

## Genotipos de resistencia antimicrobiana y su expresión fenotípica en cepas de *Staphylococcus aureus*

### *Genotypes for Antimicrobial Resistance and their Phenotypic Expression in Staphylococcus aureus Strains*

Castellano González, Maribel<sup>1</sup>;  
Perozo Mena, Armindo<sup>2,3</sup>; Parra, Ana María<sup>3</sup>; Ginestre  
Pérez, Messaria<sup>1</sup> y Rincón Villalobos, Gresleida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Bacteriología General,

<sup>2</sup>Cátedra de Práctica Profesional de Bacteriología,

Escuela de Bioanálisis, Universidad del Zulia. maribeljo@cantv.net.

<sup>3</sup>Centro de Referencia Bacteriológica SAHUM. Maracaibo-Venezuela.

#### Resumen

Se determinó la resistencia antimicrobiana mediante métodos fenotípicos y genotípicos a 106 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes atendidos en el Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo durante el primer trimestre del 2009. El cultivo, aislamiento e identificación se realizó siguiendo la metodología convencional. Fenotípicamente, 103 cepas (97,17%) resultaron resistentes a penicilina G; 54 (50,94%) a meticilina; 43,39% a eritromicina (46) y 34,91% (37) a gentamicina. Además, 13 (12,26%) se mostraron intermedias a eritromicina. Genotípicamente, 90 cepas (84,91%) portaban el gen *blaZ* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); 53 (50%) acarreaban el gen *mecA*; sólo 10 (9,43%) albergaban el gen *aac(6')/aph(2'')*; el gen *ermA* se detectó en 41 aislados (38,68%) y *msrA* en 17 (16,04%). Los resultados discordantes fueron: (1) Una cepa *mecA*-negativa; pero resistente a meticilina, la cual resultó *blaZ*-positiva e hiperproductora de  $\beta$ -lactamasas; (2) Una cepa resistente a eritromicina y negativa para los genes *ermA*, *B*, *C* y *msr* y; (3) veintiséis cepas gentamicina-resistentes; pero negativas para *aac(6')/aph(2'')*. Los fenotipos y genotipos de resistencia antimicrobiana están relacionados; sin embargo, existe una marcada variabilidad en los determinantes genéticos de la resistencia lo que repercute, indudablemente en su expresión fenotípica. Para oxacilina y en menor proporción para eritromicina, existe una buena concordancia entre los fenotipos y genotipos de resistencia encontrados; observándose la mayor discrepancia en los aminoglicósidos, y penicilina G.

**Palabras clave:** *S. aureus*, resistencia, fenotipos, genotipos.

Recibido: 04-04-12 / Aceptado: 25-10-12

## Abstract

Antimicrobial resistance was determined for 106 *S. aureus* strain isolates from patients treated in the Bacteriological Reference Center at the University Hospital Autonomous Service, Maracaibo, during the first trimester of 2009, using phenotypic and genotypic methods. Culture, isolation and identification were performed following conventional methodology. Phenotypically, 103 strains (97.17%) were resistant to penicillin G; 54 (50.94%) to methicillin; 43.39% to erythromycin (46) and 34.91% (37) to gentamicin. In addition, 13 (12.26%) were intermediate to erythromycin. Genotypically, 90 strains (84.91%) carried the *blaZ* gene through the polymerase chain reaction (PCR); 53 (50%) carried the *mecA* gene; only 10 (9.43%) harbored the gene *aac(6')/aph(2'')*; the gene *ermA* was detected in 41 isolates (38.68%) and *msrA* in 17 (16.04%). The discordant results were: (1) A *mecA*-negative, but methicillin-resistant strain, which proved *blaZ*-positive and hyper-productive of  $\beta$ -lactamases; (2) An erythromycin-resistant strain, negative for *ermA*, *B*, *C* and *msrA* genes, and; (3) Twenty-six gentamicin-resistant strains, negative for *aac(6')/aph(2'')*. The phenotypes and genotypes of antimicrobial resistance are related; however, there is a marked variability in the genetic determinants for resistance, which undoubtedly affects phenotypic expression. For oxacillin and, to a lesser degree erythromycin, there is a good match between the resistance phenotypes and genotypes found, noting the greatest discrepancy in the aminoglycosides and penicillin G.

**Keywords:** *S. aureus*, resistencia, fenotipos, genotipos.

## Introducción

*Staphylococcus aureus* en su variedad resistente a meticilina (SAMR) se encuentra entre los principales patógenos productores de infecciones nosocomiales (1). La resistencia a meticilina en estafilococos se debe a la excesiva producción de PBP2a, una proteína de unión a penicilina (PBP) que posee una baja afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Puesto que el gen *mecA* que codifica para la PBP2a, presenta un alto nivel de homología en las cepas SAMR y en las cepas de estafilococos coagulasa negativa resistentes a meticilina, se ha descrito al gen *mecA* como un marcador molecular adecuado en la determinación de resistencia a meticilina en todos los estafilococos (2); la cual está asociada con la resistencia a otros antibióticos, tales como: tetraciclinas, quinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol, aminoglicósidos y macrólidos (3).

