UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

Aislamiento de cepas de Staphylococcus meticilino-resistentes en infecciones intra y extrahospitalarias

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Gilberto Alejandro Mendoza Rojas

ASESOR

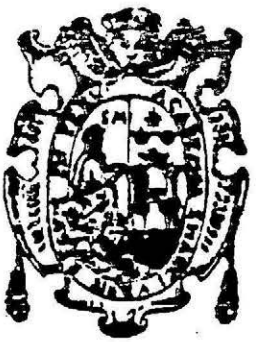
Dolores Bazalar de Valdivia

Lima – Perú

1998

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, Decana de América)
ESCUELA DE POST GRADO

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
UNIDAD DE POST GRADO



AISLAMIENTO DE CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS METICILINO-RESISTENTES EN INFECCIONES INTRA Y EXTRAHOSPITALARIAS

T E S I S

PARA OPTAR EL GRADO ACADEMICO DE

MAGISTER EN MICROBIOLOGIA

Bach. **GILBERTO ALEJANDRO MENDOZA ROJAS**

LIMA - PERU

1998

A mis queridos Padres quienes me enseñaron que la mayor satisfacción, es el deber cumplido y ennoblecieron sus esfuerzos en la vida, por la superación de sus hijos.

A mi esposa Maru con mucho amor, por su apoyo constante, por la calidez de su cariño y su comprensión infinita; hechos que me dan fuerza para seguir en el difícil y anhelado camino de la superación.

A mis hijos Thais y Diego con mucho cariño a ellos que representan el anhelo del ayer, la alegría de hoy y nuestra esperanza del mañana.

Mi gratitud sincera por el apoyo a la realización de esta tesis a: Dr.- Luis Loza H. Dra. Isabel Martos P., Dr. Gerson Paredes C., y a todos mis amigos que de alguna manera participaron en el desarrollo de esta Tesis.

A la Dra. Dolores Bazalar de Valdivia Mi **Profunda Gratitud** por su permanente apoyo y asesoría, quién no escatimó esfuerzos para brindar sus oportunos conocimientos para la culminación de este trabajo de investigación.

Mi Agradecimiento a los miembros del Jurado de Tesis, por sus consejos y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

Dr. Gerardo Gamarra Ballena
Dr. Víctor Velezmoro Lártiga
Dra. Dolores Bazalar de Valdivia
Dra. Luisa Negron Ballarte
Mag. Américo Castro Luna

ASESORA

DRA. DOLORES BAZALAR DE VALDIVIA

Prof. Principal D.E. del INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA. FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA UNMSM.

SUMARIO

	Pag.
Resumen	
Introducción	
I. MARCO TEÓRICO	
Antecedentes	1
Bases Teóricas	3
1.1 Enzimas y Toxinas	3
1.2 Manifestaciones Clínicas	7
1.3 Antimicrobianos Y Antibióticos	12
1.4 Mecanismo de acción de los Antimicrobianos	14
1.5 Mecanismo de Resistencia a los Antibióticos	22
1.6 Betalactamasas	29
1.7 Principales caracteristicas Farmacológicas de la Meticilina y Oxacilina	40
II.- OBJETIVOS	
2.1. Objetivo General	42
2.2. Objetivos Específicos	42
III.- METODOLOGIA	
3.1 Materiales y Métodos	43
3.2 Métodos	44
IV.- RESULTADOS	48
V .- DISCUSION	65
VI.- CONCLUSIONES	69
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	71

RESUMEN

Se ha realizado una investigación de microbiología clínica, con el objetivo de determinar la resistencia de cepas de Staphylococcus a la meticilina en ambientes intrahospitalarios y ambulatorios.

Se recolectaron 254 muestras provenientes de secreciones urocultivos, hemocultivos, líquido pleural y punta de cateter; se realizó la identificación bioquímica correspondiente y se determinó de la susceptibilidad mediante los métodos Dilución en agar (MIC) y difusión en agar (Antibiogramas-K-B).

Se hallaron diferencias altamente significativas de resistencia de cepas de S. aureus a la meticilina.

Se halló mayor frecuencia de Staphylococcus aureus meticilino resistentes (SAMR) intrahospitalarios (67.2) en relación a los SAMR ambulatorios (29.3). Estas diferencias fueron altamente significativas ($p< 0.01$) a la prueba estadística de chi cuadrado.

Los SAMR coagulasa (-) intrahospitalarios presentan mayor frecuencia (42.2) que los SAMR coagulasa (-) ambulatorios (20.5), estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p<0.05$) a la prueba del chi cuadrado.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los métodos MIC y Kirby-Bauer empleados en la presente investigación.

PALABRAS CLAVE: Staphylococcus Meticilinoresistentes
Meticilina/ Oxacilina
Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)
Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)

SUMMARY

It has been done a microbiological investigation with the purpose of determine the presence of meticilinoresistant staphylococcus cluster in hospital or ambulatory level. There were analice 109 samples of patients interne in three hospitals of Lima City in 145 samples of ambulatory patients who came from a private clinic analysis laboratory. The cluster were identify from its biochemical patterns and than it was procede to determine the sensibility of Meticilina and Oxacilina with diffusion methods in disc (Kirby Bauer) and the diffusion method in agar, minimum inhibitory concentration (MIC), respectively.

It was found between 51.9% and 53.5% of meticilinoresistant staphylococcus when used Oxacilina and Meticilina, respectively with the Kirby Bauer method. 39.4% of meticilinoresistant staphylococcus was detected with the MIC method, using Meticilina.

There were found significant differences of susceptibility to Meticilina and Oxacilina of staphilococcus aureus cluster from hospital and ambulatory origin, respectively($p<0.01$). The other staphylococcus cluster did not present significant differences in resistence to Meticilina according to the procedence of the sample.

There were found highly significant differences($p<0.01$) between the resistance of staphylococcus cluster according to the detection methods used (Kirby Bauer and MIC).

KEY WORDS: Meticilinoresistant staphylococcus
Meticilina & Oxacilina
Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
Diffusion methods in disc (Kirby Bauer)

INTRODUCCION

El uso de agentes antimicrobianos ha permitido la disminución de la mortalidad y morbilidad mundial por enfermedades producidas por microorganismos susceptibles; sin embargo este progreso es acompañado del desarrollo de resistencia bacteriana a dichos agentes.

Frecuentes evaluaciones se realizan para actualizar e intercambiar información acerca de los factores regionales de susceptibilidad antimicrobiana ante la emergencia de cepas resistentes de diversas especies bacterianas y se profundiza cada vez más la investigación de los mecanismos de resistencia de los patógenos más comunes, por investigadores y organizaciones nacionales y multinacionales.

Uno de los géneros bacterianos que mayores problemas de resistencia ocasiona es el Staphylococcus, tanto el S. aureus como las otras especies coagulasa negativo, a los antibióticos penicilínicos o beta-lactámicos y esto genera en la actualidad muchos problemas de terapéutica antimicrobiana.

El propósito de la presente investigación ha sido la determinación de los estafilococos meticilino-resistentes en infecciones intrahospitalarias y ambulatorias, para dicho efecto se recolectó 254 muestras procedentes de pacientes que acudieron a 3 centros de hospitalización de la ciudad de Lima y muestras de pacientes ambulatorios que acudieron a un Laboratorio de Análisis Clínicos Privado.

Las principales muestras tomadas fueron secreciones urocultivos, hemocultivos, líquido pleural y punta de cateter, se aislaron en Agar manitol salado y se procedió a su identificación bioquímica realizando pruebas como la de degradación de manitol, catalasa, hemolisis, presencia de pigmento, reducción de nitratos, presencia de ureasa, resistencia a la polimixina y prueba de coagulasa.

El objetivo general de la presente investigación fué determinar la prevalencia de Staphylococcus meticilinoresistentes en muestras de pacientes hospitalizados y ambulatorios .

Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar las especies de Staphylococcus en las muestras en estudio y el grado de resistencia a la Meticilina y la Oxacilina por el Método de Difusión en Agar .
2. Determinar la sensibilidad de los Staphylococcus a la Oxacilina (Método MIC).
3. Comparar los métodos de detección de Staphylococcus meticilino resistentes por la técnica de Difusión en Agar (K-B) Vs. La técnica de dilución en Agar (MIC).

Posteriormente se procedió a determinar la resistencia a la meticilina/oxacilina, usando las técnicas de dilución en agar (concentración mínima inhibitoria-MIC) y la de difusión en agar (Antibiogramas-K-B).

Los resultados encontrados, permitieron comprobar la hipótesis principal de la presente investigación, confirmándose que las cepas de Staphylococcus proceden de ambientes intrahospitalarios, son significativamente más resistentes que las cepas procedentes de pacientes ambulatorios.

La presente investigación permite conocer el estado actual de los estafilococos meticilino-resistentes, tanto dentro de los hospitales como fuera de ellos y por consiguiente permitirá mejorar el criterio de elección de antibióticos en el tratamiento de infecciones estafilocócicas.

I. MARCO TEORICO

1.1. ANTECEDENTES

BROCK y Col. 1993, señalaron que los staphylococcus son células esféricas Grampositivas que suelen estar distribuidas en grupos irregulares a manera de racimo de uvas, desarrollan con facilidad en diversos medios de cultivo, y son activos desde el punto de vista metabólico; fermentan los carbohidratos y producen pigmentos que varían desde el color blanco hasta el amarillo intenso. Algunos son miembros de la flora normal de la piel y de la mucosas del hombre; otros producen supuración, formación de abscesos, diversas infecciones piógenos e incluso septicemia mortal.

En 1996 JAWETZ y Col (14) afirmaron que los staphylococcus patógenos hemolizan a menudo los glóbulos rojos, coagulan el plasma y producen diversas enzimas y toxinas extracelulares. Un tipo común es el que se presenta en los alimentos causando intoxicaciones debido a la producción de la enterotoxina estafilocócica termoestable (6,14).

En 1993 DROBNIC. (9) menciona que Los estafilococos desarrollan con rapidez resistencia a muchos agentes antimicrobianos y plantean problemas terapéuticos difíciles, aspecto que es reafirmado por BROCK:1993 (6) JAWETZ: 1996 (14).

De acuerdo a SANCHEZ H, (1997) el género Staphylococcus tiene por lo menos 30 especies. Las tres especies principales de importancia clínica son Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis y Staphylococcus saprophyticus. Staphylococcus aureus es coagulasa positivo, lo cual lo diferencia de otras especies. S.

aureus es un patógeno principal del ser humano. Casi todas las personas tendrán algún tipo de infección por S. aureus durante su vida, cuya intensidad va desde la intoxicación alimentaria, infecciones cutáneas menores a infecciones graves que ponen en peligro la vida. Los estafilococos coagulasa negativos pertenecen a la flora humana normal y a veces ocasionan infecciones, a menudo asociadas con la implantación de dispositivos, especialmente en pacientes muy pequeños, o muy viejos, e inmunocomprometidos (24).

BOUZA (5) en el año 1998 realizó un estudio multicentrico sobre la prevalencia de Staphylococcus en España y encontró que cerca del 75% de estas infecciones fueron causadas por Staphylococcus **coagulasa negativos** tales como S. epidermidis. Las infecciones causadas por Staphylococcus warneri, Staphylococcus homonis, y otras especies son menos comunes. S. saprophyticus es una causa relativamente frecuente de infección en las vías urinarias en mujeres jóvenes. Según BROCK (6) Y SANCHEZ (24) otras especies son importantes en medicina veterinaria . (6,24)

PRINCIPALES ESPECIES DE STAPHYLOCOCCUS

A.- COAGULASA (+) :	S. aureus
B.- COAGULASA (-) :	S. epidermidis
-S. capitis	S. saprophyticus
- S. warneri	S. haemolithycus
S. homonis	S. xylosus
S. saccharalyticus	S. cohnu
	S. simulans

1.2 . BASES TEORICA CIENTIFICAS

Los estafilococos pueden producir enfermedad tanto por su capacidad para multiplicarse y extenderse con amplitud por los tejidos, así como por la producción de sustancias denominadas enzimas y otras se consideran toxinas, aunque pueden funcionar como las anteriores. Muchas de las toxinas se encuentran bajo el control genético de los plásmidos; algunas están incluso bajo los 2 controles cromosómico y extracromosómico. En otros casos no se ha podido definir aún bien el mecanismo de control genético (14).

ENZIMAS Y TOXINAS BACTERIANAS

A. CATALASA.

Los estafilococos producen catalasa, que convierte al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba de la catalasa diferencia a los Staphylococcus de otras especies bacterianas como los Streptococcus.

B. COAGULASA

El Staphylococcus aureus produce coagulasa, proteína de tipo enzimático que coagula al plasma oxalatado o citratado en presencia de un factor sérico reacciona con la coagulasa para generar tanto enterasa como actividades de la coagulación, de una manera semejante a la activación de la protombina hasta trombina. La acción de la coagulasa supera la cascada plasmática normal de la coagulación. La coagulasa puede depositar fibrina sobre la superficie de los estafilococos, con lo que quizá altere su ingestión por las células fagocíticas y una destrucción dentro de dicha células.

Se considera que la producción de coagulasa es sinónima del potencial invasor patógeno.

C. OTRAS ENZIMAS

Otras enzimas producidas por los Staphylococcus son la hialuronidasa o factor de extensión, estafilocinasa que da por resultado fibrinólisis, pero que actúa con una lentitud mayor que la estreptocinasa; proteínas, lipasas y B - lactamasas.

D. EXOTOXINAS

Entre las exotoxinas algunas son enzimas y son mortales para los animales por vía inyectable , las que producen necrosis de la piel y que contienen hidrolisinas solubles que pueden separarse por inmunoelectroforesis. La toxina alfa (hemolisina) es una proteína heteróloga que puede producir lisis de los eritrocitos y lesionar las plaquetas, y es probablemente idéntica a los factores mortales y dermonecróticos de la exotoxina. La toxina alfa tiene una acción tóxica sobre el músculo liso vascular. La toxina beta degrada a la esfingomielina y es tóxica para muchas clases de células, incluso los eritrocitos humanos. Estas toxinas y otras dos, las toxinas gamma y delta, son antigénicamente distintas y no guardan relación con las lisinas estreptocócicas. La exotoxina tratada con formol, produce un toxoide no venenoso pero antigénico, no presentando aun utilidad clínica.

E. LEUCOCIDINA

Esta toxina de S. aureus puede matar a los leucocitos expuestos de muchos animales. No está clara su función en la patogenia, porque los estafilococos patógenos no matan quizá a los leucocitos y pueden ser fagocitados con tanta eficacia como las variedades no patógenas. Sin embargo, son capaces de lograr una multiplicación intracelular muy activa, en tanto que los microorganismos no patógenos tienden a morir dentro de las células. Los anticuerpos contra la leucocidina puede desempeñar una función en la resistencia a las infecciones recurrentes por estafilococos.

F. TOXINA EXFOLIATIVA

Esta toxina de Staphylococcus aureus está constituida por lo menos por dos proteínas que producen la descamación generalizada del síndrome estafilocócico de piel escaldada. Hay anticuerpos específicos que protegen al sujeto contra la acción exfoliativa de la toxina. (6,14).

