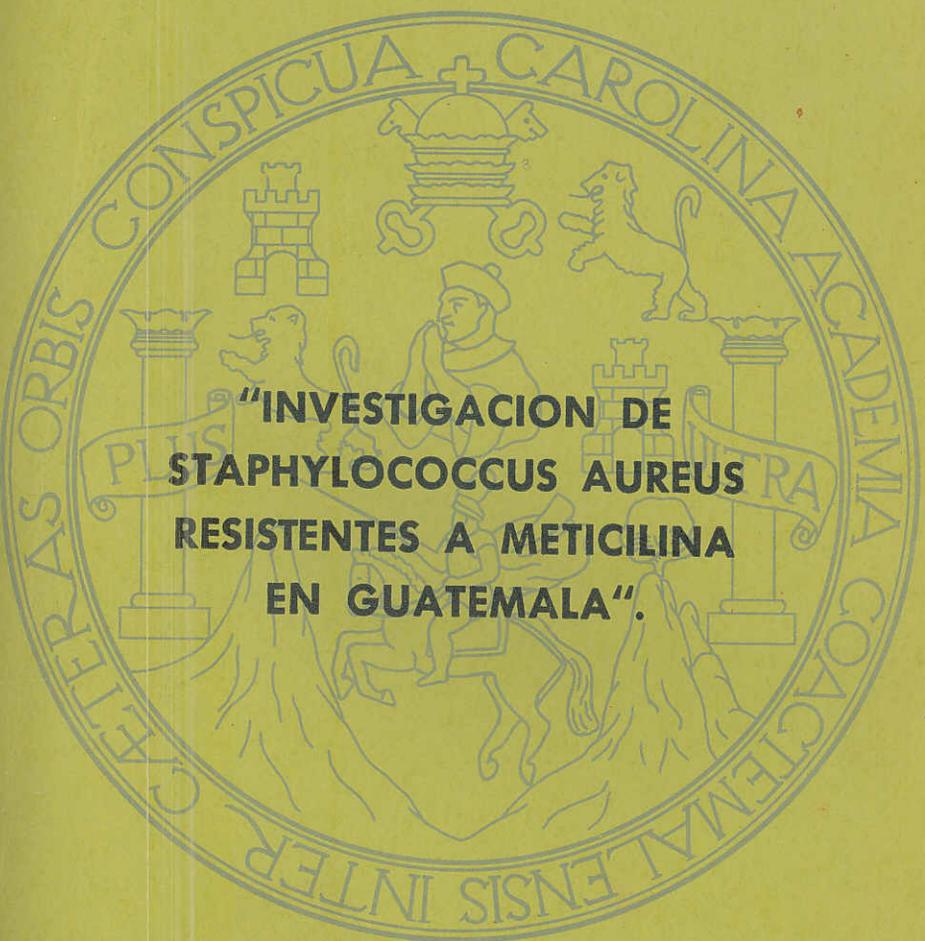


197
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man on horseback, likely a saint or historical figure, holding a staff. Above him is a crown and a lion. The seal is surrounded by Latin text: "CONSPICUA + CAROLINA ACADEMIA" at the top and "CAETERAS ORBIS PLURIS ALTRA COACIEMAL ENNIS INTER" at the bottom.

**"INVESTIGACION DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
RESISTENTES A METICILINA
EN GUATEMALA".**

JOSE LUIS GONZALEZ MORAN

PLAN DE TESIS

- I. INTRODUCCION*
- II. OBJETIVOS*
- III. ESTAFILOCOCO DORADO*
- IV. ENFOQUE DEL PROBLEMA ESTAFILOCOCCICO*
- V. METICILINA*
- VI. MATERIAL Y METODOS*
- VII. RESULTADOS*
- VIII. DISCUSION*
- IX. CONCLUSIONES*
- X. RECOMENDACIONES*
- XI. BIBLIOGRAFIA*

INTRODUCCION

Honorable Tribunal Examinador:

Tengo el honor de someter a vuestra distinguida consideración mi trabajo de tesis titulado: "Investigación de *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina en Guatemala".

A lo largo de la práctica hospitalaria llamó mi atención gran cantidad de pacientes con infecciones estafilocócicas, muchas de ellas mortales, notando la variabilidad de tratamiento establecidos y la respuesta poco uniforme obtenida, además del constante temor a tal microorganismo manifestado por el grupo médico.

Teniendo conocimiento por trabajos hechos en el exterior de que el estafilococo dorado ha adquirido resistencia a muchos antibióticos, entre ellos la Meticilina, considerado como uno de los más efectivos actualmente, me sentí motivado a realizar un trabajo de investigación para determinar si existían en Guatemala cepas de estafilococo dorado que fuesen resistentes.

El presente trabajo constituye un estudio de doscientas veinte y ocho cepas hospitalarias a las cuales se les determinó su sensibilidad a la Meticilina, buscando cepas resistentes a ella. En el transcurso de seis meses en que esta investigación fue hecha me acompañaron muchas veces sentimientos de alegría, cansancio, optimismo y desaliento, comprendiendo entonces el sentimiento del investigador, experimentando sus emociones al ver con alegría el resultado palpable de algo que inicialmente eran proyectos, ideas e imaginación.

Al hacer este trabajo de investigación en el laboratorio, me sentí halagado al emular la labor del investigador científico, base actual de la Medicina contemporánea. Al concluir el mismo, me di cuenta de que éste hubiese sido imposible sin la decidida y desinteresada colaboración, tanto de los pacientes, como de mis compañeros de trabajo en el hospital y del personal paramédico del mismo, con lo cual

comprobé que la Medicina sigue siendo labor de equipo; tendría que mencionar especialmente al personal del laboratorio bacteriológico del Hospital General "San Juan de Dios", sin cuyo concurso este trabajo se hubiera quedado en proyecto.

Digno de hacer mención es el hecho de que el trabajo de laboratorio me pareció muy completo, pues no sólo deja un cúmulo de conocimientos exactos, sino una agradable experiencia que enriquece nuestro saber.

