientes con hemocultivo o líquido cefalorraquídeo (LCR) positivo para SCN provenientes de pacientes sépticos de cuales 44 fueron escogidos para la búsqueda de heteroresistencia a vancomicina.

La distribución de las cepas encontradas fue la siguiente: *S. epidermidis* en un 70% de los casos, *S. hominis* en 11 %, SCN en 9%, *S. haemolyticus* en 6.8% y *S. warnerii* en 2%.

Treinta y dos cepas (73%) se aislaron en hemocultivo únicamente, mientras que doce cepas (27%) se aislaron tanto en hemocultivo como en líquido cefalorraquídeo.

Sensibilidad antimicrobiana

Por medio del método automatizado (MicroScan), se encontró resistencia a oxacilina en el 96% de las cepas (43), sensibilidad a vancomicina en el 100% con un 88% (39) de ellas con una concentración mínima inhibitoria < 2 µg/ml y, en el 12% (5), no se informaron puntos de corte, solamente como sensibles.

Heteroresistencia

Se encontró heteroresistencia únicamente en una cepa (2%) de *Staphylococcus haemolyticus* aislada en el año 2005 en el líquido cefalorraquídeo de un recién nacido, con 17 días de vida, que fue tratado por una enfermedad de membrana hialina debido a su prematuridad (30 semanas de edad gestacional), a su peso (970 gr) y a una madre con datos de corioamnionitis. El tratamiento inicial consistió en ampicilina y amikacina y se suspendió al tercer día por no presentar datos de respuesta inflamatoria sistémica. Posteriormente a los 10 días de vida, el recién nacido empezó a manifestar taquicardia, polipnea, hipotermia, presentando leucocitosis y plaquetopenia en la biometría hemática con LCR xantocrómico, proteínas de 116 mg, leucocitos de 29 con 80% de polimorfonucleares y 20% de mononucleares, glucosa de 25mg/dl. Se inicia manejo con vancomicina durante 21 días (debido a normas institucionales), presentando mejoría al cuarto día de manejo. El control de LCR, tomado 4 días después, fue negativo a crecimiento microbiano. El paciente es egresado de la UCIN y valorado en consulta externa donde se encuentra con asimetría postural, limitación de la rotación del cuello a la izquierda, limitación bilateral de la bufanda, exageración de la extensión de tronco,

hiperreflexia osteotendinosa y reflujo gastroesofágico y potenciales auditivos y visuales normales.

Discusión

Algunos autores han demostrado la existencia de cepas de *Staphylococcus aureus* con susceptibilidad disminuida a vancomicina. Esto ha llevado a que, en los últimos años, dicha búsqueda se haya extendido a cepas de SCN por el elevado porcentaje de infecciones sistémicas que se presentan, en unidades de cuidados intensivos neonatales, por causa de este agente. La preocupación mundial por el inminente cambio en la sensibilidad de SCN a vancomicina ha motivado la descripción de subcolonias que son capaces de crecer en medios adicionados con vancomicina, causa aparente de una mala evolución de pacientes que ameritan manejo más prolongado y, por consecuencia, hospitalizaciones prolongadas.¹⁻¹⁶

Debido a que, desde 12 años, se ha utilizado, en el Instituto Nacional de Perinatología, la vancomicina como medicamento de elección ante la sospecha de sepsis nosocomial y ante el aislamiento de SCN meticilino resistentes,¹⁸⁻²⁰ el principal objetivo de este estudio fue de buscar y demostrar la presencia en nuestro medio de cepas con heteroresistencia a vancomicina; esto se encontró en una cepa (2%) de *Staphylococcus haemolyticus*, porcentaje que corresponde a lo señalado por Van Der Zwet,²³ Wayne²⁴ y Garret²⁵ donde reportan entre un 2 y 4% de cepas con desarrollo de heteroresistencia.

Actualmente en algunos estudios, incluso del Centers for Disease Control and Prevention (CDC)²⁶ se proponen algunas medidas epidemiológicas cuando se aíslan *Staphylococcus* a partir de concentraciones mayores de 4 µg/ml.

A pesar de los resultados, la principal limitación observada en este estudio es el reducido número de cepas incluidas, por consecuencia el porcentaje informado puede modificarse de acuerdo con el tamaño de la muestra. Además, como se trabajó con algunas cepas almacenadas, la viabilidad puede verse afectada por lo que corremos el riesgo de haber dejado sin evaluar otras cepas heteroresistentes ya que se ha descrito que son más lábiles que las que no tienen esta propiedad.

Este primer acercamiento al fenómeno de heteroresistencia a pesar de las limitaciones ya mencionadas, es valioso por sí solo, debido a que se describe por vez primera en nuestro país este fenómeno.

Con el presente trabajo, se propone utilizar un diseño prospectivo con el fin de obtener resultados más confiables y asociarlos con la sintomatología clínica de los pacientes afectados y, además, de buscar la existencia de clonalidad de estas cepas de forma paralela.

En conclusión, se demuestra la presencia de cepas de *S. haemolyticus* heteroresistentes a vancomicina en nuestro medio, donde el porcentaje encontrado corresponde a lo informado en otros países por otros autores.