G. TOXINA DEL SINDROME DE CHOQUE TOXICO

En la mayor parte de las cepas de Staphylococcus aureus aisladas de pacientes con Síndrome de shock tóxico, este es producido por una toxina llamada toxina 1 (TSST-1), "toxic shock syndrome toxin"1. La TSST-1 es el superantígeno prototípico que produce las manifestaciones diversas del síndrome de choque tóxico. En el ser humano, la toxina se asocia con fiebre, shock y afección en diversos órganos y sistemas múltiples, incluyendo el

exatema descamativo. En conejos, la TSST-1 produce fiebre, aumento en la susceptibilidad a los efectos de lipopolisacáridos bacterianos, y otros efectos biológicos similares al síndrome de shock tóxico, pero presentan exantema y descamación. (14,24)

H. ENTEROTOXINAS

Hay por lo menos seis toxinas solubles designadas de la A la F producidas por casi 50% de las cepas de Staphylococcus aureus. Como es el caso con la TSST-1, las enteroxinas con superantígenos que se fijan a moléculas de MHC de clase II, produciendo estimulación de la célula T. Las enterotoxinas son termoestables (resisten la ebullición durante 30 minutos) y resisten a la acción de las enzimas intestinales. Causas importantes de la intoxicación por alimentos, son las enterotoxinas producidas por S. aureus cuando desarrollan en alimentos constituidos por carbohidratos y proteínas. (14).

El gen de producción de enterotoxinas se encuentra sobre el cromosoma, pero puede haber un plásmido que lleve a la proteína y que regule la producción activa de esta toxina. La ingestión de 25ug de enterotoxina B por el hombre o el macaco da por resultados vómitos y diarrea. Probablemente el efecto emético de la enterotoxina sea resultado de estimulación del sistema nervioso central (centros de vómitos) una vez que la toxina ha actuado sobre los receptores neurales del intestino. Las enterotoxinas se pueden investigar mediante pruebas de precipitina (difusión en gel). (6,19)

MANIFESTACIONES CLINICAS

Los Staphylococcus, en particular S. epidermis, son miembros de la flora normal de la piel y las vías respiratorias y gastrointestinales del hombre. De 40 a 50% de los seres humanos son portadores nasales de S. aureus. Los estafilococos se encuentran también con regularidad en las ropas personales, las ropas de cama y otros fomites de los ambientes humanos. (14,19)

La capacidad patógena de una cepa determinada de S. aureus es el efecto combinado de los factores y toxinas extracelulares simultáneamente con las propiedades invasoras de la cepa. En un extremo de espectro de la enfermedad está la intoxicación por alimentos producidos por estafilococos y se puede atribuir solamente a la ingestión de la enterotoxina preformada, están además la bacteremia estafilocócica y abscesos diseminados por todos los órganos. (6,14,24).

Staphylococcus aureus patógeno, invasor, produce coagulasa y tiende a producir un pigmento amarillo y es hemolítico. Los estafilococcos no patógenos, no invasores como S. epidermidis, son coagulasa-negativos tienden a no ser hemolíticos. Estos microorganismo pocas veces producen abscesos, pero pueden afectar prótesis ortopédicas o cardiovasculares o causar enfermedad en persona con afección inmunitaria. Sapiophyticus es, de manera típica, un microorganismo no pigmentado, resistente a la novobiocina y no

hemolitico; puede producir afecciones de las vías urinarias en mujeres jóvenes. (14,24)

El prototipo de la lesión estafilocócica es el furúnculo o cualquier otro abceso cerrado localizado. Los grupos de S. aureus establecidos en el folículo piloso, producen necrosis tisular(factor dermonecrótico). Se produce coagulasa que coagula a la fibrina alrededor de la lesión y dentro de los linfáticos, y da por resultado formación de una pared que limita el proceso y queda reforzada por la acumulación de células inflamatorias y más tarde, el tejido fibroso. Dentro del centro de la lesión ocurre licuefacción del tejido necrótico (fomentada por la hipersensibilidad retrasada), y el absceso hace "punta" en la dirección de la menor resistencia. El drenaje del tejido necrótico central líquido va seguido por llenado lento de la cavidad por tejido de granulación y, por último, cicatrización (6,14).

Se puede producir también infección por S.aureus por contaminación directa de una herida, por ejemplo, infección estafilocócica post operatoria herida o infección después de traumatismo (osteomielitis crónica subsecuente a una fractura abierta, meningitis después de fractura de cráneo) (3,5,6).

TRATAMIENTO

La mayoría de las personas albergan estafilococos en la piel, y vías respiratorias superiores. Como los microorganismos patógenos se

extienden a menudo desde la lesión (por ejemplo, desde el furúnculo) hacia otras regiones de la piel, los dedos y la ropa, es importante la asepsia local escrupulosa para controlar la furunculosis recurrente (2, 8).

Se pueden producir a menudo infecciones cutáneas múltiples según el tipo de acné y de furunculosis.

Otras infecciones cutáneas semejantes se producen en pacientes farmacos dependientes. Que reciben tratamientos prolongados de corticosteroides. En caso de acné, las lipasas de los estafilococos y las corinebacterias liberan ácidos grasos desde los lípidos y, por tanto, producen irritación tisular. Se puede emplear tetraciclinas para el tratamiento a largo plazo (12,14)

Bacteremia, endocarditis, neumonía y otras infecciones graves causadas por S. aureus requieren tratamientos intravenoso prolongado con penicilina resistente a la β- lactamasa. A menudo se reserva la vancomicina para los staphylococcus resistentes a la nafciclina. Si se encuentra que la infección es causada por S. aureus no productor de β- lactamasa, el fármaco de elección será la peniciclina G, pero sólo un pequeño porcentaje de cepas de S. aureus son sensibles a este antibiotico (6,8,9,12,24)

A causa de la frecuencia de cepas resistentes a los antibioticos, deben someterse diversas pruebas de aislamiento a los estafilococos importantes en busca de su susceptibilidad antimicrobiana para ayudar

a la elección de los fármacos que se van a administrar para el tratamiento (1,5,10,12,22).

La resistencia que presentan a la eritromicina tiende a aparecer con tanta rapidez que no deben utilizarse estos de manera indiscriminada para tratar infecciones crónicas. La resistencia a los antimicrobianos ejemplo, penicilina, tetraciclina, aminoglucósidos, eritromicina, etc producida por los plásmidos se puede transmitir entre los estafilococos por transducción o por conjugación (6,7,14).

Las cepas de Staphylococcus aureus resistentes a la penicilina aisladas de infecciones clínicas producen siempre enzimas como penicilinasa. Reportandose en la actualidad cerca de 90% de cepas aislados de Staphylococcus aureus en comunidades de Estados Unidos son resistentes (9,19,22,24).

EPIDEMIOLOGIA

Los estafilococos son bacterias que ocasionan enfermedad tanto en humanos como en animales en forma diseminada. Las fuentes principales de infección son las lesiones y vías respiratorias y la piel del hombre. (6,14)

La diseminación de la infección por contacto ha adoptado mayor importancia en los hospitales debido a que el personal y los pacientes son los que transportan estafilococos.

En los hospitales las zonas de mayor riesgo de infecciones estafilocócicas graves son las salas de cunas neonatológicas, las

unidades de cuidados intensivos, la sala de operaciones y la sala de quimioterapia del cáncer. El personal con lesiones activas de Staphylococcus aureus y los portadores deberían de ser excluidos de estas áreas. En este personal es posible disminuir la contaminación de microorganismos peligrosos mediante tratamiento y el uso de desinfección apropiada. (18,21,24)

Es reconocida la capacidad de los microorganismos gran positivos de producir enzimas que inactivan los antibióticos beta-lactámicos.

La presión antibiótica por uso masivo o inadecuado de los beta-lactámicos se mostró como factor preponderante de la selección de resistencia bacteriana mediada por beta-lactamasas. Este fenómeno adquiere características particulares acordes a la política antibiótica desarrollada en los distintos centros asistenciales.

Se puede observar importantes variaciones de los porcentajes de resistencia a un antibiótico en el transcurso del tiempo, y de hecho se ha logrado llevarlo a tasas normales después de un tiempo de suspendido su uso (14).

Una política de antibióticos adecuada y el control de los mismos en los centros de hospitalización tiende a reducir los fenómenos de resistencia por presión antibiótica.

Desde hace muchos años se viene describiendo un aumento de aislamiento de S. aureus productores de beta-lactamasas en infecciones nosocomiales. Investigaciones actuales reportan el

aumento del porcentaje de S. aureus resistentes a penicilina en un 58 a 86% aproximadamente en un período de 29 años (5,14,19).

En este trabajo nos hemos planteado realizar, el aislamiento e identificación de cepas de Staphylococcus resistentes a la meticilina en muestras intrahospitalarias y ambulatorias; con la finalidad de determinar el avance de este tipo de staphylococcus en nuestro país; además, conocer si la procedencia de la muestra influye en la resistencia de cepas de estafilococos meticilino resistente en infecciones intrahospitalarias y ambulatorias.

En este trabajo nos hemos planteado, el aislamiento de los esfilococos resistentes a la meticiclina de muestras procedentes de pacientes hospitalizados y de pacientes ambulatorios, de la ciudad de Lima; usando los métodos de dilución en agar (MIC) y de difusión en agar (antibiograma).

1.2. ANTIMICROBIANOS-ANTIBIOTICOS

Se denomina antimicrobiano a toda sustancia de origen natural, sintética o semisintética, que actúa inhibiendo los microorganismos a una dilución elevada, y ejerce su acción a nivel molecular en un proceso metabólico o en una estructura concreta de un microorganismo (16). En un principio, los antimicrobianos se obtuvieron a partir de otros microorganismos, por lo que se creó el concepto de antibiosis o antibióticos; al poderse sintetizar totalmente en el laboratorio, las sustancias se denominaron quimioterápicos; abarcando hoy el

concepto de antimicrobiano tanto a los antibióticos como a los quimioterápicos. (16)

Para que un antimicrobiano actúe, es necesario que se fije a una estructura específica del microorganismo, que se denomina "órgano diana". El efecto puede ser letal (bactericida, viricida), o simplemente se inhibe la multiplicación del microorganismo (bacteriostático, virostático). Ambos efectos no sólo dependen del tipo de antibiótico, sino también de otros factores como la concentración del mismo, la especie bacteriana, la afinidad o el inóculo bacteriano. (9,16)

Un antimicrobiano debe cumplir los siguientes requisitos, que lo diferencian de los antisépticos y desinfectantes:

Especificidad, o actuación sobre determinados microorganismos, que constituyen su "espectro de acción".

Elevada potencia, es decir que actúe a muy pequeñas concentraciones. Ello se expresa en la denominada Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) o Bactericida (MBC). El MIC es la más baja concentración del antimicrobiano, expresada en microgramos por mililitro (o miligramos por litro), capaz de inhibir el crecimiento de una bacteria. El MBC mide no sólo la inhibición, sino también la destrucción bacteriana.

Toxicidad selectiva, que debe ser muy alta para los microorganismos susceptibles, y muy baja o nula para las células eucariotas humanas. Si la toxicidad es alta, se dice que el margen de seguridad del antibiótico es bajo. (12, 16, 23).

MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIMICROBIANOS

A continuación, se exponen los principales mecanismos de acción de los antimicrobianos que actúan sobre las bacterias (antibacterianos, habitualmente conocidos como antibióticos).

1.1. Inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana

Para comprender el mecanismo de acción a este nivel, es necesario conocer la síntesis del peptidoglicano. Esta tiene lugar en cuatro etapas en tres zonas: citoplasma, membrana citoplásmica y pared.

Actúan sobre la síntesis a nivel de **citoplasma**, los siguientes antibióticos: la **fosfomicina**, un análogo estructural del fosfoenolpiruvato que se une competitivamente a la piruviltransferasa, y la **D-cicloserina**, que inhibe a las enzimas d-alanina-racemasa y a la D-alanil-D-alanina-sintetasa. (12, 16)

En la **membrana citoplásmica**, la **bacitracina** inhibe la pirofosfatasa, faltando lípido transportador regenerado, para unirse a nuevas moléculas de UDP-NAM-pentapéptido. Más interesantes son los antibióticos **glucopéptidos**, como la vancomicina y la teicoplanina, que impiden la transferencia del peptidoglicano lineal a la pared, al fijarse sobre el extremo acil de la D-alanin-D-alanina; son de gran utilidad en las infecciones por bacterias grampositivas resistentes a otros antibióticos. (14, 16)

En la pared celular, en la fase de formación de puentes entre polímeros actúan los antibióticos betalactámicos, que lo hacen

sobre unas proteínas inmersas, por su C-terminal, en la cara externa de la membrana citoplásmica, denominadas fijadoras de penicilina (Penicillin Binding Proteins o PBPs), que tienen actividad transpeptidasa, carboxipeptidasa o transglicolasa. (9, 16)

Existen diversas PBPs, que se diferencian por su peso molecular, variando su número y cantidad de moléculas de unas a otras especies bacterianas. Están descritas numerosas PBPs con distintas funciones enzimáticas y relacionadas con aspectos morfológicos: PBP-1 (a y b) con actividades de transpeptidasas y transglicolasas, conocida como factor de elongación que, al ser inhibida, da lugar a esferoplastos y lisis celular; PBP-2 (a, b y x) con función de transpeptidasa, conocida como factor de conformación que determina la forma de la bacteria, su inhibición provoca la aparición de células globulosas; PBP-3 con actividad de transpeptidasa y transglicolasa llamada factor de segmentación o división o de formación de tabiques, al ser inhibida determina bacterias filamentosas no tabicadas. Estas PBPs 1,2 y3 son conocidas como esenciales, a diferencia de otras como PBP-4, 4´´, 5 y 6, de actividad carboxipeptidásica que, aunque importantes, no lo son tanto para la síntesis de una mureína configurada plenamente. Cada betalactámico actúa específicamente sobre una o varias PBPs y, como no todas las bacterias tienen las mismas, se comprende el que, hasta cierto punto, estos antibióticos tengan una cierta especificidad de

acción; así por ejemplo, los monobelactámicos actúan sobre PBP-3, imipenem sobre 1ª, 1b y sobre todo sobre la 2, la benzilpenicilina sobre la 1ª y así sucesivamente. (10, 14, 16)

Las características comunes de los antibióticos que actúan a nivel de la pared bacteriana son las siguientes: se comportan como bactericidas en fase de crecimiento o formación de la pared; producen esferoplastos, que se lisan rápidamente; no afectan a bacterias sin pared, como los micoplasmas; y son muy poco tóxicos para el hombre, ya que las células humanas no tienen peptidoglicano. Pueden ser antagonistas de los antibióticos bacteriostáticos. Al tener más peptidoglicano, los betalactámicos serían más útiles sobre las bacterias grampositivas, pero la introducción de diversos radicales en su estructura química, les ha proporcionado una excelente actividad también sobre las gramnegativas. (12, 14)

1.2. Inhibidores de la membrana citoplásmica

Los antimicrobianos pertenecientes a este grupo son bactericidas, pero por la semejanza estructural con la membrana de los eucariotas, son muy tóxicos.