Quiero agradecer en esta ocasión, la valiosa ayuda proporcionada por los doctores José Luis Bran y Federico Sánchez G., así como a los técnicos de laboratorio señor Leonel Pérez y señoras Lidia Vielman de Rivera y Thelma Meléndez de Fernández. Y, a vosotros, Honorables Miembros del Tribunal Examinador, presento las muestras de mi mayor estima y respeto.

HE DICHO.

O B J E T I V O S

Dado el interés y la necesidad de determinar la existencia en nuestros hospitales de cepas de estafilococo dorado resistentes a la Meticilina y no encontrando evidencia de que se hubiese efectuado algún trabajo anterior sobre tal hecho en Guatemala, creí necesario investigar si existían o no cepas resistentes a dicho antibiótico.

Es sabido que el estafilococo dorado es causante de muchas enfermedades, desde la furunculosis, a la mortal septicemia. Existen trabajos de investigación efectuados en otros países en los cuáles se demuestra resistencia del germen a múltiples antibióticos, incluyendo la Meticilina, que en investigaciones recientes se toma como patrón de resistencia,

considerando un estafilococo resistente cuando es capaz de crecer en una concentración de 12,5 microgramos de Meticilina por mililitro.

Estimo que el presente trabajo contribuirá aunque sea en mínima parte a tal objetivo, pues de ello depende el éxito terapéutico en el tratamiento de pacientes infectados por este germen y servirá de base para que en trabajos posteriores se tenga un índice de tal resistencia.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS (11)

Son cocos gram positivos, anaeróbicos facultativos, inmóviles, que tienden a crecer en racimos irregulares. Dos especies, el aureus y el albus son reconocidas y constituyen un género en la familia Micrococacaceae. El estafilococo dorado es responsable de una variedad de desórdenes clínicos en el hombre y en los animales, desde pústulas, intoxicación alimenticia a septicemia fulminante; sin embargo, se encuentra también como habitante normal de la piel y mucosas humanas en ausencia de enfermedad presente. Aunque la mayoría de cepas producen un número de enzimas biológicamente activas, los mecanismos fundamentales del desarrollo y persistencia de la enfermedad son pobremente comprendidos. El interés en la patogénesis de la enfermedad estafilocócica ha aumentado en años recientes por una aparente incidencia creciente de enfermedades severas, particularmente en medios hospitalarios, donde muchas cepas son resistentes a los agentes antimicrobianos los cuales han sido efectivos contra otros cocos piógenos.

Morfología — En preparaciones fijadas (de pus), aparecen como un grupo irregular de cocos, elementos simples, pares, tetradas y también se ven cadenas cortas. La formación de masas irregulares es más evidente en cultivos de agar y menos prominente en medios líquidos. Se dividen de manera irregular en dos planos en ángulos rectos uno a otro, dando racimos.

Miden de 0.8 a 1.0 micras de diámetro y son más

pequeños que los micrococcos saprófitos. Son esféricos pero sus superficies de oposición pueden parecer algo aplanadas. Son fuertemente gram positivos. No tienen flagelos ni esporas.

Algunas cepas de estafilococo dorado son claramente encapsuladas, pero otras no y no existe relación entre la formación de cápsula y patogenicidad.

Con microscopio electrónico se observa que el fino citoplasma granular está rodeado de una delicada membrana, la cual está netamente separada de la gruesa y rígida pared celular.

Cultivos — Crece fácilmente en gran variedad de medios nutrientes. Los requerimientos de aminoácidos varía de cepa a cepa, pero la cistina, valina, glicina, prolina, ácido aspártico y leucina son usualmente necesarios. (5) La tiamina y el ácido nicotínico son esenciales para el crecimiento en medio aeróbico. La temperatura de crecimiento máximo es de 36°C a 38°C, pero el organismo puede multiplicarse bien a temperaturas de 10 a 45°C. Muchas cepas crecen sobre un ancho grado de pH, 4.8 a 9.4, pero lo óptimo es cerca de un pH. neutro.

Las colonias individuales en agar son redondas, convexas con un diámetro de 1 a 4 mm. y un borde agudo. La mayoría de las cepas no son mucoides. La producción de pigmento por el estafilococo dorado varía de blanco a amarillo dependiendo de la cepa y el medio usado. En cajas con agar sangre aparece frecuentemente rodeado de una zona de hemólisis clara. El pigmento amarillo oro que se encuentra más comunmente es debido a los carotenoides, delta caroteno y rubixanteno. El pigmento no está asociado a la patogenocidad del mismo.

Variedad — En un cultivo dado, las colonias pueden aparecer con pigmentación alterada, con variaciones cuantitativas y cualitativas en la producción de enzimas difusibles y toxinas; también con susceptibilidad variable a los bacteriófagos y agentes antimicrobianos.

Las formas G fueron notadas en medios con cloruro de litio y son también producidas en medio que contenga antibiótico, especialmente penicilina (23). Las bacterias resistentes a bacteriófagos en un cultivo sensible también pueden formar colonias G; éstas son aplanadas y sin pigmento, tienen un alto punto término de muerte, no producen alfa hemolisina, forman poca o nada de coagulasa libre y son resistentes a los antibióticos. La reversión ocurre después de un período variable de tiempo. Las bacterias parecen ser normales excepto por unas pocas formas hinchadas. Han sido aisladas de lesiones de pacientes no tratados, así como de los que recibieron tratamiento con antibióticos.

Las formas L han sido también aisladas de medios con penicilina. Difieren de las G morfológicamente y en su requerimiento de condiciones hipertónicas para su aislamiento inicial.

Clasificación — En ausencia de un método preciso y práctico de diferenciación serológica, se usa ampliamente el tipo bacteriófago del *estafilococo dorado*. Del gran número de fagos líticos conocidos, sólo un set básico de trabajo es usado generalmente de rutina para tipificarlos y es como sigue:

Grupo I: 29, 52, 52 1, 79 y 80

Grupo II: 3 A, 3 B, 3 C, 66 y 71.