Referencias

- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki S, Kawasaki Y, Hosoda S, Hori Y, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strain of *Staphylococcus aureus* with heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997;350:1670-1673.
- Tenover FC, Lancaster MV, Hill CD, Steward SA, Stocker GA, Hancock CM O'Hara, et al. Hiramatsu Characterization of *Staphylococci* with reduced susceptibility to vancomycin and other glycopeptides. *J. Clin Microbiol* 1998;36:1020-1027.
- National committee for clinical laboratory Standards Performance standards for antimicrobial susceptibility testing NCCLS National committee for clinical laboratory standards Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Twelve international supplement M100-S12. Wayne, Pennsylvania NCCLS 2002.
- Jain A, Ben Ami T. *Staphylococcal* infections in children: Part 2 Pediatrics in review 1999;7:219-227.
- Sheagren JN. *Staphylococcus aureus*: the persistent pathogen. *N Eng J Med* 1984;310:1368-73.
- De Silva GD, Justice A, Wilkinson AR, Buttery J, Herbert M, Day NP, et al. Genetic population structure of coagulase negative staphylococci associated with carriage and disease in preterm infant *Clin Infect Dis J* 2001;33:1250-1258.
- Sonh AH, Garret DO, Sinkowitz Cochran RL, Gronhskopf LA, Levine GL, Stover BH, et al. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point prevalence survey. *J. Pediatr* 2001;139:821-827.
- Appelbaum P, Bozdogan B. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* Clinics in Laboratory medicine 2004;24:20-24.
- Sharma Rieder K, Jhonson LB, Kathib R. Molecular analysis of coagulase negative bacteremia. *Clin Infect Dis* 2001;33:1317-1323.
- Chambers HF. Methicillin resistance in *Staphylococci*: molecular and clinical basis and clinical implications. *Clin Microbiol. Rev* 1997;10:781-789.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical Strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:135-136.
- Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to Vancomycin and other Glycopeptides in *Staphylococcus aureus* Emerging Infectious Diseases 2001;7:327-332.
- Walsh TR, Bolstrom A, Qvarnstrom A, Ho P, Wootton M, Howe R, et al. Evaluation of current methods for detection of *Staphylococci* with reduced susceptibility to glycopeptides. *J. Clin Microbiol* 2001;39:2439-2444.
- Vermont CL, Hartwigth Fleer NG, Verbrugh H, Van Der Anker. Persistence of clones of Coagulase negative *Staphylococci* among premature neonates in neonatal intensive care unit two center study of genotyping and patient risk factors. *J. Clin Microbiol* 36;2485-2490.
- Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin resistance in *Staphylococci*. *Clinical Microbiology reviews* 2002;15:430-438.
- Archer GL, Climo MW. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci with reduced susceptibility. *Antimicrobials Agents and chemother* 1994;38:2231-2237.
- Liu C, Chambers HF. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin epidemiology Clinical significance and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrobial Agents Chemother* 2003;47:3040- 3045.
- Reyna FJ, Briseño VR, Ortiz IFJ. Validación de la escala NOSEP-1 para el diagnóstico de sepsis nosocomial en recién nacidos prematuros menores de 1500 gr. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2005;62:321-328.
- Reyna J, Ortiz FJ, Castro L, Limón AE. Identificación de marcadores clínicos y de laboratorio en recién nacidos de pretérmino con diagnóstico de meningitis bacteriana neonatal. *Perinatología y Reproducción Humana* 2005;19:22-28.
- Reyna J, Ortiz FJ, Limón AE, Plazola NG. Meningitis bacteriana en recién nacidos experiencia en el Instituto Nacional de Perinatología de 1990 a 1999. *Bol Med Hosp. Infant Mex* 2004;61:401-411.
- Mahieu ML, de Muynck OA, de Dooy JJ, Laroche MS, Van Acker JK. Prediction of nosocomial sepsis in neonates by means of a computer-weighted bedside scoring system (NOSEP score). *Crit Care Med.* 2000;28:2026-2033.
- Wong SS, Ho PL, Woo PC, Yuen KY. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance *Clinical Infectious diseases* 1999;29:760-767.
- Van Der Zwet WC, Debets Ossenkopp YJ, Reinders E, Kapi M, Savelkoul PH, Van Elburg RM, et al. Nosocomial spread of *Staphylococcus capitis* strain with heteroresistance to vancomycin in a neonatal intensive care unit *J clin Microbiol* 2002;40:2520-2525.
- Wayne PS, Raymundo O, Heusler H, Brhunn JB, Suntrarachun S, Kelly N, et al. Molecular epidemiology of *Staphylococcus Coagulase negative* bacteremia in a newborn intensive care unit *J Hosp Infect* 2002;51:33-42.
- Garrett DOE, Jochimsen K, Murfit B, Hill S, Mc Allister P, Nelson RV, et al. The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1999;20:167-170.
- Center for disease control and prevention 2002; Vancomycin resistance *Staphylococcus aureus* United States MMWR 51:902.