Así, los **ionóforos** (gramicidina, tirociclina), que actúan alterando la transferencia de cationes, u otros que inhiben los sistemas de transporte enzimático, no pueden usarse en clínica humana.

Los **antibiótico polipeptídicos** (polimixina B, colimicina), actúan como detergentes catiónicos, desorganizando la membrana y alterando la barrera osmótica, saliendo por ella el potasio, aminoácidos, azúcares, metabolitos y nucleótidos. Las bacterias gramnegativas son más sensibles a estos antibióticos.(12, 14)

Los **antibióticos pdienólicos o poliénicos**, tienen escasa actividad frente a las bacterias, pero muy intensa sobre los hongos y las levaduras (nistatina, anfotericina B). Actúan sobre los esteroles, preferentemente sobre el ergosterol de la cubierta de dichos microorganismos. (5, 6, 14)

Los derivados imidazólicos actúan inhibiendo la C14-demetilación del lanosterol, paso muy importante en la síntesis del ergosterol de los hongos (clotrimazol, ketoconazol). (16)

1.3. Inhibidores de la síntesis proteica

En las distintas fases de este proceso, regido por el ADN bacteriano y ejecutado por los tres ARN, el mensajero (ARNm), el de transferencia (ARNt) y el ribosómico (ARNr) con sus dos subunidades 30S y 50S, pueden actuar diversas familias de antibióticos.

Los **aminoglucósidos** actúan en la formación del complejo de iniciación, sobre la subunidad 30S, en diversas proteínas S, a las que se fija de forma irreversible (bactericidas), impidiendo la

lectura idónea del mensaje genético y la entrada del primer aminoácido-ARNt (formilmetionina-ARNt), dando lugar a proteínas sin sentido.

Las tetraciclinas se unen a la fracción 30S, bloqueando la entrada de nuevos aminoácidos-ARNt al lugar A del ribosoma. La fijación parece tener lugar a la proteína S16 de la fracción 30S. Son bacteriostáticos.

El **cloranfenicol** es un antibiótico bacteriostático, que se une a la proteína L16 de la subunidad 50S, impidiendo el enlace peptídico en el sitio A del ribosoma por un mecanismo igual a las lincosamidas, pero fijándose a una proteína próxima, también con actividad peptidiltransferasa. (12,16).

Las **lincosamidas** (lincomicina, clindamicina) inhiben la transpeptidación o "salto" del péptido desde el peptidil-ARNt, situado en el sitio P al aminoacil-ARNt localizado en el lugar A, debido a un cambio configuracional de la proteína del sitio P de acción peptidiltransferasa. Son bacteriostáticos.

Sobre la translocación actúan los antibióticos **macrólidos**. Se fijan al sitio P de la subunidad 50S impidiendo el paso del peptidil-ARNt del lugar A al P, mediante la unión a ciertas proteínas. Habitualmente son bacteriostáticos, pero a dosis altas (por ejemplo, en el interior de las células del sistema retículo-endotelial) son bactericidas. (14,18)

El antagonismo entre cloranfenicol, lincosamidas y macrólidos, se debe a que cuando uno se ha fijado a una proteína dificulta espacialmente la fijación de otro por la proximidad de los puntos de acción. (16,27).

1.4. Inhibidores de la síntesis de cofactores metabólicos

La síntesis de los nucleótidos (y, por ello, de los ácidos nucleicos) tiene lugar a partir de unos precursores, en presencia de ácido folínico. Este ácido se sintetiza a partir del ácido fólico o pteroil-glutámico, debido a una dehidrofolatorreductasa. Para la síntesis del ácido fólico, es necesaria una molécula de ácido paraaminobenzoico (PABA), pteridina y glutámico.

Las sulfamidas o **sulfonamidas** y el **ácido paraaminosalicílico (PAS)** son análogos estructurales del PABA, al que sustituirían por inhibición competitiva. Son bacteriostáticos.

Las **diaminopiridinas** (pentamidina) inhiben la dehidrofolatoreductasa, responsable del paso de fólico a folínico. El **trimetoprim** actuaría también a este nivel.

El **cotrimoxazol** formado por la asociación de trimetoprim y sulfametoxazol, actúa a nivel de las dos etapas consecutivas, de la síntesis del ácido folínico. La asociación es bactericida.

1.5. Antimicrobianos que actúan sobre el ADN

Varios grupos de antimicrobianos actúan a este nivel; así tenemos:

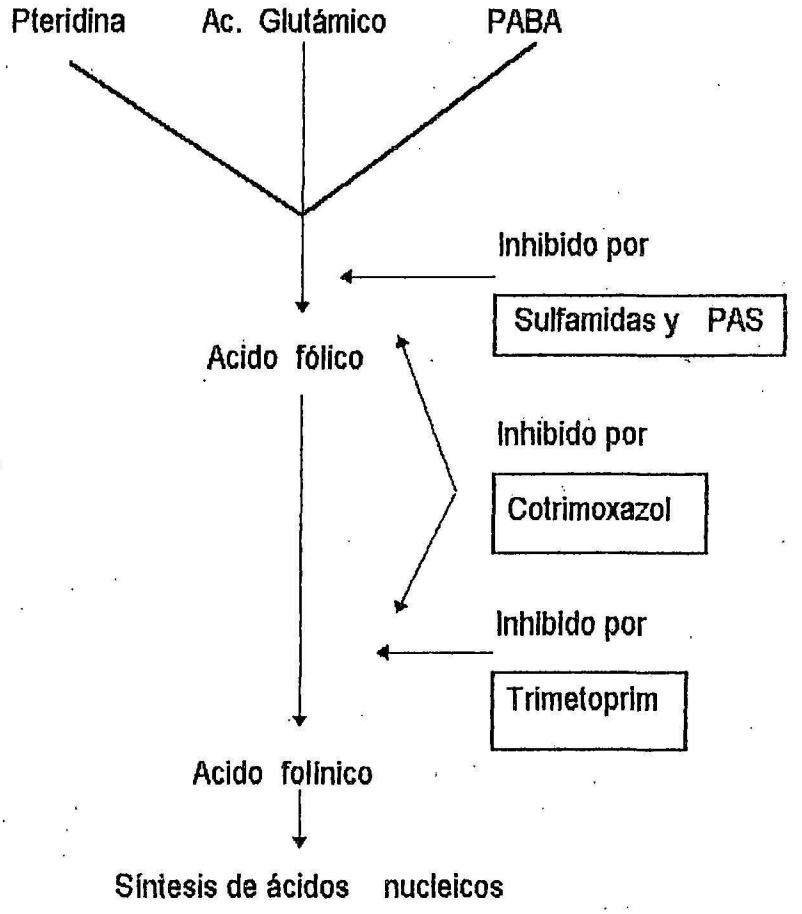
La **griseofulvina** actúa sobre diversos tipos de hongos interfiriendo la polimerización de los nucleótidos, y por ello, la replicación del ADN, ya que es un análogo de la guanosina.

La **rifampicina** inhibe la subunidad beta de la ARN-polimerasa, impidiendo la transcripción del ADN. También sobre la ADN polimerasa actuarían la **cloroquina** (paludismo) y la isoniacida (antituberculoso). Esta última inhibiría también, la micólico sintetasa, enzima necesaria para la síntesis de la pared de las micobacterias. (14, 16).

Las **quinolonas** son antimicrobianos que inhiben la girasa bacteriana, enzima responsable del corte y superenrollamiento negativo del ADN bacteriano. Son potentes bactericidas. La girasa es una topoisomerasa II, compuesta a su vez por cuatro subunidades, dos monómeros alfa de 105 kD (girasa A), y dos beta de 95 kD (girasa B), que catalizan las roturas del ADN de los 30 bucles o dominios iniciales en otros 400 más, lo que permite el superenrollamiento del ADN cromosómico. Las quinolonas, al unirse a la enzima, impiden este enrollamiento, y liberan exonucleasas, lo que explica la muerte celular. La topoisomerasa II de las células eucariotas humanas es totalmente distinta, y de ahí la escasa toxicidad de estos antimicrobianos.

El **metronidazol** y otros derivados imidazólicos se unen al ADN, rompiéndolo en nucleótidos, además de inhibir la síntesis de nuevos ácidos nucleicos; todo ello mediante la acción reductora

de los grupos nitro, que da lugar a compuestos muy tóxicos. También actuaría inhibiendo la producción de hidrógeno en la reacción, en la que el piruvato es convertido en CO_2 y acetil-coenzima A por una piruvatodeshidrogenasa. Son muy útiles en infecciones por anaerobios y algunas enfermedades protozoarias. Es bactericida. (9, 12, 16)



MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS

Desde el momento en que los agentes antimicrobianos fueron introducidos en el arsenal terapéutico humano y animal, se pudo observar la presencia de resistencias en las bacterias. La resistencia bacteriana se puede definir de dos formas: una de ellas sería la capacidad que tiene una especie o cepa para soportar concentraciones de un antibiótico, en las que, a igualdad de condiciones, otra no podría sobrevivir, y otra definición, más clínica, es la que considera que una bacteria es resistente cuando no puede alcanzarse la concentración capaz de destruirla o detener su crecimiento en el foco de la infección. Según esto, la bacteria es resistente cuando la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del antibiótico es superior al nivel que éste puede alcanzar en dicho foco. (16)

Existe una resistencia **natural**, o verdadera insensibilidad, de ciertos microorganismos a determinados antibióticos; así, las Enterobacterias y Pseudomonas son resistentes a la penicilina y a la eritromicina. La verdadera e importante resistencia es la **adquirida**, debida a mecanismos bacterianos específicos y activos de la propia célula procariota. A continuación se expondrá su base genética y los mecanismos que ésta regula.

1. Bases genéticas de la resistencia

La resistencia a los antimicrobianos se debe a cambios en el ADN bacteriano. Por ello, hay dos tipos de resistencia, la cromosómica, por mutaciones en el nucleoide, y la plasmidica o extracromosómica, adquirida por mecanismos de intercambio genético de los plásmidos bacterianos. (14, 16 , 18)

DIFERENCIAS ENTRE RESISTENCIAS CROMOSOMICAS Y PLASMIDICA A LOS ANTIBIOTICOS

CROMOSOMICA	PLASMIDICA
■ ADN CROMOSOMICO	■ ADN EXTRACROMOSOMICO
■ ESPONTANEA	■ ADQUIRIDA
■ RARA (10^{-8} A 10^{-12})	■ FRECUENTE
■ UN CARÁCTER	■ MULTIPLES Y VARIADOS
■ HEREDITARIA	■ HEREDITARIA O NO
■ TRANSFERIBLE RARA VEZ	■ TRANSFERIBLE: TRANSDUCCION O CONJUGACION
■ NECESITA CONTACTO CON EL ANTIBIOTICO (SELECCIÓN)	■ SIN CONTACTO PREVIO CON EL ANTIBIOTICO (NO NECESITA SELECCIÓN)
■ "NO INFECCIOSA"	■ "INFECCIOSA" O TRANSMISIBLE

La **resistencia cromosómica**, se debe a una mutación de los genes que controlan, a diferentes niveles, la sensibilidad a los antibióticos. Como mutación, es espontánea, de escasa frecuencia, afecta a un determinado carácter, y es hereditaria. Aparece tras el contacto con el antibiótico, que selecciona las cepas resistentes. Puede ser de dos tipos:

- En un solo escalón. La bacteria se hace inmediatamente resistente. Esto ocurre con la estreptomicina (resistencia tipo estreptomicina), la isoniazida o el ácido nalidixico.

- En varios escalones. En este tipo de resistencia, las bacterias van aumentando los MIC del antibiótico, a lo largo de varias generaciones. Se llama también resistencia tipo penicilina, pues aparece en los betalactámicos, además en otros antibióticos, como las tetraciclinas y aminoglucósidos. Como ejemplo, se puede mencionar el aumento paulatino de la resistencia de la Neisseria gonorrhoeae a la penicilina.

La **resistencia extracromosómica o plasmídica**, vienen codificada por plásmidos de resistencia R, que pueden pasar de una a otra bacteria por fenómenos de conjugación bacteriana o transducción fágica. Puede ser resistencia múltiple a diversas familias de antimicrobianos (betalactámicos, aminoglucósidos) e incluso a desinfectantes, habiéndose demostrado tanto en bacterias gramnegativas como en grampositivas. (13, 21)

Esta resistencia transferible ha demostrado una alta eficacia del mecanismo de conjugación, en el que una bacteria donante del plásmido (R+), tras la duplicación del mismo, transfiere a otra (R-) tanto la capacidad de resistencia a los antibióticos, como la capacidad de transmitir dicha resistencia (factor RTF), convirtiéndola, por tanto, en R+. (12, 16, 23).

En la actualidad, se sabe que la mayor parte de los genes de resistencia a los antibióticos se localizan en pequeños fragmentos de ADN. A estos fragmentos de ADN lineal, que contienen la información tienen genes capaces de "saltar", y se les denomina

elementos genéticos transponibles o transposones, y son capaces de moverse de un lugar a otro. Un transposón posee, en sus extremos, dos secuencias específicas de nucleótidos, invertidas y complementarias, que enmarcan, entre ellas, los genes de resistencia y otros más. Son estos extremos los que serán reconocidos por una proteína codificada por el propio transposón (transposasa), con lo que se delimita la unidad de ADN que va a "saltar". Estos saltos pueden tener lugar entre diversas zonas del cromosoma, o ser movilizados a plásmidos. Se han descrito numerosos transposones en diversas especies bacterianas, diferenciándose por su tamaño molecular en kilobases y por los genes de resistencia que codifican, es decir, por los antibióticos a los que hacen resistentes a la bacteria que los posea. Así, el transposón Tn3 de Escherichia coli posee 4,8 Kb y tres genes: el gen bla, que codifica la betalactamasa TEM-1, y proporciona a la bacteria resistencia a la ampicilina; el gen tnpA que codifica la transposasa, y el gen tnpR que codifica la resolvasa, cuyas funciones son la recombinación específica de sitio y la represión de ambas enzimas. (16, 19, 25).

2. MECANISMOS DE RESISTENCIA

Para que un antibiótico actúe es necesario que atraviese las distintas capas de la bacteria, hasta llegar al lugar "diana" o blanco, donde ejerce su función específica (PBPs, ribosomas, membrana

citoplásmica, ADN). Por ello, la resistencia a los antibióticos puede aparecer por alteraciones en la permeabilidad o transporte, por modificaciones enzimáticas del antimicrobiano, por modificaciones en los lugares "diana" o en los sistemas enzimáticos, o por otros mecanismos no bien conocidos. (12,14)

2.1 Alteraciones de la permeabilidad o transporte

La permeabilidad es diferente para cada antibiótico (hidrofobicidad, tamaño molecular o estructura espacial) y para cada especie bacteriana. Puede alterarase por diversos mecanismos, descritos principalmente en bacterias gramnegativas. (6, 12, 19)

Por modificación de las porinas. Investigaciones comprobaron que las porinas de E. cli, Omp C y Omp F (Outer membran proteins), facilitan el paso de los antibióticos en esta bacteria; pero mutantes Omp C^- y Omp F^- confieren a la bacteria unas altísimas MIC frente a betalactámicos y aminoglucósidos. También se ha comprobado que las porinas de Pseudomonas aeruginosa pueden estar cerradas, impidiendo la permeabilidad, de ahí la resistencia que esta bacteria a betalactámicos, aminoglucósidos, trimetoprim e imipenem. Todas estas mutaciones son de origen cromosómico, así como las descritas en la proteína K y en Pho E. (9, 12).