Grupo III: 6, 7, 42 E, 47, 53, 54, 75, 77 y 83 A

Grupo IV: 42 D

Misceláneos: 81 y 87

Hay prevaencia de resistencia a múltiples antibióticos en cepas tipificadas por fagos del Grupo I y III. (15)

Toxinas y Enzimas

Alfa toxina (alfa hemolisina) — Es una proteína lábil al calor de peso molecular 44000. Una cantidad tan pequeña como 0.008 microgramos lisa una suspensión *estandar* de eritrocitos de conejo. Los eritrocitos humanos son de 25 a 150 veces más resistentes a ella. El mecanismo de acción de la alfa hemolisina no está esclarecido. No tiene actividad proteolítica. Preparaciones impuras causan marcada contracción del músculo liso, pero el estriado no es afectado. (9)

Beta hemolisina — Hay evidencia de que es una fosfolipasa que *hidroliza* esfingomielina y que la diferente susceptibilidad de los eritrocitos de las diferentes especies es debida a la disponibilidad de este sustrato. (22)

Delta hemolisina — Es una proteína sensible a tripsina con un peso molecular de 70,000. Hemolisa los eritrocitos humanos. El hallazgo patológico más grande es la lesión nefrítica aguda.

Leucocidinas. — Hay tres diferentes substancias leucocitotóxicas. Una, la P-V leucocidina o "leucocidina humana" afecta las células humanas. Su adición a una suspensión de granulocitos humanos, en presencia de iones de calcio, causa una degranulación de las células y la formación de vesículas en el citoplasma. Consta de 2 componentes proteicos, ambos necesarios para que haya leucotoxicidad.

Coagulasa libre — Es una proteína lábil al calor la cual es destruida por la tripsina y la pepsina. Menos de 0.1mcg puede coagular el plasma humano en 24 horas. Es débilmente antigénica pero al menos 7 estafilocoagulasas antigénicamente distintas han sido reconocidas. Hay una relación entre el tipo de coagulasa producida por un organismo, y su tipo bacteriófago, pero no existe una correlación con la clasificación serológica.

Coagulasa de unión — Cuando el estafilococo dorado es mezclado con plasma en un vidrio en el cual se desliza, aparecen grumos gruesos debidos a la deposición de fibrina

alrededor del organismo. Este test se correlaciona bien con el de coagulasa en tubo y originalmente se creyó que ambos reflejaban actividad del mismo producto, la coagulasa libre. Es claro ahora que otra coagulasa, la de unión, es responsable para el test de deslizamiento en vidrio (laminilla). La diferencia entre ambas consiste en que la coagulasa de unión convierte el fibrinógeno directamente a fibrina sin requerir un factor accesorio del plasma.

Estafiloquinasa (Fibrinolisisina) — Es formada por el 70 a 90 o/o de las cepas y activa el plasminógeno de muchas especies y no requiere un proactivador del plasma. Causa la activación del plasminógeno a la enzima fibrinolítica, plasmina. (10) Por esta razón el término estafiloquinasa es preferido al de fibrinolisisina.

Hialuronidasa — El 90 o/o de los estafilococos producen esta enzima la cual depolimeriza los mucopolisacáridos. (20) Es antigénica.

Penicilinas — Muchas cepas de estafilococo dorado, particularmente las lisadas por los bacteriofagos en los Grupos I y III son resistentes a la penicilina. La resistencia es debida a la inactivación de la penicilina por una enzima, la penicilinas, la cual abre el anillo b-lactam de la molécula. Su producción puede ser incrementada por la exposición de los organismos a algunas de las penicilinas sintéticas, a despecho del hecho de que estos compuestos son solamente mínimamente susceptibles a la enzima (5) La formación de penicilinas ha sido demostrada en cepas aisladas antes del uso general del antibiótico sugiriendo que la prevalencia corriente de cepas penicilino resistentes es el resultado de un grado de selección más que de mutación reciente.

Enterotoxina — La mayoría de casos de envenenamiento alimenticio relacionados con bacterias o productos bacterianos son causados por enterotoxina estafilocócica. Es producida por unas pocas cepas de estafilococos aureus y éstos son generalmente de tipo fago 6/47 o 42 D. Existen varios tipos antigénicamente distintos de enterotoxinas. La A y la B son

las más comunes; las enterotoxinas son básicamente proteínas tripsino-resistentes, ricas en lisina. La B tiene un peso molecular de 24000 y está libre de lípidos y carbohidratos. La enterotoxina es pirogénica y su sitio de acción no está bien determinado pero todo indica que sus efectos son mediados por neuronas centrales y/o periféricas más que a través de una acción directa sobre el intestino.

Otras substancias — Entre estas se encuentran nucleasas, proteasas, fosfatasa, lipasa y fosfolipasa. Ciertas cepas también producen una autolisina.

Datos de Laboratorio y Mecanismos de Defensa:

La mayoría de los autores coinciden en que la resistencia a la Meticilina es en parte debida a la habilidad de producir una cantidad excesiva de penicilinas, (4) causando así una inactivación mayor que lo normal del antibiótico; y, más importante aún, a una resistencia "innata" a la Meticilina. Se ha establecido recientemente que la mayoría de cepas de estafilococos dorados meticolino-resistentes deben, de hecho, producir cantidades mayores que lo normal de penicilinas, pero también es claro que algunas cepas producen una cantidad promedio de penicilinas y unas pocas producen menos cantidad que lo normal producida por cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a Meticilina. La así llamada resistencia "innata" parece residir en lo que se ha dado en llamar variantes de colonias pequeñas (9); éstas son bacterias que parecen sobrevivir en concentraciones grandes de Meticilina, pero que crecen muy lentamente volviéndose colonias ligeramente translúcidas sobre el agar que contiene meticolina a las 48 horas de incubación. Cuando se incuban por 24 horas solamente, pueden ser invisibles al ojo humano. Las variantes de colonias pequeños tienen a las 48 horas, 1/25 del tamaño de la colonia del estafilococo y no poseen el calor amarillo o blanco característico del mismo. Este puede ser la razón de que muchas de estas cepas no sean reconocidas en los test de sensibilidad estandar de los hospitales que sólo incuban por 24 horas sus especímenes.

Otro aspecto poco frecuente de la resistencia a la

Meticilina demostrado por estas cepas es su naturaleza heterogénea. No todas las bacterias de un inóculo dado son resistentes y cuando la concentración de meticolina es aumentada, hay reducción en la proporción de bacterias del inóculo original capaces de sobrevivir.

Aunque las variantes de colonia pequeña de crecimiento lento pueden ser relativamente virulentas por sí mismas, hay un alto grado de reversión a bacterias capaces de tener un crecimiento de reproducción normal y que aún mantienen su capacidad de resistencia a la meticolina. Estudios como microscopio electrónico han demostrado que éstas bacterias tienen pared celular y ultraestructura normal, pero otras técnicas de laboratorio demuestran anomalías a nivel de dicha pared celular.

Roger J. Bulger (8) hipotetiza que la resistencia innata a la meticolina se desarrolla a causa de una mutación que afecta a la pared celular de la bacteria, lo que puede prevenir la penetración del antibiótico al sitio de actividad antibacteriana.

Tinciones de Gram de las cepas resistentes a la meticolina, indican que hay gran irregularidad en la medida y fijación de los cocos y la presencia de formas hinchadas, lo que sugiere que este antibiótico puede inhibir la síntesis de la pared celular sin prevenir su multiplicación. Trabajos posteriores demostraron que con adición de un exceso de electrolitos (cloruro de sodio al 5 o/o) ó con una disminución en la concentración del agar el crecimiento en presencia de meticolina fue casi igual que el hallado en cajas que no contenían tales electrolitos.

La incubación inicial bajo condiciones anaeróbicas también mejora el crecimiento de estas cepas en presencia de uracilo. A despecho de su diversidad de origen, todas las cepas participan de una semejanza peculiar y así como en el caso del primer estafilococo aureus aislado de pacientes, todas pertenecen a unos pocos tipos bacteriófagos estrechamente relacionados.

Se ha observado que existe un crecimiento masivo en el sitio del inóculo más denso, lo que sugiere que en presencia de

metecilina, estos organismos pueden multiplicarse solamente cuando están juntos.

El límites de pH de 6-8 no se notan diferencias significativas.

Se ha comprobado que el crecimiento del estafilococo dorado en presencia de Metecilina puede ser aumentado si el organismo se protege de la lisis incrementando la concentración de electrolitos. Un incremento en la concentración de ClNa no afecta la sensibilidad a la Metecilina de cepas sensibles a ella. tinciones de Gram de colonias que crecen en estos medios muestran que los cocos permanecen anormales. (1)

Ecología y Epidemiología — El estafilococo aureus forma parte de la *microbiota* del hombre, sin embargo las enfermedades causadas por él y de carácter grave, son raras. La colonización comienza en la infancia; de la primera semana a los diez días un 90 o/o de recién nacidos son portadores nasales del microorganismo. El grado de portador es de un 20 o/o durante los dos primeros años de vida. De los 4 a 6 años se aproxima al porcentaje del adulto que es de un 30 a 50 o/o. El organismo se encuentra más comúnmente en las coanas, a veces también en la piel. Puede ser cultivado del aliento de personas sanas y los portadores intestinales son calculados en un 20 a 30 o/o.

Algunas personas son portadores intermitentes.

La adquisición y la calidad de portador del estafilococo aureus en adultos es una situación compleja. Es sabido que unas personas son siempre portadoras y otras no lo son nunca. Aproximadamente el 20 a 30 o/o de pacientes hospitalarios se vuelven portadores de la cepa prevalente en el hospital. La incidencia de colonización aumenta con la estancia hospitalaria. La adquisición de tales cepas aumenta en pacientes tratados con antibióticos a los cuales el germen es resistente.

Ataques de enfermedades causadas por estafilococo aureus

ocurren en salas de adultos de medicina y cirugía, así como en salas de recién nacidos. Las personas más susceptibles son aquéllas que han sufrido procedimientos de cirugía mayor y las que tienen afecciones sobreagregadas, incluyendo neoplasias, diabetes mellitus, agammaglobulinemia, anemia aplástica, agranulocitosis o influenza. (18)

El hallazgo de personas asintomáticas con cepas epidémicas de estafilococo dorado origina el "portador peligroso". Sin embargo, la enfermedad no es exclusivamente causada por estos microorganismos y muchos humanos portan cepas epidémicas sin aparente perjuicio para ellos o sus allegados. Debemos estar alertas a la existencia de cepas con "virulencia epidemiológica" por la posibilidad de brotes de enfermedades severas.

En vista del grado extremadamente alto de portadores humanos es claro que el reservorio principal es el hombre, pero algunos animales domésticos, incluyendo perros, pueden ser portadores asintomáticos de cepas asociadas con enfermedades humanas. En adición, las cepas implicadas en enfermedades de animales, como las que producen la mastitis bovina, pueden también producir enfermedad en el hombre.

Control — No existe un medio práctico para erradicar el estafilococo dorado de su amplia y usualmente benigna asociación con el hombre. Los esfuerzos deben ser dirigidos hacia la prevención y el control de enfermedades en hospitales donde los contactos ocurren entre personas susceptibles y donde se localizan las cepas más virulentas. Todas las autoridades hospitalarias creen tener un problema estafilocócico propio y olvidan que la adquisición y diseminación del estafilococo dorado se previene con la delineación de ciertas reglas básicas. Unos principios generales son de importancia: las personas con lesiones estafilocócicas diseminan gran número de estos organismos y deben ser aisladas de adultos susceptibles o recién nacidos; similarmente, el personal hospitalario con lesiones abiertas debe ser suspendido de sus actividades en ese centro. Los individuos altamente susceptibles deben ser protegidos de otros pacientes y de los portadores. De especial interés es el hecho de usar

antibióticos indiscriminadamente, lo cual da lugar a cepas resistentes y a que prevalezcan tales cepas en una institución. Finalmente todo procedimiento quirúrgico debe ser llevado a cabo con asepsia estricta.