Menor tasa de entrada. Existe una menor tasa de entrada de las tetraciclinas, por la aparición de una nueva proteína tet, codificada por plásmidos; también sucede esto en Ps.aeruginosa para aminoglucósidos, por la producción de la proteína H-1.

Mecanismo de salida o eflujo. El transporte activo de los antibióticos requiere energía y la formación de una membrana energizada. Este sistema de entrada, no se alteraría, sino el de salida, expulsión o "eflujo". El fármaco entraría en la bacteria, siendo rápidamente eliminado al exterior. Este mecanismo, de origen plasmídico, se demostró por primera vez para la tetraciclina en E. coli (1980), pero luego se ha comprobado también en las fluorquinolonas para esta misma bacteria y en Staphylococcus para Quinolonas, macrólidos, metales pesados y detergentes catiónicos.

Alteraciones iónicas. Modificaciones en los iones calcio y magnesio pueden afectar a la resistencia antimicrobiana; así los agentes quelantes como el EDTA (que atrapan el calcio) disminuyen el MIC, mientras que las altas concentraciones de los cationes o un pH muy ácido, dificultan la entrada de algunos antibióticos.

Alteraciones en los lipopolisacáridos. Las modificaciones de estas estructuras de la pared celular, pueden impedir la entrada de betalactámicos en P. aeruginosa.

Alteraciones en el transporte. Estos mecanismos han sido muy bien estudiados, y se deben a mutaciones que afectan los requerimientos energéticos de dicho transporte, que impiden el paso de los aminoglucósidos; en estos antibióticos, como se requiere además un transporte de electrones dependiente de citocromos, es manifiesta su inutilidad para las bacterias anaerobias estrictas. La fosfomicina puede no ser transportada por alteraciones del sistema glúcido-fosfato, y hechos similares harían que no entrara el cloranfenicol en Pseudomonas.

Relación con enzimas hidrolizantes. Se ha descrito una clara relación entre la producción de enzimas de tipo betalactamasa, y la reducción de la permeabilidad a los betalactámicos. Así pues, existirían bacterias, especialmente resistentes, que producirían una gran cantidad de betalactamasas, y además tendrían disminuida la permeabilidad de su pared a los antibióticos betalactámicos. (7, 12, 25, 26).

2.2 MODIFICACIONES ENZIMATICAS DE LOS ANTIBIOTICOS

En este apartado, se exponen las betalactamasas, las enzimas modificantes de aminoglucósidos y las cloranfenicoltransferasas.

2.2.1 Betalactamasas.

El mecanismo más importante de resistencia descrito en más de 25 especies bacterianas diferentes, grampositivas y gramnegativas, es la producción de estas enzimas, que atacan a los antibióticos del tipo penicilinas y cefalosporinas. Las betalactamasas que actúan hidrolizando el enlace amida del anillo betalactámico, con lo que el antibiótico pierde totalmente su actividad. Pueden estar codificadas por el ADN cromosómico o ser plasmídicas, adquiriéndose el plásmido por conjugación o transducción fágica. (12, 14, 16, 21).

Las betalactamasas pueden situarse en el espacio virtual periplásmico existente entre la pared celular y las PBPs diana, o ser producidas por la bacteria y salir de la misma: son las extracelulares, típicas de bacterias gramnegativas, Bacteroides y Moraxella. Estas podrían jugar un papel patógeno importante, ya sea permitiendo actuar a otras bacterias en procesos de coinfección; por ejemplo, uretritis producidas por Neisseria gonorrhoeae y un estafilococo no patógeno, pero productor de betalactamasa, es lo que se denomina patogenicidad indirecta o destruyendo a los antibióticos, con lo que hace posible la actuación patogénica de las bacterias. Así se explicaría el efecto inóculo, en el que, si existe un número

de bacterias muy alto, la liberación de grandes cantidades de betalactamasas impediría la acción de los antibióticos. (16, 18, 20).

El mecanismo de acción hidrolítico de la enzima sigue las constantes cinéticas de Michaelis-Menten; es decir, depende de la permeabilidad para el antibiótico, la cantidad de enzima, la velocidad de hidrólisis, la afinidad de la enzima por el sustrato y el tipo de betalactamasa. (16)

Las **betalactamasas cromosómicas**, aparecen fundamentalmente en bacterias gramnegativas; la mayor parte tienen actividad sobre las cefalosporinas, y pueden ser constitutivas o inducidas. Las constitutivas están siempre presentes, y limitadas genéticamente en cantidad y actividad. En las inducidas, la síntesis está normalmente reprimida; sólo se inicia en presencia de un estímulo o inductor, que son los propios betalactámicos, en mayor o menor grado, este hecho se ha demostrado, por ejemplo, en Enterobacterias y Pseudomonas. Pero, por mutación, pueden aparecer cepas hiperproductoras de betalactamasas, en las que el gen operón no es reconocido por el represor, y la síntesis de cefalosporinasas es continua e intensa. Estas mutantes estables desreprimidas van a plantear difíciles problemas

en el tratamiento de las infecciones que producen, pues son resistentes a la mayor parte de los antibióticos de esta familia. Además, muchas de estas cefalosporinas no hidrolizarían al antibacteriano, sino que bloquearían sus moléculas por un mecanismo no hidrolítico de secuestro, atrapamiento o fenómeno esponja, aunque hoy se sospecha que la hidrólisis acaba también destruyendo al antibiótico, mediante una reacción más lenta. (7, 16, 20, 25).

Las betalactamasas plasmídicas, pueden actuar sobre penicilinas, cefalosporinas, o ambas (betalactamasas de amplio espectro). Se clasifican, según Bush, en nueve grupos, atendiendo a la especificidad del sustrato, la susceptibilidad al ácido clavulánico, el punto isoeléctrico y otras características en: 1, 2ª, 2b, 2b´, 2c, 2d, 2e, 3 y 4. Actualmente, están descritas más de cien de estas enzimas, siendo las más conocidas las TEM (del 1 al 19), SHV (1 al 5), HMS-1, OXA (1 al 3), PSE (1 al 4), MIR-1 y CAZ (1 al 7). Las betalactamasas plasmídicas clásicas no son activas sobre las cefalosporinas de tercera generación, pero apareció una que las hidrolizaba, demostrándose que los plásmidos que las transportaban codificaban también enzimas de resistencia para los aminoglucósidos, lo que aumenta la gravedad del

problema. Estas betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado pueden inactivar, no sólo las cefalosporinas de tercera generación, sino también los monobactámicos y carbapenemes, habiendo aparecido en infecciones por bacterias aisladas de brotes epidémicos hospitalarios (Unidades de Cuidados Intensivos, principalmente), o de forma aislada, pero siempre con una grave repercusión clínica. Ejemplo de ellas son las betalactamasas TEM-3 al 19, SHV-2, 3, 4 y 5, CAZ-2, 6 y 7, YOU-1 y 2 y MIR-1. (16, 23).

En resumen, las betalactamasas constituyen un mecanismo de resistencia muy importante en Enterobacterias, cocos grampositivos y negativos, Haemophilus, Pseudomonas, Moraxella y Bacteroides, ya que estas bacterias poseen codificación para la producción y pueden, a la vez, tener un nivel de permeabilidad alterado al antibiótico. (9, 12, 24).

La importancia de las betalactamasas ha sido el origen de intentos de luchar contra este mecanismo, mediante antibióticos inhibidores de las mismas que, uniéndose a ellas, permitirían la acción de otras sustancias inhibidoras de betalactamasas; los principales son el ácido Clavulánico, el Sulbactam, el Tazobactam, y el Mezolactam, que se encuentran comercialmente en forma

de amoxicilina.clavulánico, ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam. (14, 16).

2.2.2 CLORANFENICOL TRANSFERASAS

El cloranfenicol es inactivado por una diacetilación enzimática, en presencia de acetil-CoA, dando lugar al diacetilcloranfenicol, que es inactivo. Se debe a una acetiltransferasa plasmídica, y aparece tanto en grampositivos como gramnegativos. Estas enzimas no se sitúan en el espacio periplásmico, sino en el citoplasma. El antibiótico también puede tener una resistencia cromosómica, que impide su normal permeabilidad.

Recientemente, se ha encontrado un nuevo mecanismo de resistencia a los macrólidos, por inactivación enzimática. (9, 12).

2.3 RESISTENCIA POR MODIFICACION DE LOS PUNTOS DIANA

Según los distintos puntos diana sobre los que actúen los antibióticos, los mecanismos de resistencia pueden aparecer en:

2.3.1 Las proteínas fijadoras de penicilina

Se han demostrado tres mecanismos a este nivel: modificaciones de las PBPs, aparición de nuevas PBPs, o ambos. Las modificaciones de estas proteínas diana, disminuyen la afinidad del antibiótico por la PBP. Se han

descrito tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas. Así, las alteraciones en la PBP-1 y en la PBP-2 de Neisseria gonorrhoeae aumentan las MIC ocho veces. Debido a modificaciones de la PBP-2 y 3, se han descrito resistencias en Haemophilus influenzae para la ampicilina, y en Pseudomonas aeruginosa para Imepenem. También aparecen en Staphylococcus, Streptococcus y Clostridium. (14, 16, 26).

En varías especies de Staphylococcus y Streptococcus, se ha demostrado que las bacterias sintetizan nuevas PBPs, por lo que el antibiótico no puede actuar. Así, en Staphylococcus aureus se sintetiza una nueva PBP-3, que se diferencia por su peso molecular y su baja afinidad por la penicilina. También se ha aislado una nueva PBP (2´) con una baja afinidad por los betalactámicos. (3, 11, 17).

En cepas de Streptococcus pneumoniae, se ha comprobado, conjuntamente, la modificación y síntesis de nuevas PBPs, lo que las hace especialmente resistentes a la penicilina.

La resistencia por alteraciones o síntesis de nuevas PBPs parecen estar en todos los casos, mediadas por el ADN cromosómico. (16, 20).

BASES PARA LA UTILIZACION CORRECTA DE LOS ANTIBIOTICOS

Para emplear correctamente los antibióticos, hay que tener en cuenta una serie de principios básicos, que pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. **Indicaciones de la antibioticoterapia**

Los antibióticos pueden emplearse con fines curativos o terapéuticos, o con un carácter preventivo o profiláctico. El uso terapéutico vendrá determinado por la clínica o los síntomas del paciente. La fiebre suele ser indicativa de un proceso infeccioso, pero puede estar producida por una infección vírica (donde estos agentes no son sensibles a los antibióticos), o no ser de origen microbiano (p.ej., procesos neoplásicos). Además, hay enfermedades bacterianas, que no requieren tratamiento antibiótico, o este es cuestionado, como es el caso de ciertos cuadros diarreicos. (5, 6, 10).

El empleo indiscriminado, con finalidad profiláctica, de los antimicrobianos, puede colaborar en la selección de cepas multirresistentes, sin contar con los posibles efectos secundarios de muchos de ellos. Por ello, su uso preventivo debe restringirse a los casos de un alto riesgo infeccioso, eligiendo los de espectro reducido, que induzcan pocas resistencias, sean poco tóxicos, y que la experiencia previa haya demostrado su utilidad en el cuadro concreto que se desea prevenir. (14, 18).

2. Elección del antibiótico

Esta depende del microorganismo, del hospedador y del propio antimicrobiano. Existen procesos infecciosos producidos siempre por el mismo agente; la experiencia y el sentido común permiten elegir el antibiótico idóneo, sin necesidad de consultar al laboratorio (por ejemplo, en la sífilis). Otras veces, es imposible conocer el agente causante, debiendo esperar en este caso los resultados proporcionados por el laboratorio; sin embargo, en ciertas ocasiones, no podrá dejarse al paciente sin una cobertura antibiótica a la espera de aquellos resultados; de nuevo, para establecer un tratamiento empírico inicial la experiencia previa será básica para la elección. (1, 8, 16, 18).

Antes de prescribir el antibiótico, hay que conocer la edad, hábitos, estado de las funciones vitales, así como si el paciente presenta alguna enfermedad (procesos metabólicos que alteren la excreción, estados de hipersensibilidad o alergia). También habrá que tener en cuenta la localización del cuadro infeccioso (respiratorio, urinario, meningeo) y la gravedad del mismo. Se valorará cuidadosamente la relación perjuicio-beneficio de la antibiocoterapia. Así, es posible que, en algunos casos, ésta origine una disminución de las defensas del hospedero, que puede replantear la terapéutica iniciada, bien sustituyéndola por otra, bien suprimiéndola (por ejemplo, la destrucción de la microbiota normal sería un efecto indeseable en determinados enfermos).

Una vez seleccionado el antibiótico, deberá decidirse la vía de administración, las dosis y los intervalos entre las mismas. Para ello, se evalúa la accesibilidad del fármaco al foco infeccioso, así como sus propiedades farmacológicas (vida media, unión a proteínas plasmáticas, liposolubilidad y excreción). (12, 14, 27).

3. Asociación de antibióticos

En pacientes inmunocompetentes, con infecciones leves o moderadas, debe realizarse, siempre que sea posible, una monoterapia, evitando las asociaciones. Estas sólo deben utilizarse con los siguientes objetivos:

- Para prevenir o reducir al mínimo la aparición de cepas resistentes, como por ejemplo, en el caso de la tuberculosis.
- Para conseguir un efecto sinérgico, experimentalmente comprobado.
- Para proporcionar un tratamiento empírico óptimo en situaciones de riesgo vital, antes de que pueda establecerse un diagnóstico de certeza.
- Para disminuir la toxicidad individual de cada uno de los fármacos, al reducirse su dosis en la asociación.
- En infecciones polimicrobianas y mixtas (varias bacterias aerobias y anaerobias con distinta sensibilidad), inmunodeprimidos o endocarditis.

4. Efectos secundarios

Aunque los antibióticos actúen de forma selectiva sobre las bacterias, y no sobre las células del hospedero, éste no está exento de sufrir efectos indeseables, que pueden ser de tres tipos:

- Tóxicos, por lesión de determinadas estructuras celulares del hospedero, que comparten cierta similitud con las bacterianas. Así ocurre, por ejemplo, con la membrana citoplásmica o los ribosomas. Por ello, algunos antibióticos son ototóxicos, nefrotóxicos o producen aplasia medular.
- Alérgicos, que dan lugar a reacciones de hipersensibilidad tipo I o anafilácticas, o exantemas.
- Biológicos, tales como la destrucción de la microbiota normal de la piel o mucosas, que determina la pérdida de sus efectos beneficiosos, y superinfecciones por microorganismos resistentes, cepas toxigénicas u hongos.