La cuestión de los portadores asintomáticos de una cepa epidemiológica es difícil, pero en situaciones específicas, tales como una epidemia, deben ser aislados y no permitir su regreso a las salas hasta que el estado de portador termine o se modifique. En recién nacidos se ha evitado la contaminación lavándolos con germicida. También se ha colocado una cepa penicilino sensitiva en las fosas nasales o en el cordón umbilical al nacer (cepa 502 A), ya que la colonización con ella no provoca afección y previene la enfermedad.

La intoxicación alimenticia provocada por el germen puede prevenirse evitando que personas con lesiones abiertas participen en la elaboración de alimentos y conservando en el refrigerador principalmente los que tienen leche o sus derivados.

Inmunidad en el hombre — Muchos individuos normales poseen anticuerpos a una variedad de componentes y productos del estafilococo dorado, incluyendo alfa toxina, coagulasa, leucocidina humana, hialuronidasa y estafiloquinasa. Algunos de estos anticuerpos cruzan la barrera placentaria; los títulos de éstos, en el infante, declinan durante los primeros meses de vida y luego aumentan durante los siguientes años, probablemente por estímulos antigénicos derivados de portadores de estafilococcus aureus o de lesiones menores. No se ha descubierto correlación entre el título de un anticuerpo particular y la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad; esto explicaría la falla de las vacunas.

Se sabe que no ocurre un aumento en el título de anticuerpos en una persona crónicamente enferma que sea atacada por el germen. (26) A despecho de esto, aún existe interés en desarrollar una mayor resistencia al germen con inmunización activa, particularmente en pacientes con furunculosis recurrente, sin resultados uniformes.

ENFOQUE DEL PROBLEMA ESTAFILOCCICO

El aumento en la resistencia del estafilococo aureus en los hospitales es bien conocida. Uno de los primeros en llamar la atención a este problema fue Barber, quien describió un aumento en la incidencia de estafilococos penicilino resistentes de 14.1 en 1946 a 38 o/o en 1947 y a 59 o/o en 1948 (1, 2) En 1955, 5 o/o de estafilococos aureus eran resistentes a la penicilina, el 3 o/o al cloramfenicol, el 30 o/o a estreptomycin y el 26 o/o a tetraciclina, drogas que hoy en día no son primariamente antiestafilocóccicas. (8)

En 1958 por primera vez se presentaron infecciones causadas por estafilococos, que sólo pudieron ser tratadas con antibióticos tóxicos, como neomicina y vancomicina; ya para entonces el 62 o/o de ellos eran resistentes a la penicilina, 20 o/o a penicilina, estreptomycin y tetraciclina y el 18 o/o a penicilina, estreptomycin y eritromicina; algunas de estas cepas con resistencia múltiple también lo eran al cloramfenicol y noboviocina. (14) Esto llevó a que se ejecutase una observación del desarrollo de resistencia de este germen a diversos antibióticos, incluyendo la Meticilina, en varios países europeos. (13) Se demostró que había un alza en el aislamiento de cepas resistentes a la Meticilina.

En 1961, cuando este antibiótico y otras penicilinas resistentes a la penicilinas fueron usados más ampliamente, se notó por vez primera la aparición de cepas resistentes. A esto se agrega el hecho de que muchos reportes de Europa y esporádicos de EE.UU indicaban un número creciente de estafilococos que habían desarrollado resistencia a la Meticilina, lo que se desprende de los siguientes hechos:

En Inglaterra, donde se lleva un control epidemiológico estricto, se encontró un aumento en la proporción de cepas de estafilococos aureus aisladas de hospitales, que eran resistentes a la Meticilina.

Borowsky y colaboradores en 1964, reportaron que más del 50 o/o de madres e infantes en un hospital de Polonia fueron infectados por un estafilococo dorado resistente a la

Meticilina.

En 1966, el 10 o/o de todas las bacteremias en Dinamarca fueron causadas por cepas de estafilococo meticilino-resistentes. Chaubert y colaboradores reportaron fracasos en el tratamiento de 16 de 29 pacientes con bacteremia producida por estafilococo dorado resistente a la Meticilina.

Otros reportes similares han sido publicados en Escandinavia, París y Suiza.

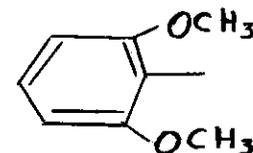
El riesgo terapéutico implícito en estas observaciones se comprende cuando consideramos que:

- 1) Los estafilococos resistentes a múltiples antibióticos son a menudo virulentos.
- 2) La resistencia de los estafilococos a múltiples antibióticos puede ser transferida por bacteriófagos.
- 3) Muchos de los pacientes hospitalizados, quienes parecen ser más susceptibles de adquirir infecciones con estos organismos son individuos con defensas comprometidas. (1)
- 4) El tratamiento de estos estafilococos requiere el uso de antibióticos como Cefalotina, Lincomicina o Vancomicina, drogas todas de uso antieconómico en nuestro medio o de difícil obtención.

No sabiendo si en Guatemala existen cepas de este tipo se efectuó la presente investigación.

METICILINA

Es una penicilina semisintética que fue descrita primero por Rolinson y asociados (1960). Se prepara a partir del ácido 6-amino penicilánico y su fórmula es la siguiente:



Es resistente a la penicilinasas y aún induce la producción de esta enzima. Su indicación son infecciones causadas por cepas de estafilococo aureus productores de penicilinasas.

Se ha demostrado que es bactericida para casi todas las cepas de estafilococos aureus y las que producen penicilinasas son de 15 a 80 o/o más susceptibles a la droga que las que no la producen. Es inefectiva contra bacterias Gram negativas y menos efectiva que la penicilina G contra los Gram positivos. No se administra por vía oral debido a su pobre absorción en el intestino y a su rápida destrucción por el jugo gástrico, sin embargo, cambios en su fórmula por adición de radicales favorecen su absorción por esta vía produciendo niveles sanguíneos adecuados.

Cuando se administra por vía intramuscular su mayor concentración en sangre se alcanza en 30 minutos a una hora. En dosis de 1 gm. se observan niveles sanguíneos que exceden los 10 microgramos por mililitro; a dosis de 2 gramos la concentración en sangre es de 20 microgramos/ml y un nivel de aproximadamente 8 microgramos/ml está presente aún después de 4 horas.

No penetra el espacio subaracnoideo con meninges sanas.

Se excreta por la orina; cerca de dos tercios de una dosis intramuscular se eliminan por esta ruta en 4 horas. Persiste por largos períodos y a una concentración alta en casos de falla renal; el *probenecid* eleva y prolonga las concentraciones de

Meticilina en el torrente sanguíneo.

Debido a su escasa actividad en relación a su peso y a su rápida excreción renal es necesario administrar inyecciones frecuentes a dosis relativamente elevadas.

Cierta proporción de la droga se excreta por la bilis. La absorción desde los depósitos intramusculares puede ser irregular en pacientes muy graves, en los que tienen enfermedades vasculares y los que sufren de diabetes mellitus. En consecuencia, en muchos casos severos se prefiere la vía intravenosa directa.

Por su extrema inestabilidad en un pH ácido se debe administrar por vía parenteral y no debe disolverse hasta inmediatamente antes del uso.

Para conseguir picos de concentración sérica que excedan la sensibilidad in vitro del estafilococo por un factor de 2 a 4 es necesaria la administración IM. de 1.0 a 1 o/o gms; deben repetirse las inyecciones cada 4 horas. La administración intravenosa de 1.0 gms. de meticilina produce concentraciones todavía más altas, pero éstas se mantienen sólo por una hora. No se produce acumulación después de ninguna de las dos formas de administración, ni tampoco al dar 2 gramos de meticilina por dosis.

Por ser una penicilina (semisintética) puede causar fenómenos de hipersensibilidad cutánea o visceral; en tratamientos prolongados puede causar daño renal que se sospecha cuando pacientes tratados con esta droga acumulan productos nitrogenados o presentan leucocituria.

La incidencia de fenómenos adversos, principalmente reacciones alérgicas es del 3 o/o.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo de investigación fue llevado a cabo en un período de seis meses en el laboratorio bacteriológico del Hospital General "San Juan de Dios", contando para ello con las facilidades del mismo y los siguientes materiales:

- a) Cajas de Petri plásticas, descartables de 5 x 100 mm.
- b) Medio Agar Sangre para la siembra inicial de los estafilococos y aislamiento.
- c) Tubos de hemólisis en los que se determinó con la técnica usual de incubación a 37°C con lecturas a las 3, 5 y 24 horas, su capacidad de producir coagulasa.
- d) Discos de 5 microgramos de Meticilina obtenidos comercialmente (BBL: Baltimore Biological Laboratories).
- e) Medio Trypticusa con Soya, para favorecer el crecimiento del estafilococo dorado y obtener una concentración dada del mismo en determinadas horas de incubación a 37°C.
- f) Medio Agar con Cloruro de Sodio al 5 o/o.
- g) Varios: hisopos estériles, asas de platino, estufa, etc.

Todas las cepas de estafilococo dorado, en cantidad de 228, fueron aisladas en los Hospitales General "San Juan de Dios", Roosevelt y Militar. De cada hospital se obtuvo:

Hospital General:	151 cepas
Hospital Roosevelt:	50 cepas
Hospital Militar:	27 cepas

Los estafilococos aislados provenían de infecciones humanas y localización diversa, tales como piel, nasofaringe, torrente sanguíneo, abscesos, etc. Para ello se usaron cepas obtenidas en los laboratorios bacteriológicos de los tres hospitales mencionados; además, se efectuaron cultivos de

garganta y nariz de parte del personal médico, paramédico y pacientes de diferentes salas del Hospital General, para hacer la muestra lo más heterogénea y representativa posible.

Las cepas fueron tomadas de su siembra original y resembradas en cajas de Petri con agar sangre para confirmar que eran de estafilococo por sus características de crecimiento y tinción de Gram; luego de 24 horas de incubación a 37°C se observó la colonia típica blanco amarillenta de 1 a 3 mm. de diámetro.

Se tomó una colonia de cada muestra y se determinó su capacidad de producir coagulasa, poniendo 0,5 ml de suero fisiológico en el que se colocó la colonia y se le añadió 0,5 ml de plasma incubando a 37°C y haciendo lecturas a las 3, 5 y 24 horas. Teniendo la certeza de poseer estafilococos aureus, se sembró con asa en tubos de hemólisis que contenía 2 ml de medio tripticasa Soya y se incubaron a 37°C por un período de 5 horas, con lo que se obtuvo una concentración de 5×10^4 bacterias por mililitro.

Después de ese período, con hisopos estériles que se sumergieron en el medio, se tomó una muestra abundante; ésta fue extendida en la superficie de las cajas de Petri que contenía una cantidad uniformemente distribuidas de medio agar-agar con cloruro sódico al 4 o/o (aproximadamente 5 ml. del medio). Con ello se favorecía el crecimiento del estafilococo, pues es sabido que a esta concentración se impide la lisis del microorganismo.

Se diseminó el material de manera uniforme sobre la superficie en todo sentido para que el crecimiento no fuese mayor en una parte dada del medio, colocando posteriormente el disco de 5 microgramos de Meticilina.