5. Vigilancia y fin del tratamiento

Cuando desaparece la sintomatología de la enfermedad deben suspenderse totalmente el tratamiento con antimicrobianos y nunca debe hacerse en dosis decrecientes, ya que ello aumenta el riesgo de resistencias. Así pues, cuando hay una constancia evidente de curación, tras una espera prudencial con las mismas pautas de dosificación, se retirará el antibiótico.

6. **Fracaso del tratamiento**

Casi siempre, suele deberse a la falta de cumplimiento de las normas antes citadas. En estos casos, se replanteará toda la conducta hasta entonces seguida. Entre los elementos a evaluar, se tendrá en cuenta la denominada resistencia cruzada, por la que, si un antibiótico ha fracasado, otro del mismo grupo frecuentemente volverá a hacerlo; por ello, se utilizará otro que no comparta el mismo mecanismo de acción.

PRINCIPALES CARACTERISTICAS FARMACOLOGICAS DE LA METICILINA

a) No se absorve por vía oral, se debe aplicar por vía intramuscular o endovenosa.
b) La concentración sérica máxima se obtiene entre 30 y 60 minutos.
c) No se recomienda en neonatos ya que por el desarrollo incompleto de la función renal pueden producirse concentraciones séricas elevadas.
d) La vida media es de 0.4-0.8 horas cuando la función renal es normal, sin embargo cuando la función renal está alterada la vida media del antibiótico es de 3-4 horas.
e) La unión a proteínas es baja a moderada.
f) El 80% de meticilina se excreta por vía renal sin sufrir modificaciones.
g) No puede ser separada por hemodialisis.

EFECTOS ADVERSOS

a) El principal efecto adverso es la disfunción renal que ocasiona.
b) Puede producir colitis seudomembranosa.
c) En pacientes con ASMA, ECZEMA, FIEBRE DEL HENO o URTICARIA, pueden desarrollar alergía a este antibiótico.
d) Sangre en orina.
e) Hinchazón de cara y tobillos.
f) Respiración dificultosa.
g) Cansancio o debilidad no habituales.
h) Rash cutáneo, urticaria, prurito o sibilancias.

INCOMPATIBILIDADES

- No se debe mezclar antibióticos betalactámicos (Penicilinas y Cefalosporinas) con Aminoglucósidos, porque pueden ocasionar una sustancial inactivación mutua.
- También esta mezcla puede producir reducción de la vida media de las Penicilinas y Aminoglucósidos, esto es clínicamente significativo en pacientes con disfunción renal, cuando se prolonga la excreción de ambos medicamentos (27).

PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE OXACILINA

a) Se absorve por vía oral en un 30-33%.
b) La concentración sérica se obtiene a los 30' por vía oral o Intramuscular.
c) La vida media es de 0.5-0.7 hrs. cuando la función renal es normal y entre 1-3 horas cuando hay disfunción renal.
d) Se metaboliza en el hígado en un 49%.
e) Se excreta renalmente un 40% sin que haya sufrido alteración alguna.

EFECTOS ADVERSOS

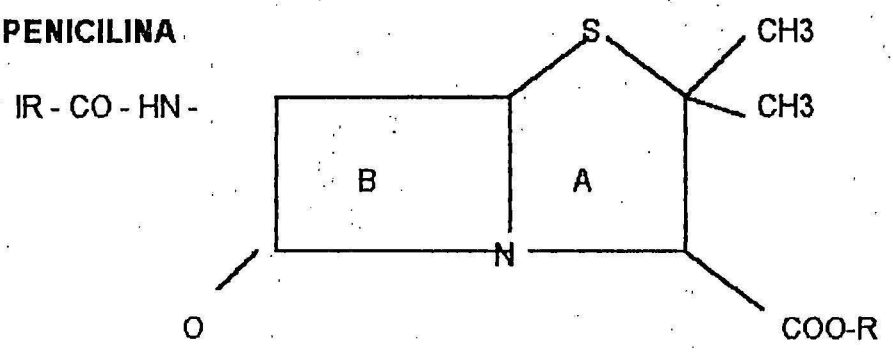
a) Pueden aumentar las características séricas de ALANINA AMINO TRANSFERASAS y ASPARTATO AMINO TRANSFERASA.
b) Pueden originar alergias, Rash cutáneo, urticaria, prurito y debe tenerse precauciones en pacientes con historia de asma, fiebre de heno, eczema o alergia general.
c) Origina en algunos pacientes colitis pseudomembranosa (27).

INCOMPATIBILIDADES

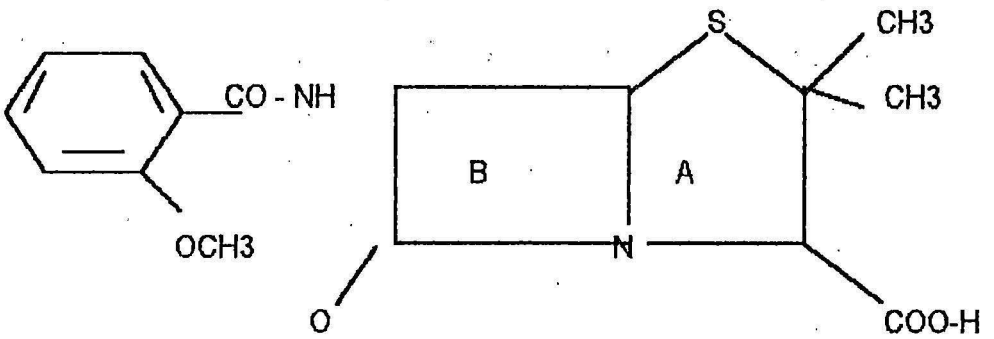
Las mismas que para METICILINA.

FORMULAS ESTRUCTURALES DE:

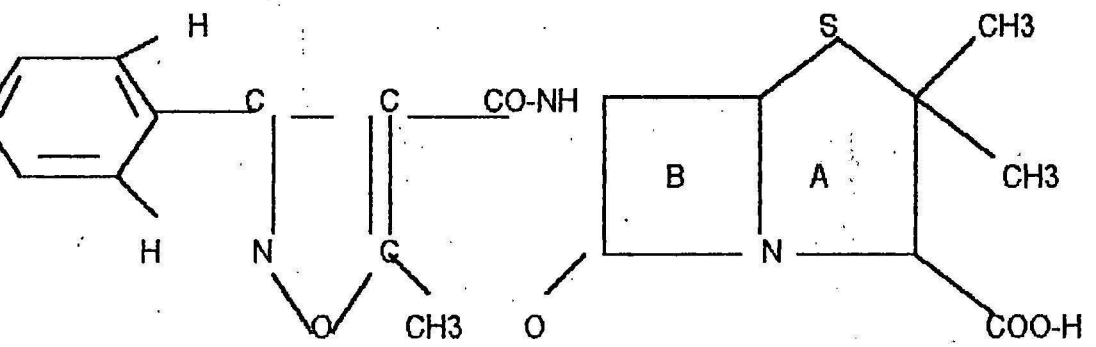
A) **PENICILINA**



B) METICILINA



C) OXACILINA



A = ANILLO TIAZOLIDIN
B = ANILLO BETALACTAMICO

. METODOLOGIA

3.1 MATERIAL Y METODOS

En el período comprendido entre Enero a Setiembre de 1,997 se recolectaron 254 cepas de Staphylococcus aisladas de diferentes muestras patológicas como hemocultivos, urocultivos, punta de cateter y líquidos corporales, de pacientes hospitalizados y ambulatorios.

TIPOS DE MUESTRA ANALIZADAS

MUESTRA	Nº	%
SECRECIONES	132	51.9
UROCULTIVOS	54	21.3
HEMOCULTIVOS	30	11.8
LIQUID. PLEURAL.L,CR.	21	8.3
PUNTA DE CATETER	17	6.7
TOTAL	254	100

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS EMPLEADOS

- Agar Mueller Hinton
- Caldo Mueller Hinton
- Agar manitol Salado
- Agar Urea
- Medio SIM
- -Peróxido de Hidrógeno al 30%
- Alfa Naftol 0.5% en Ac.Ac,tico 5N
- Ac. Sulfanílico 0.8% en Ac.Ac,tico 5N
- Agar sangre
- Agar Tripticasa soya

ANTIBIOTICOS EMPLEADOS

Se usaron antibióticos los estandares que dispone el laboratorio de microbiología clínica con fines de investigación. En el caso de antibiogramas se usó:

- Discos de susceptibilidad: (DIFCO)

. Oxacilina 1ug

. Meticilina 5 ug

En el caso la concentración mínima inhibitoria (MIC) se empleó OXALICINA en polvo marca SIGMA.

. Polimixina B 300 unidades U; para la identificación de los Staphylococcus .

3.2 METODOS

Se emplearon los siguientes métodos de laboratorio: Pruebas bioquimicas para la identificación de las especies de Staphylococcus, y para determinar la susceptibilidad frente a la meticilina-oxacilina, se emplearon losl método de dilución en Agar (ANTIBIOGRAMA- KIRBY BAUER) y el de dilución en Agar (Concentración mínima inhibitoria- MIC); métodos recomendados por el NCCLS.

CULTIVO

Las cepas de Staphylococcus spp. aisladas fueron sembradas en Agar manitol salado. Luego de la incubación a 35°C por 24 horas se realizó la prueba de catalasa a todas las cepas para verificar la

positividad . Se empleó Agar manitol salado para la prueba confirmativa de fermentación de manitol.

La identificación de las especies Staphylococcus aureus, S. saprophyticus, S. haemolyticus, S. epidermidis, se determina empleando pruebas de diferenciación bioquímica como: hemólisis, presencia de pigmento, reducción de nitratos, presencia de ureasa, resistencia a la polimixina y prueba de coagulasa. (6,14, 16)

Para determinar la producción de hemólisis las cepas fueron sembradas en agar sangre suplementada con sangre de carnero y luego de incubar a 35 ± 0.1° C se procedió a la observación de la presencia de hemólisis así como la presencia de pigmentación de colonias: dorada, amarilla, blanca y no pigmentadas .

La reducción de nitratos o nitritos. Se observó en cada una de las cepas, las que fueron sembradas por puntura en medio SIM que contenía nitrato. Luego de la incubación a 35 ± 01° C por 24 horas, se agregó al medio 3 gotas de Solución A (alfa naftol 0.5% en acido Acético 5N) y 3 gotas de Solución B (acido sulfanílico 0.8% en acido acético 5N), se mezcló y se observó. La aparición de un color amarillo fuerte se consideró positivo (bacteria reduce nitratos a nitritos) y la no aparición de color se consideró negativo (5,6,14).

Para la producción de ureasa. Se empleó Agar urea. Luego de la incubación a 35 ± 0.1°C por 24 horas la positividad de la prueba se dá por la variación del indicador del medio .

En todas las cepas estudiadas; se realizó la prueba de resistencia a Polimixina empleando Agar Mueller Hinton con NaCl al 4% como si fuera para un antibiograma, se colocó un disco de Polimixina B sobre lo sembrado. Se incubó a 35 ± 0.1° C por 24 horas. Se realizó la medida de inhibición formado. Un halo de inhibición menor o igual a 10 mm de diámetro se consideró positivo (resistente), mientras que halos mayores a 10 mm se consideró negativo (sensible).

La prueba de coagulasa se realizó en lámina portaobjetos, empleando plasma citratado, se colocó una gota de solución salina fisiológica en una lámina y se mezcló con la cantidad recogida con una asa de una colonia aislada. Luego se agregó 10 ul o una asa grande de plasma humano y se mezcló suavemente.

La inmediata formación de un precipitado macroscópico en forma de aglutinados blancos indica la positividad de esta prueba.

La positividad de la muestran por lo general se produce entre los 5 y 20 segundos, y se debe esperar durante 3 minutos.

Se considera negativa la prueba en lámina portaobjetos si no se produce la coagulación hasta los 3 minutos.

Luego de realizar todas las pruebas de diferenciación a las cepas de Staphylococcus., se pudo agruparlas en 4 especies: aureus, S.haemolyticus, S.saprophyticus y S.epidermidis.

Por los resultados obtenidos, frente a la prueba de la coagulasa las cepas de Staphylococcus se agruparon en 2 grandes grupos coagulasa positivo y coagulasa negativo.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (MIC)

- ANTIBIOTICO EMPLEADO: OXACILINA

- Concentración de principio activo : 100 mg. de meticilina sódica corresponden de 90.58 mg. de meticilina base.

El antibiótico usado fue Oxacilina con una potencia de 90.58%. Para realizar los MICs se necesitó tener una concentración de 5,120 ug/ml de Oxacilina, para lo cual se pesó en una balanza analítica 0.0565 gramos de Oxacilina y se disolvió en 10 ml de agua destilada estéril. Esta dilución corresponde al primer tubo de la tabla adjunta, a partir de este tubo se prepararon las siguientes diluciones.

RELACION DE LAS DILUCIONES DEL AGENTE ANTIBACTERIANO PARA EL METODO DE SUSCEPTIBILIDAD EN AGAR

	Solución de Oxacilina				Conc.Final
		Vol. Sol.	Agua Dest.	Conc.Interm.	Diluc 1:10
Tubo	Conc. ug/ml	(ml)	(ml)	(ug/ml)	(ug/ml)
1	5,120	2.0	0	5,120	512
2	5,120	1.5	1.5	2,560	256
3	5,120	2.0	6.0	1,280	128
4	1,280	1.5	1.5	640	64
5	1,280	1.0	3.0	320	32
6	1,280	1.0	7.0	160	16
7	160	1.5	1.5	80	8
8	160	1.5	2.5	60	6
9	160	1.0	3.0	40	4
10	160	1.0	7.0	20	2
11	20	1.5	1.5	10	1
12	20	1.0	3.0	5	0.5
13	20	1.0	7.0	2.5	0.25
14	2.5	1.5	1.5	1.25	0.125

IV. RESULTADOS

De acuerdo a la Tabla Nº 1, donde se determina la frecuencia del tipo de Staphylococcus según la procedencia de la muestra, podemos apreciar que se analizaron un total de 254 cepas, de las cuales 148 fueron de procedencia ambulatoria y 106 intrahospitalarios. También es posible observar que la frecuencia de S. aureus representa el 66.9%, S. epidermidis el 18.1%, S. haemolyticus el 7.9% y S. saprophyticus el 7.1%, notándose claramente que el estafilococo más frecuente que causa infecciones dentro o fuera de hospitales es S. aureus.

En el Gráfico Nº 1, se describe la frecuencia general de estafilococos según la procedencia de la muestra. A nivel intrahospitalario se obtuvieron las siguientes frecuencias, de un total de 106 cepas estudiadas. S. aureus representa el 57.57% (61), seguido por S. epidermidis en 31.13% (33), S. haemolyticus 7.55% (8) y S. saprophyticus 3.75% (4).