Se consideraría resistente a todo estafilococo dorado sembrado con la técnica indicada, cuyo crecimiento llegase al borde del disco de Meticilina después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente; el objeto de incubar por 48 horas fue para dar lugar a que creciesen cepas resistentes, ya que investigaciones hechas en otros hospitales demostraron

que éstas podían no aparecer antes de 24 horas o bien, ser invisibles al ojo humano.

Es de hacer notar que en gran número de laboratorios y en los trabajos de sensibilidad que contienen 10 microgramos del metilina, lo cual, en mi opinión, da margen para que cepas resistentes pasen inadvertidas.

Las zonas de inhibición alrededor del disco fueron medidas, tomando para ello el diámetro mayor que pasase por el centro del disco. Tales zonas fueron medidas dos veces en días diferentes.

R E S U L T A D O S

Todas las doscientas veinte y ocho cepas de estafilococos dorados estudiadas en relación a su sensibilidad a la metilina, produjeron diversas zonas de inhibición, las cuales, variaron entre 5 y 50 mm. de diámetro.

El porcentaje de cepas con su respectiva zona de inhibición se expresan en la gráfica adjunta.

Ninguna cepa de estafilococo dorado creció hasta el borde del disco de Meticilina, excepto en raros casos en los que cultivados de nuevo y vistos con tinción de Gram, se encontró que existían gérmenes contaminantes principalmente Gram negativos; estos cultivos fueron descartados como parte del trabajo de investigación.

Dentro de la zona de inhibición se hallaron en seis siembras, colonias de tamaño pequeño blanco amarillentas, las cuales fueron resembradas, mostrando al seguir la técnica descrita, zonas de inhibición que variaron de 45 a 50 mm de diámetro. Estas colonias volvieron a su forma original al ser sembradas de nuevo y tuvieron una sensibilidad mayor a la Meticilina que la cepa original.

Las formas hinchadas descritas en otros trabajos del extranjero sobre el mismo tema, no se observaron en la investigación que se hizo en Guatemala.

Ninguna cepa, como se deriva de lo anteriormente expuesto, fue resistente a la Meticilina en nuestro medio.

Un eslabón muy importante de este trabajo se consideró sería sembrar las cepas resistentes que se encontraran, en medio líquido de agar nutritivo conteniendo 12,5 microgramos de Meticilina, que si mostraban enturbamiento después de 24 horas de incubación a 37°C está considerado como el patrón de resistencia del germen.

Zona de Inhibición	Número de cepas	Porcentaje
5	6	2.6
10	14	6.1
12	10	4.4
13	3	1.0
14	12	5.2
15	4	1.7
16	3	1.0
18	8	3.5
20	17	7.4
21	10	4.4
22	20	8.7
23	10	4.4
25	19	8.3
26	15	6.5
27	10	4.4
28	17	7.4
29	4	1.4
30	15	6.5
31	5	2.1
35	6	2.6
36	6	2.6
40	7	3.0
45	4	1.4
50	3	1

DISCUSION

Los resultados de la presente investigación concuerdan con el patrón de sensibilidad del Estafilococo dorado, que es sensible a la acción de la Meticilina casi en un 100 o/o.

Sabido es que la resistencia a esta droga está estrechamente relacionada con la virulencia del germen, pues a mayor resistencia más virulento es el estafilococo aureus. Sin embargo a esto hay que añadir que la aparición de cepas resistentes a la Meticilina en Europa y su amplia diseminación, plantean un problema que pronto puede ser el nuestro. Esto es muy hipotético pues trabajos recientes no muestran aún grandes diferencias en relación a porcentajes.

Estas cepas son resistentes a todas las penicilinas y también a las cefalosporinas; además, son capaces de producir enfermedades mortales. En E.E.U.U. han sido reportadas cepas del germen resistentes a la Meticilina causantes de enfermedades graves (19), pero en ese país no hay trabajos en los cuales se indique que usen técnicas especiales, excepto uno, (6) el cual fue adaptado a nuestra investigación. El valor de este trabajo estriba en que se investigó la sensibilidad del estafilococo dorado a la Meticilina en Guatemala y además se usó una técnica especial que permitía determinar con mayor exactitud tal hecho, por las siguientes razones:

- a) El uso de agar que contenía cloruro de sodio permitía que los microorganismos crecieran en forma florida, pues a esta concentración se impide su lisis. (9)
- b) El empleo de discos de 5 microgramos de Meticilina también favorecía el que se descubrieren cepas resistentes, agregando a esto de que eran discos comerciales y no de los que se proporcionan en forma gratuita para los laboratorios, ya que se tiene conocimiento de que casas productoras de medicamentos, las cuales son de dudosa reputación, colocan una mayor concentración del producto para asegurar su éxito y poder introducirlo con más facilidad en el comercio.

- c) El uso de un inóculo grande también ayudaba a que el estafilococo se desarrollase más ampliamente dando lugar a que la minoría de estafilococos resistentes pudiese crecer mejor pues se cree, aunque datos completos faltan, que la aparición de resistencia en estos gérmenes probablemente resulta de la selección de estafilococos meticilino-resistentes dentro de una población heterogénea. Esto es difícil de sostener, pues en lugares donde la Meticilina no se ha usado, han tenido infecciones causadas por estos gérmenes.

En el presente estudio 228 cepas fueron investigadas con esta técnica especial y no hubo una sola que creciera hasta el borde del disco de Meticilina para determinar su resistencia a tal antibiótico, de lo cual podemos inferir que Guatemala es un área libre de estas cepas resistentes, en la actualidad.

CONCLUSIONES

- 1) El estafilococo dorado es una bacteria capaz de producir enfermedades mortales, a pesar de que forma parte de la microbiota del hombre.
- 2) Las cepas hospitalarias de estafilococos dorados son más virulentas que las que se aíslan fuera de ellos.
- 3) Todas las cepas investigadas mostraron patrones de sensibilidad uniforme.
- 4) No se encontró ninguna resistencia a la Meticilina.
- 5) Los gérmenes meticilino-resistentes son más virulentos que los que no lo son.
- 6) La zona de inhibición más pequeña fue de 5 mm. y la más grande fue de 50 mm. La zona promedio fue de 23 mm.