A nivel ambulatorio, de un total de 148 cepas, S. aureus representa el 73.75% (109) ; S. epidermidis, representa 8.78% (13), S. haemolyticus 8.11% (12) y S. saprophyticus 9.46% (14).

Considerando que el objetivo de la presente investigación ha sido comparar la resistencia de los Staphylococcus frente a antibióticos B-lactámicos, la recolección de muestra se ha realizado de manera intencional con ciertos criterios de inclusión, por lo tanto, no es posible la comparación de las frecuencias. Tabla Nº 1, Gráfico Nº 1.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA

TABLA Nº 1

FRECUENCIA GENERAL DE ESPECIES DE STAPHYLOCOCCUS SEGUN PROCEDENCIA DE MUESTRA

(INTRAHOSPITALARIO-AMBULATORIO)

PROCEDENCIA ESTAFILOCOCOS	AMBULATORIO	INTRAHOSPITALARIO	TOTAL	
	Nº	Nº	Nº	%
S. AUREUS	109	61	170	66.9
S. EPIDERMIDIS	13	33	46	18.1
S. HAEMOLYTICUS	12	08	20	7.9
S. SAPROPHYTICUS	14	04	18	7.1
TOTAL	148	106	254	100



La distribución de la muestra, según la prueba de coagulasa; demuestra las siguientes frecuencias: A nivel intrahospitalario se encuentra mayor frecuencia de cepas coagulasa positivo 57.55 (61) y el 42.45% (45), fueron coagulasa negativo. De igual modo, a nivel ambulatorio la mayor frecuencia correspondió a las coagulasa positivo en un 73.65% (109 cepas), mientras que las coagulasa negativo presentan un 26.35% (39).

En relación a las cepas ambulatorias, 109 (73.65%) son coagulasa positivo y 39 (26.35%) son coagulasa negativo. Como se puede apreciar tanto en un ambiente intrahospitalario como en las cepas procedentes de la comunidad (extrahospitalarias ó

ambulatorias), predominan las cepas coagulasa positivo, como agentes etiológicos de infecciones estafilocócicas. Tabla Nº 2, Gráfico Nº 2.

TABLA Nº 2

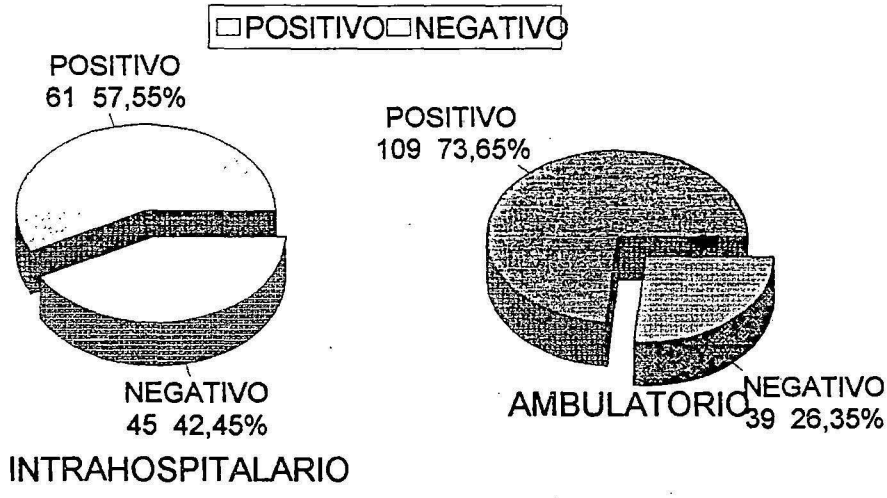
DISTRIBUCION DE LA MUESTRA

SEGUN PRUEBA DE COAGULASA

COAGULASA / PROCEDENCIA	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
INTRAHOSPITALARIO	61	57.55	45	42.4	106	100
AMBULATORIO	109	73.65	39	26.3	148	100
TOTAL	170	66.93	84	33.0	254	100

GRAFICO Nº 2

DISTRIBUCION DE LA MUESTRA SEGUN PRUEBA DE COAGULASA



La Tabla Nº 3, muestra los resultados de la resistencia de Staphylococcus aureus a la Oxacilina, usando el método de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y teniendo en cuenta la procedencia de la muestra.

Se observa que de un total de 61 cepas intrahospitalarias, el 67.2% (41) fueron resistentes. En las cepas estudiadas, procedentes de pacientes ambulatorios de un total de 109, solamente el 29.3% (32) fueron resistentes.

Como se puede apreciar, a nivel intrahospitalario se encontró mayor porcentaje de cepas de Staphylococcus aureus resistentes, en relación a la cepas ambulatorias. Para comprobar si las diferencias fueron significativas, se aplicó la prueba estadística no paramétrica del chi cuadrado, encontrándose un valor calculado de X^2 = 21.356, valor que es mayor que el chi cuadrado tabular (3.841) para un grado de libertad.

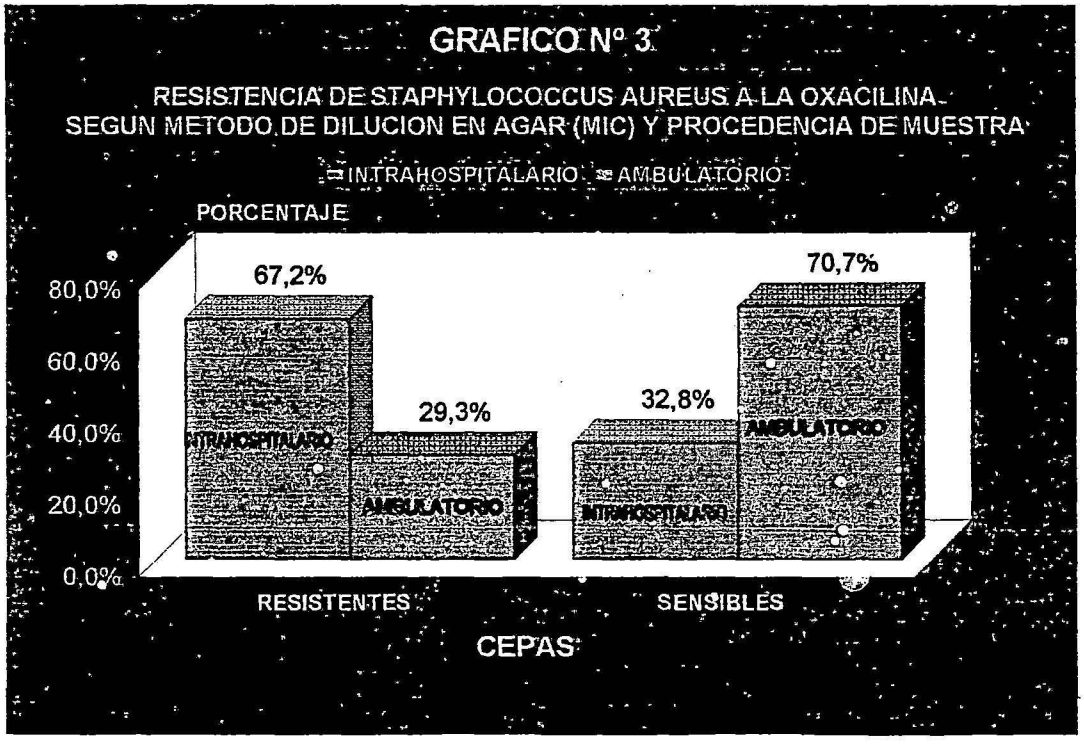
Se concluye que la resistencia de las cepas intrahospitalarias a la Oxacilina/meticilina con el método MIC es significativamente mayor que en las cepas procedentes de pacientes ambulatorios (p< 0.01). Tabla Nº 3, Gráfico Nº 3.

TABLA Nº 3

RESISTENCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS A LA OXACILINA SEGUN EL METODO DE DILUCION EN AGAR (MIC) Y PROCEDENCIA DE MUESTRA

PROCEDENCIA	TOTAL DE CEPAS	CEPAS RESISTENTES		CEPAS SENSIBLES	
	Nº	Nº	%	Nº	%
INTRAHOSPITALARIO	**61**	**41**	67.2	**20**	32.8
AMBULATORIO	**109**	**32**	29.3	**77**	70.7
TOTAL	**170**	**73**	42.9	**97**	57.1

X^2 = 21.356 GI = 1 (p <0.01)



Cuando se comparó la resistencia de estafilococos coagulasa negativo a la oxacilina método MIC, de cepas intrahospitalarias y ambulatorias, encontramos que de un total de 45 cepas intrahospitalarias, el 42.2% (19) fueron resistentes; mientras, que de un total de 39 cepas ambulatorias el 20.5&% fueron resistentes.

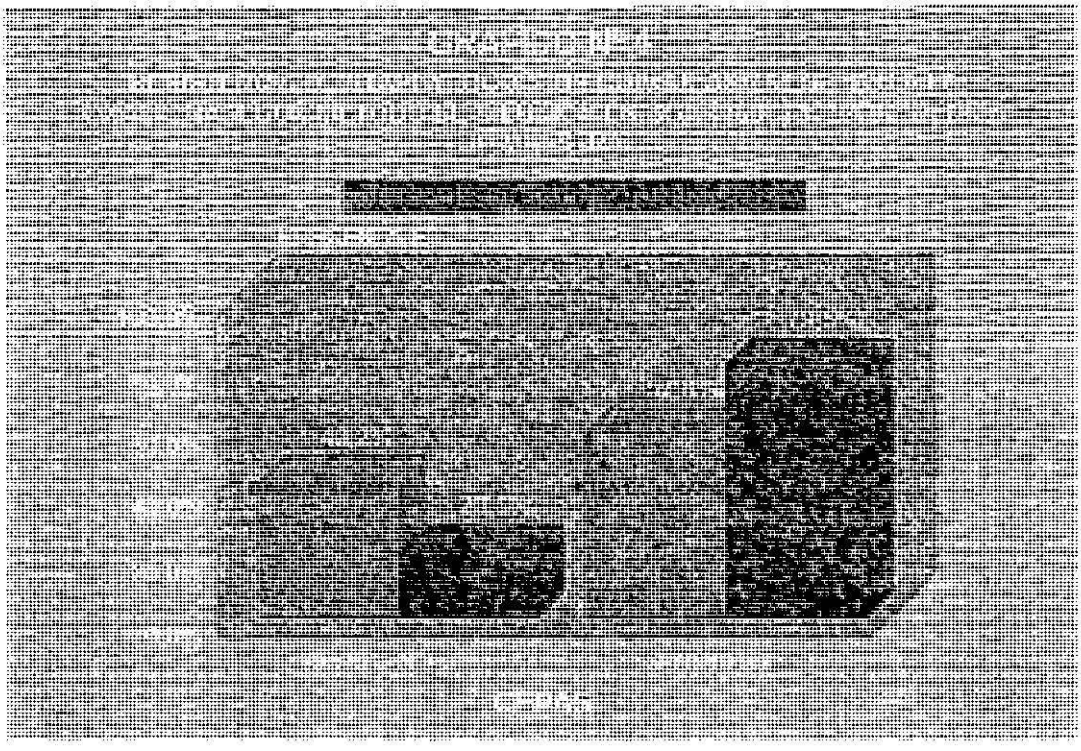
También es posible observar, que existe un mayor porcentaje de cepas resistentes, cuando estas proceden de pacientes hospitalizados con relación a las cepas ambulatorias. Al realizar la prueba de chi cuadrado encontramos un valor calculado de 4.515, valor que es mayor que el de la tabla (3.841); por lo que se concluye, que las diferencias son significativas (P $\angle$0.05). Tabla Nro. 4 Gráfico Nro. 4.

TABLA Nº 4

RESISTENCIA DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA NEGATIVO A LA OXACILINA SEGUN METODO DE DILUCION EN AGAR (MIC) Y PROCEDENCIA DE MUESTRA

PROCEDENCIA	TOTAL DE CEPAS	CEPAS RESISTENTES		CEPAS SENSIBLE	
	Nº	Nº	%	Nº	%
INTRAHOSPITALARIO	**45**	**19**	42.2	**26**	57.8
AMBULATORIO	**39**	**08**	20.5	**31**	79.5
TOTAL	**84**	**27**	32.1	**57**	67.9

$X^2 = 4.515 \quad Gl = 1 \ (p < 0.05)$



Se analizó la resistencia de Staphylococcus aureus a la Oxacilina por el método de difusión en agar (KIRBY-BAUER) y se encontró que de un total de 61 cepas intrahospitalarias, el 67,2% (41) fueron resistentes; en cambio en las cepas ambulatorias, de un total de 109 cepas 29,3% (32) presentaron resistencia a la oxacilina.

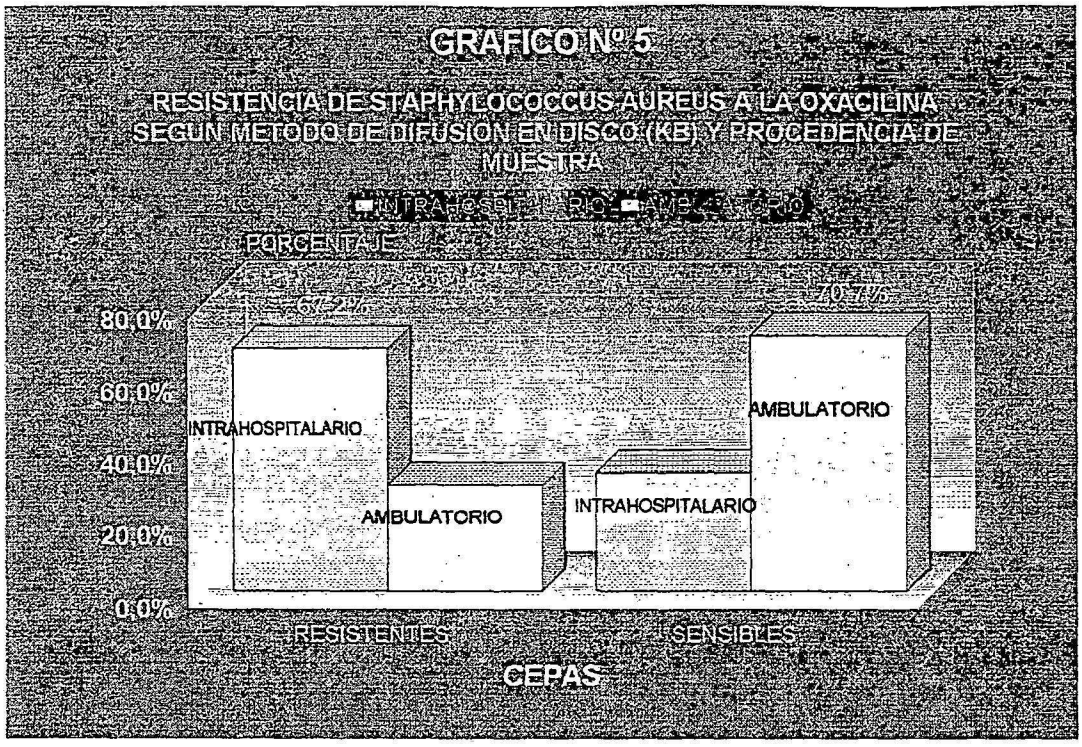
Para comprobar si esta diferencia de cepas resistentes fue estadísticamente significativa, se aplicó la prueba de chi cuadrado, encontrando un valor de $X^2 = 21.356$, que es mayor que el chi cuadrado tabular $X^2 = 3.841$; por tanto, se afirma que la procedencia de la muestra influye significativamente en la resistencia; siendo ésta mayor en cepas intrahospitalarias que en ambulatorias. Tabla Nº 5, Gráfico Nº 5.