- 7) Las cepas aisladas provenían de personas sanas y con enfermedad causada por estafilococo dorado, sin embargo, ninguna colonia de tales microorganismos fue meticilino-resistente.
- 8) La Meticilina es uno de los antibióticos más efectivos actualmente y de más bajo costo para combatir el estafilococo dorado.
- 9) El mejor método por el momento para detectar resistencia a la Meticilina por dicho organismo es el uso de agar con cloruro de sodio al 5 o/o e incubación por 48 horas a temperatura ambiente, lo cual es aplicable a nuestros laboratorios.
- 10) Puede decirse que actualmente no existen estafilococos aureus resistentes a la Meticilina o que su incidencia en el País es baja.

RECOMENDACIONES

- 1) Un estudio continuado de este tipo sería de utilidad en el futuro para determinar la aparición de cepas resistentes.
- 2) Se deben aumentar las facilidades con que cuenten los laboratorios para efectuar tales estudios.
- 3) Debemos ser precavidos en el uso indiscriminado de antibióticos.
- 4) El control epidemiológico hospitalario, tanto de pacientes como de personal médico y paramédico es de vital importancia para prevenir catástrofes en el futuro, como el brote de una epidemia.
- 5) Se debe llevar un control de calidad de los medicamentos empleados para combinar las infecciones causadas por el estafilococo dorado.

- 6) Promover un intercambio de experiencias a través de organismos internacionales sobre este tipo de investigaciones.
- 7) Motivar este tipo de estudios en países en que no se han efectuado para conocer los alcances reales del problema.

BIBLIOGRAFIA

1. Barber M. Nethicillin-resistan staphylococci. M. J. Path. Bact, 59: 375-393, 1964.
2. Barber, M. Naturally occurring methicilin-resistant staphylococci. J. Gen. Microbiol. 35: 185-190, 1964.
3. Barret, F.F., R.F. Mc Gehee, Jr. and M. Finland. Methicillin resistant Staphylococcus aureus at Boston City Hospital. N. Engl. J. Med. 279: 442-448, 1968.
4. Batchelor, F.R., et al. Studies on penicilinase produce a strain of Staphylococcus aureus, Proc. Roy. Soc., Sec. B. 158: 311-328, 1963.
5. Bondi, A. Kornblum, J. and de St. Phalle, M. The aminoacid requeriments of penicillin resistant and penicillin sensitive strain of Micrococcus pyogenes, J. Bact. 68: 617-621, 1955.
6. Bran, J.L., Levison, M.E., and Kaye, D. Survey for methicillin resistant staphylococci. Antimicrob. A.G. Chemother. 1 (3): 235-236, March 1972.
7. Breed, R.S. Murray, E.G.D., and Smith, N.R. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ed 7, Baltimore, Williams & Williams, p 1529, 1957.
8. Bulger, R.J. A methicillin resistant strain of Staphylococcus aureus. Am. Int. Med. 67: 81-79, 1967.
9. Churcher, G.M.A screening test for detection of methicillin resistant staphylococci. J. Clin. Pathol. 21: 213-217, 1968.
10. Davidson, F.M. The activation of plasminogen by staphylokinase: comparison with streptokinase, Biochem. 76: 56-61, 1960.

11. Drill, V.A. *Farmacología Médica. Traducida por Gaudencio Alcántara et al. México La Prensa Médica Mexicana, 1971. pp. 1455-1457.*
12. Goodman, L.S. and Gilman, A. *The pharmacological basis of therapeutics, 4th ed. N.Y., McMillan, 1971. pp:1219-1221.*
13. Hewitt, J.H., A.W. Cox, and M.T. Parker. *The detection of methicillin resistant in Staphylococcus aureus. J. Med. Microbiol. 2: 443-455, 1969.*
14. Kirby, W.M. and Bulger, R.J., *The new penicilins and cephalosporins, Ann. Rev. Med. 15: 393-412, 1964*
15. Knight, V., and Hulger, A.R. *Studies on Staphylococci from hospital patients: I. Predominance of strains of Group III phage patterns which are resistant to multiple antibiotics. J. Clin. Invest. 33: 1190-1199, 1954.*
16. Lack, C.H., and Towers, A.G., *Serological test for Staphylococcal infection. Brit. J. 2: 1227-1229, 1962.*
17. Marcus, J.A., and Washington, II, J.A. *Pitfalls in identification of methicillin-resistan Staphylococcus aureus. App. Microbiol. 18: 699-670, 1969.*
18. Nahmias, A.J. and Eickhoff, T.C. *Staphylococcalinfections in hospitals: Recent developments in epidemiologic and laboratory investigation, New. Eng. Med. 265: 74-81, 120-128, 177-182, 1961.*
19. O'Toole R.D.L. et al. *An outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. J. Amer. Ass. 213 257-263. 1970.*
20. Rogers, H.S. *The rate of formation of hyaluronidase, coagulase and total extracellular protein by strain of Staphylococcus aureus, J. Microbiol. 10: 209-220, 1954.*

21. Sabin, B. and Stahly, G.L. *The isolation and absorption spectrum maximum of bacterial carotenoid pigments, J. Bact. 44: 265-276, 1942.*
22. Thal, A. P. and Egner, W. *The site of action of the Staphylococcus alpha toxin, J. Exp. Med. 113: 67-81, 1962.*
23. Wise, R. I. *Small colonies (G variants) of staphylococci isolation from cultures and infections, Ann. N.Y. Acad. Sci. 65: 169-174, 1958.*

Vo. Bo.

RUTH R. DE AMAYA
Bibliotecaria

Br. José Luis González Morán

Dr. José Luis Bran Cabrera
Asesor

Dr. Federico Sánchez
Revisor

Dr. José A. Quiñónez Amado
Director de Fase III

Dr. Carlos A. Bernhard
Secretario

Vo.Bo.

Dr. César A. Vargas M.
Decano