TABLA Nº 5

RESISTENCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS A LA OXACILINA SEGUN METODO DE DIFUSION EN DISCO (K-B) Y PROCEDENCIA DE MUESTRA

PROCEDENCIA	TOTAL DE CEPAS	CEPAS RESISTENTES		CEPAS SENSIBLES	
	Nº	Nº	%	Nº	%
INTRAHOSPITALARIO	**61**	**41**	67.2	**20**	32.8
AMBULATORIO	**109**	**32**	29.3	**77**	70.7
TOTAL	**170**	**73**	42.9	**97**	57.1

$X^2 = 21.356$ GI = 1 ($p < 0.01$)



Al realizar el análisis de la Tabla Nº 6, donde se determina la resistencia de Staphylococcus coagulasa negativo a la oxacilina por el método de difusión en agar (K-B); podemos apreciar, que de un total de 45 cepas intrahospitalarias, el 55.5% fueron resistentes al antibiótico probado y cuando analizamos las cepas ambulatorias, de un total de 39, el 25.6% fueron resistentes.

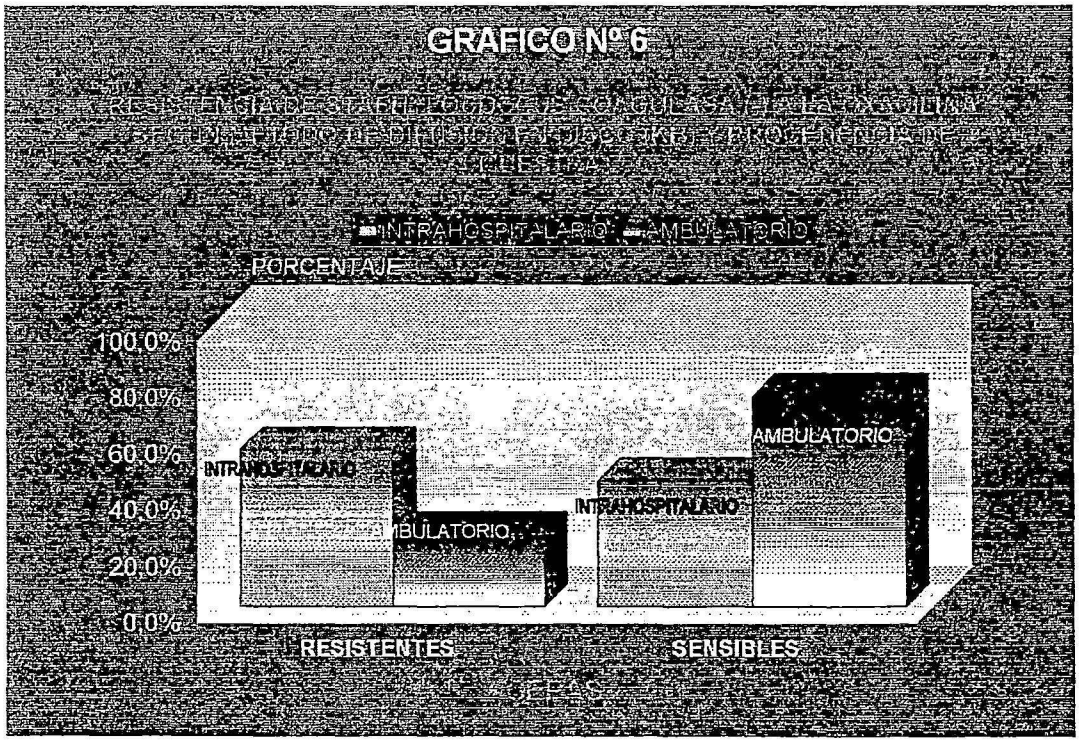
Al aplicar el chi cuadrado, encontramos un valor calculado de X^2 = 6.511, valor que es mayor que el chi cuadrado tabular X^2 = 3.841; por lo que se concluye, que las diferencias son significativas (p< 0.05). Tabla Nº 6, Gráfico Nº 6.

TABLA Nº 6

RESISTENCIA DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA NEGATIVO A LA OXACILINA SEGUN METODO DE DIFUSION EN DISCO (K-B) Y PROCEDENCIA DE MUESTRA

PROCEDENCIA	TOTAL DE CEPAS	CEPAS RESISTENTES		CEPAS SESIBLES	
	Nº	Nº	%	Nº	%
INTRAHOSPITALARIO	45	25	55.5	20	44.5
AMBULATORIO	39	10	25.6	29	74.4
TOTAL	84	35	41.6	49	58.4

X^2 = 6.511 GI = 1 (p< 0.05)



La resistencia de Staphylococcus aureus, también fue analizada frente a discos de meticilina usando la técnica de

dilución en agar, encontrándose un 85.2% de cepas intrahospitalarias resistentes, mientras que las cepas ambulatorias resistentes fueron un 44.0%.

Haciendo el análisis estadístico, mediante la prueba del Chi Cuadrado para ver la significancia entre la resistencia de cepas hospitalarias versus cepas ambulatorias resistentes fueron un 44.0%.

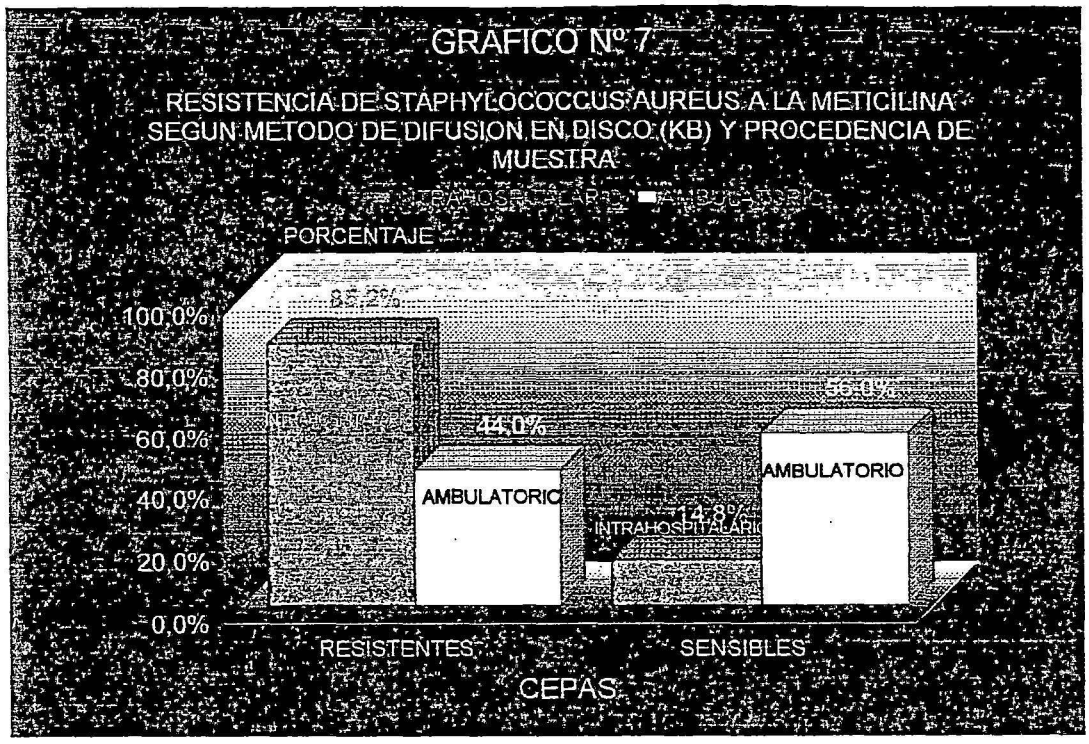
Haciendo el análisis estadístico, mediante el Chi Cuadrado para ver la significación entre la resistencia de cepas hospitalarias versus cepas ambulatorias encontramos un valor calculado de: X^2=25.741 valor que es mayor que el de la tabla X^2=6.635 por lo que se concluye que las diferencias son altamente significativas (p<0.01). Tabla Nº 7, Gráfico Nº 7.

TABLA Nº 7

RESISTENCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS A LA METICILINA SEGUN METODO DE DIFUSION EN DISCO (K-B) Y PROCEDENCIA DE MUESTRA

PROCEDENCIA	TOTAL DE CEPAS	CEPAS RESISTENTES		CEPAS SENSIBLES	
	Nº	Nº	%	Nº	%
INTRAHOSPITALARIO	**61**	**52**	85.2	**09**	14.8
AMBULATORIO	**109**	**48**	44.0	**61**	56.0
TOTAL	**170**	**100**	58.8	**70**	41.2

X^2 = 25.747 GI = 1 (p< 0.01)



Cuando se realizó la resistencia a la meticilina por la de difusión en agar (K-B) de Staphylococcus coagulasa negativo estudiads (S.epidermidis, S. haemolyticus y S. saprophyticus), se encontró que de un total de 45 cepas intrahospitalaria el 55.5% (25) fueron resistentes y de un total de 39 cepas ambulatorias 28.2 (11) fueron resistentes.

Aplicado la prueba de chi cuadrado para determinar si los estafilococos coagulasa negativo presentan diferencias de acuerdo a la procedencia de nuestras, se encontró un valor calculado de X^2=5.314 valor mayor al Chi Cuadrado tabular X^2=3.841 por tanto se afirma que las diferencias fueron significativas (p<0.05). Tabla Nº 8, Gráfico Nº 8.

TABLA Nº 8

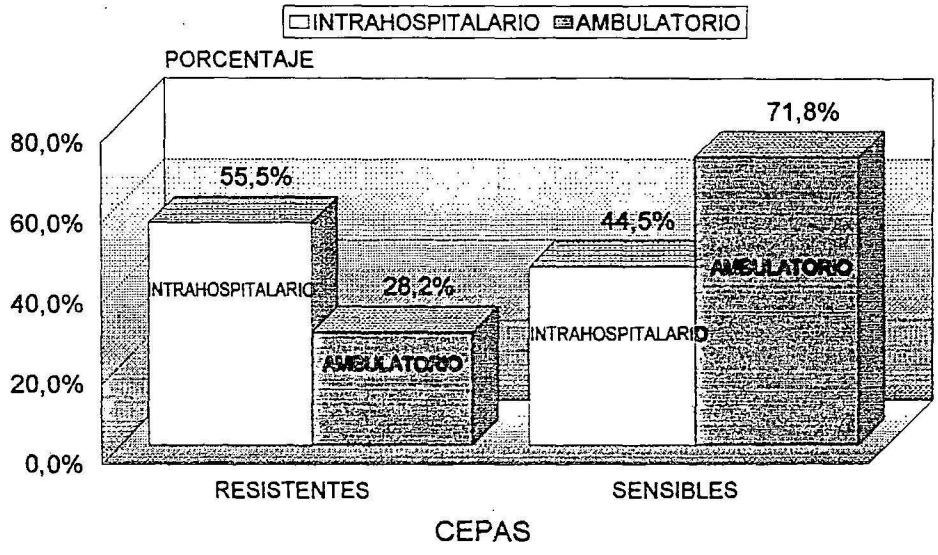
RESISTENCIA DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA NEGATIVO A LA METICILINA SEGUN METODO DE DIFUSION EN DISCO (K-B) Y PROCEDENCIA DE MUESTRA

PROCEDENCIA	TOTAL DE CEPAS	CEPAS RESISTENTES		CEPAS SENSIBLES	
	Nº	Nº	%	Nº	%
INTRAHOSPITALARIO	45	25	55.5	20	44.5
AMBULATORIO	39	11	28.2	28	71.8
TOTAL	84	36	42.8	48	57.2

X^2 = 5.314 GI = 1 ($p < 0.05$)

GRAFICO Nº 8

RESISTENCIA DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA (-) A LA METICILINA SEGUN METODO DE DIFUSION EN DISCO (KB) Y PROCEDENCIA DE MUESTRA



La tabla Nº 9 examina la actividad antimicrobiana de oxacilina en 106 cepas intrahospitalarias de staphylococcos teniendo en cuenta la concentración mínima inhibitoria para el 50 y 90% del total de cepas analizadas.

Observamos las frecuencias absolutas, frecuencias acumuladas y frecuencia relativa acumulada. Estos datos nos conducen a la determinación del MIC_{50} (concentración del antibiótico que inhibe el 50% del total de cepas analizadas) y MIC_{90} (concentración del antibiótico que inhibe el 90% del total de cepas analizadas).

En consecuencia se determinó que para las cepas de Staphylococcus intrahospitalarios examinadas, el MIC_{50} fue de 16 ug/ml de oxacilina. Tabla Nº 9.

TABLA Nº 9

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE OXACILINA EN CEPAS INTRAHOSPITALARIAS DE STAPHYLOCOCCUS

CONCENTRACION DEL ANTIBIOTICO (ug/ml)	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA ACUMULADA	FRECUENCIA RELATIVA (%)
0.125	18	18	16.9
0.25	08	26	24.5
0.5	06	32	30.2
1	06	38	35.8
2	08	46	43.3
4	00	46	43.3
6	02	48	45.2
8	04	52	49.0
16	06	58	54.7
32	06	64	60.3
64	14	78	73.5
128	06	84	79.2
256	08	92	86-7
512	14	106	100.0

MIC_{50} = 16 ug/ml

MIC_{90} = 512 ug/ml

La Tabla Nº 10, analiza la actividad antimicrobiana de oxacilina en 148 cepas ambulatorias de Staphylococcus, donde se tiene en cuenta la concentración mínima inhibitoria que inhibe el 50% (MIC_{50}) o el 90% (MIC_{90}) del total de cepas examinadas.

Observamos las diferentes concentraciones usadas, de la oxacilina, las frecuencias absolutas, frecuencias acumuladas y la frecuencia relativa acumulada (%), determinándose con estos datos que el MIC_{50} es igual a ug/ml y el MIC_{90} igual a 256 ug/ml. Tabla Nº 10.

TABLA Nº 10

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE OXACILINA EN CEPAS AMBULATORIAS DE STAPHYLOCOCCUS

CONCENTRACION DEL ANTIBIOTICO (ug/ml)	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA ACUMULADA	FRECUENCIA RELATIVA (%)
0.125	08	08	5.4
0.25	21	29	19.5
0.5	39	68	45.9
1	24	92	62.1
2	14	106	71.6
4	02	108	72.9
6	02	110	74.3
8	02	112	75.6
16	02	114	77.0
32	06	120	81.0
64	06	126	85.1
128	02	128	86.4
256	06	134	90.5
512	14	148	100.0

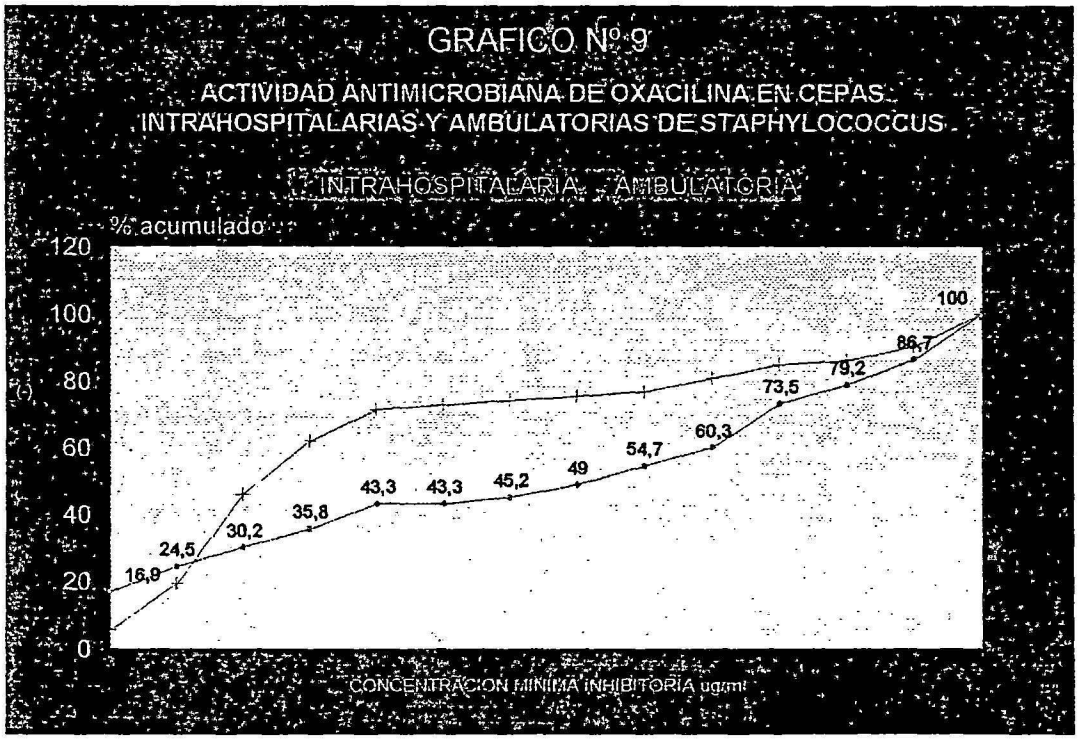
MIC_{50} = 1 ug/ml

MIC_{90} = 256 ug/ml

Al comparar la actividad antimicrobiana de oxacilina en cepas intrahospitalarias y ambulatorias, observamos que hay diferencias tanto en el MIC_{50} como en el MIC_{90} en ambos grupos hospitalarios y ambulatorios.

Mientras que el MIC_{50} en cepas intrahospitalarias es igual a 16 ug/ml, en cepas ambulatorias es 1 ug/ml, esto nos idica el mayor grado de resistencia de los Staphylococcus hospitalarios en relación a los ambulatorios.

En relación al MIC_{90} para cepas intrahospitalarias es igual a 512 ug/ml, para cepas ambulatorias es igual a 256 ug/ml, también se nota la diferencia de concentración que requiere la oxacilina para inhibir el desarrollo bacteriano ya sea en cepas hospitalarias o ambulatorias. Gráfico Nº 9.



V. DISCUSION

Desde que el hombre descubrió y comprobó científicamente que los microorganismos son causantes de las enfermedades llamadas infecciosas, ha buscado la forma de combatirlos mediante el uso de sustancias químicas que selectamente maten microorganismos y no células huesped. Estas sustancias son conocidas como Antimicrobianos o Antibióticos (9, 12, 16, 19).

Por otro lado los microorganismos estan desarrollando formas de evasión de la actividad de los antibióticos, mediante mecanismos diversos, generalmente genéticos, es así que se ha observado en los últimos años un aumento de la resistencia bacteriana especialmente a los antibióticos B-lactámicos (10, 11, 12).

Siendo los Staphylococcus, uno de los gérmenes emergentes causantes de infecciones intrahospitalarias y la oxacilina/meticilina uno de los indicadores más confiables de resistencia a los antibióticos penicilínicos Beta-lactámicos, se desarrolló la presente investigación y nuestros resultados en términos generales coinciden con otros investigadores nacionales (11, 24) y extranjeros (1, 17, 22, 26).

Dentro del grupo de los Staphylococcus, existen varias especies; siendo unas más frecuentes que otras, nosotros encontramos a S. aureus como la especie más frecuente, tanto en infecciones intrahospitalarias como ambulatorias (66.9%). Ver Tabla Nº

1, Gráfico Nº 1, estos resultados son similares a lo encontrado por otros autores (5, 6, 8, 14).

Los Staphylococcus epidermidis, S. saprophyticus y S. haemolyticus, anteriormente considerados no patógenos, se reconoce en la actualidad el poder patógeno que poseen y por lo tanto no hay que desestimar su presencia y aislamiento (5, 11, 24), nosotros encontramos un 33.1% de estos Staphylococcus como causantes de infecciones intrahospitalarias y ambulatorias.

Los Staphylococcus que dan una respuesta positiva a la prueba de COAGULASA, son más frecuentes tanto en infecciones hospitalarias como ambulatorias (Ver Tabla Nº 2, Gráfico Nº 2), esto concuerda con otros autores (5, 14, 21); sin embargo, cuando se investigaron causas de bacteremias en hospitales de Lima, encontraron una mayor frecuencia de Staphylococcus coagulasa negativo en relación a los coagulasa positivo (11).

Siendo la meticilina/oxacilina los indicadores más sensibles para determinar resistencia a los betalactámicos (1, 2, 10, 12, 17, 18, 21, 23) hemos usado estos antibióticos frente a cepas de Staphylococcus aislados de pacientes hospitalizados y ambulatorios, encontrando en términos generales que los Staphylococcus meticilino-resistentes representan cada vez más un mayor porcentaje de todos los estafilococos (11, 17, 22, 26).

Se analizó en esta investigación, la influencia del orígen

(intrahospitalario-ambulatorio) de las muestras como objetivo primario; y la técnica empleada como un objetivo adicional. Los resultados que a continuación discutiremos, se encontraron usando la técnica de la concentración mínima inhibitoria (MIC) que tiene una mayor aceptación y sensibilidad que otras técnicas conocidas (2, 4, 15). Para determinar meticilino-resistentes, es posible usar OXACILINA por compartir caracteristicas de grupo de las penicilinas, penicilina-resistentes o antiestafilocócicas y sobretodo por su mayor estabilidad in vitro (2, 12, 27).

Se encontró que los Staphylococcus aureus meticilino-resistentes (SAMR) intrahospitalarios representaron un 67.2%, este hallazgo es similar a lo reportado por otros investigadores nacionales (11 y 24) y representa un porcentaje mayor al descrito por investigadores extranjeros, quienes encontraron entre 38.3-45.6% de cepas intrahospitalarias resistentes (17, 21, 22).

Los SAMR ambulatorios representan un 29.3%, cifra que resulta ligeramente menor al encontrado en nuestro medio por CORNEJO y colaboradores, quienes encontraron un 33.3% de estafilococos resistentes a oxacilina en muestras de la comunidad (24).

En relación a los Staphylococcus coagulasa negativo (SCN) intrahospitalarios meticilino-resistentes, encontramos un 42.2%; cifra que está entre el 23 y 52% encontrado por investigadors nacionales en diferentes hospitales de Lima (11), en tanto los estafilococos coagulasa negativo meticilino-resistentes de procedencia ambulatoria representaron un 20.5%, no habiendo referencias nacionales para contrastar estas cifras, las comparamos con otros investigadores cuyos porcentajes oscilan entre 9.5 y 28.7% (1, 4, 26).

Paralelamente a la determinación de estafilococos meticilino-resistentes usando MIC_S se trabajó con la técnica de dilución en agar (Kirby-Bauer) usando discos de oxacilina y meticilina; encontrando algunas diferencias y semejanzas en los resultados; sin embargo, la técnica más sensible y más usada es la de MIC (2, 4, 15, 17, 23).

De acuerdo a estos resultados se puede establecer claramente que las diferencias de resistencia a la meticilina estan determinadas por la procedencia de la muestra; siendo mayor en ambientes intrahospitalarios con relación a los ambulatorios.

VI. CONCLUSIONES

1. Se han encontrado diferencias altamente significativas entre la resistencia a Meticilina,de cepas de Staphyococcus aureus procedentes de ambientes intrahospitalarios(67.2%) y ambulatorios(29.3%) , según el método de concentración mínima inhibitoria(MIC) ($P< 0.01$).

2. Se han hallado diferencias significativas entre la resistencia a Meticilina,de cepas de Staphyococcus coagulasa negativo procedentes de ambientes hospitalarios (42.2%) y ambulatorios(20.5%) , según el Método de Concentración Mínima Inhibitoria(MIC) ($P< 0.05$).

3. Se han hallado diferencias altamente significativas entre la frecuencia de cepas meticilino-resistentes de Staphylococcus aureus de procedencia intrahospitalaria y ambulatoria,con el Método de Difusión en Agar (K-B) usando Meticilina y Oxacilina ($p<0.01$).

4. Se han hallado diferencias significativas en la entre las frecuencias de cepas meticilino-resistentes de Staphylococcus coagulasa negativo de procedencia intrahospitalaria y ambulatoria,con el Método de Difusión en Agar (K-B) usando Meticilina y Oxacilina ($p<0.05$).

5. La técnica de concentración mínima inhibitoria(MIC) y la de Difusión en Agar (Antibiograma - K-B),usando los antibióticos Oxacilina y Meticilina , presentaron resultados semejantes en la determinación de Staphylococcus meticilino-resistentes. Las diferencias halladas no fueron estadísticamente significativas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1.- **ALDRIDGE. KE y COL.** 1983. Interlaboratory variation of antibiograms og methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus strains with conventional and comercial testing systems J. Clin Microbiol 18: 1226-1236

2.- **BAKER. CN.**1994 Optimizing. Testing of methicillin-resistant Staphylococcus species- Diagn. Microbiol-infect-Dist. 19 (3): 167-70.

3.- **BARNES A. BOGDANOV P, ALBESA I:** 1994 Estudio de la influencia del PH en la actividad in vitro de Amoxicilina -Sulbactan en S. aureus y de la selección de cepas resistentes. Infect. Microbiol Clín. Vol 6 (3). 118-215.

4.- **BOYCE J.M** 1984. Reevalvation of the ability of the standardized disk diffusion test to methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus- J. Clin Microbiol. 19:813-817.

5.- **BOUZA, E Y COL.**1988: Estudio multicéntrico sobre la prevalencia de estafilococos en España. Enf. Infec y Microbiología Clínica, 6:3; 100-111.

6.-**BROCK Y Col.** 1993 Microbiología. Edit. Prentice Hall-Hispanoamericana S.A. México. Sexta Edición. pp. 545-554..

7.- **BRUNS-O; PULVERER .G.** 1997. Regulation of. beta lactanase synthesis as a novel site of action for su ppression of methicillin resistance in S. aureus- Zentralb-Bakteriol (1997) 285 (3). 413-30.

8.- **CORRAL J. Y Col.** 1993. Epidemiología Descriptiva de la Endocarditis infecciosa en un hospital general. Infect 2 Microbiol. Clin Vol 5 N-18-13.

9.- **DROBNIC, L.** Tratamiento Antimicrobiano-Doyma Barcelona.1993.

10.- **GARCIA LOPEZ, J. L Y COL**: 1988, Actividad de teicoplanina, ciprofloxacina y otros antibióticos frente a Staphylococcus. Enf. Infec. Microbiología Clínica, 6:3, 83-86

11.- **GUEVARA J. Y COL.** 1994: Resistencia a Oxacilina en Staphylococcus aislados de Bacteremias Intrahospitalarias. Revista Peruana de epidemiología (7)2 pag 27-29

12.- **GOODMAN y GILMAN**. 1987- Las bases Farmacológicas de la Terapeutica . Septima de. Edit. Panamericana Buenos Aires 1077-1088

13.- **HANAKI H.** 1997 Molecular desing of anti MRSA Drugs. Nippon Rinsho. 55(5):1281-6.

14.- **JAWETZ:** 1996 Microbiología Médica. 15ava. edición. Editorial Interamericana. México. Pag. 223-229.

15.- **KAMPF. E. and Col** 1997 Comparison of screening methods to identify methicillin-resistant staphylococcus aureus- EVR- J- clin-Microbiol-infect-Dist. 16(4):301-307.

16.- **LIEBANA U. JOSE**: 1995Microbiología Oral Editorial Mc. Graw Hill-Interamericana. Primera edición, 62-87.

17.- **MARTINEZ-BELTRAN, J Y COL**: 1988, Resistencia a meticilina en Staphylococcus aureus. Enf. Infec y Microbiología Clínica, 6:3, 61-66.

18.- **MEHTAR S.** 1994: The continuing problem of hospital Staphilococci why ?- chemother 6:4, 25-31, 39-40.

19.- **MURRAY P.R. y Col.:** 1992Microbiología Médica. Mosby year Book de España. Madrid.Editorial Interamericana.

20.- **OKAMOTO; OKUBO T; M.** 1996 Detection of genes regulating beta-lactamase production in enterococcus faecalis and staphylococcus aureus-Antimicrob. Agents chemoter. 40 (11): 2550-54.

21.- **PAGANINI H.R.** 1995. Clinical virulence of nosocomial acquired methicillin. Resistant and methicilin- sensitive S. aureus bacteremias in children 7-36-39.

22.- **PAULILIO, A. L Y COL**: 1992 Methicillin resistent Staplylococcus aureus in U.S. hospitals 1975-1991. Infect Control Hosp Epidemiol oct 13(10) 582-6.

23.- **SAHM D.F.** 1991. Antibacterial susceptibility tests. Dilution methods. In Balow A. hausler W.J.Jr, K.L.(eds) Manual of clinical Microbiology. Fifth edition. Washingtong American Society for Microbiology .105 -1116.

24.- **SANCHEZ H, LUIS** : 1997; Staphylococcus- Un patógeno de gran virulencia. Revista Médica 3-16,17- pag 8-10.

25.- **THORNSBERRY -C; YC** 1996 Comparative Activity of. eight antimicrobial agents against clinical bacterial isolates from. The united states, measured by two methods. Am- J. Med. 100 (6A) 268-389.

26.- **TRILLA, A Y COL**: 1991 Infecciones nosocomiales por Staphylcoccus aureus resistentes a la meticilina. Un reto para el control de infecciones. Enf. Infec y Microbiol. Clínica, , 9:4, 193-195.

27.- **UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION-OPS/OMS** 1989, Informacion de medicamentos Tomo II Ministerio de Sanidad y consumo de España Edit. Informatizadas S.A.