El principal mecanismo de resistencia a aminoglicósidos es la inactivación del anti-

biótico mediada por las enzimas modificadoras de aminoglicósidos (EMAs): (acetil (AAC), fosforil (APH) y nucleotidil-transferasas (ANT) codificadas en plásmidos o transposones. Los aminoglicósidos modificados enzimáticamente, ya sea en sus grupos amino o en los grupos hidroxilo, pierden su capacidad de unirse al ribosoma bacteriano y no son capaces de inhibir la síntesis proteica (4). La enzima bifuncional AAC(6')/APH(2'') es la más frecuente en estafilococos, seguida de APH(3')-IIIa y ANT(4')-I (5-7).

Por su parte, la resistencia a macrólidos puede ser debida a varios mecanismos y, entre ellos los dos más importantes son: la expulsión activa (mediada por los genes *msrA*) y la metilación del ribosoma (codificada por los genes *erm*) (8, 9). El mecanismo de eflujo ocasiona resistencia a los macrólidos de 14 átomos (eritromicina, claritromicina y roxitromicina) y 15 átomos (azitromicina), así como a las estreptograminas B; pero no a lincosamidas (clindamicina y lincomicina) (fe-

notipo MS<sub>B</sub>). La metilación ribosomal confiere resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (fenotipo MLS<sub>B</sub>). En estafilococos, los genes *ermA*, *ermB* y *ermC* son responsables por este fenotipo de resistencia cruzada, controlando la metilación del sitio de enlace de adenosina 2058 (A2058) del ARNr 23S (9-11).

SAMR es una de las principales causas de infecciones nosocomiales, las cuales se están volviendo cada vez más difíciles de combatir debido a su resistencia emergente a todas las clases de antibióticos disponibles en la actualidad, por lo que, investigar la propagación de los genes de resistencia antimicrobiana en cepas SAMR es importante para el control de su diseminación (12). En consecuencia, el propósito de este estudio fue determinar, por métodos moleculares, los genotipos de resistencia a penicilina, meticilina, eritromicina y gentamicina y su correspondiente expresión fenotípica en cepas de *S. aureus*.

## Materiales y métodos

### Cepas bacterianas

Se estudiaron 106 cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes muestras clínicas provenientes de pacientes atendidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario de la ciudad de Maracaibo (Venezuela), durante el primer trimestre del año 2009. Aislamientos duplicados de un mismo paciente fueron excluidos del estudio. El cultivo, aislamiento e identificación bacteriana se efectuó acorde a la metodología convencional (13).

### Determinación de los fenotipos de resistencia antimicrobiana

La resistencia a penicilina, oxacilina, gentamicina, eritromicina y clindamicina fue detectada fenotípicamente mediante el mé-

todo de difusión con disco en agar, siguiendo las directrices del Instituto para la Estandarización de Laboratorios Clínicos (CLSI) (14). A este fin se preparó con cada una de las cepas de *S. aureus* a estudiar, una suspensión bacteriana espectrofotométricamente estandarizada con el patrón 0,5 de MacFarland (625nm; D.O 0,8-1,0). Esta fue utilizada para inocular placas de agar Müeller Hinton (MH, HiMedia<sup>®</sup>) sobre las cuales se procedió a colocar los discos de antibióticos OXOID<sup>®</sup>: (PG) penicilina G, (OX) oxacilina, (FOX) cefoxitin, (E) eritromicina, (CC) clindamicina y (GM) gentamicina. Las placas fueron incubadas 24 horas a 35°C en aerobiosis. Posteriormente, se procedió a la lectura, midiendo los diámetros de los halos de inhibición y se interpretaron de acuerdo a los criterios del CLSI (14) como: sensibles, intermedios o resistentes. Para la determinación de los fenotipos de resistencia, las cepas intermedias fueron consideradas como resistentes.

### Determinación de la producción de β-lactamasas

A las cepas de *S. aureus* que resultaron resistentes a PG por el método del disco, se les investigó también, la producción de β-lactamasas, mediante el método de la cefalosporina cromogénica (nitrocefina), utilizando el β-lactamase touch-stick<sup>®</sup> (OXOID), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una reacción positiva se evidenció por la aparición de un color rojo en el extremo de la barra impregnada en nitrocefina. Cuando los organismos no producían β-lactamasa, no se observó cambio de color.

### Determinación de la producción de PBP2a

La detección de PBP2a como producto del gen *mecA* fue realizada utilizando el

PBP2a Test Kit® (OXOID). Este método se basa en la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales contra la proteína PBP2a. La prueba se consideró como positiva al observarse aglutinación en 3 minutos con el reactivo látex y no con el control negativo.

### Detección genética de los determinantes de resistencia mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple

La extracción de ADN de colonias de *S. aureus* se llevó a cabo utilizando un procedimiento de lisis enzimática. A partir de un cultivo puro de 24 horas, se tomaron mínimo 10 colonias, se transfirieron a un tubo con 400µL de buffer de lisis (buffer TE) (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA, pH 8,0; 25ng/µL de lisostafina, (Promega®) y se incubaron a 37°C por 1 hora. Se agregaron 40µL de SDS (dodecil-sulfato de sodio) al 1%

y 10µL de proteinasa K (Promega®) a una concentración de 250ng/µL y se incubó a 50°C por 1 hora. Se realizó una extracción con fenol-cloroformo 1:1 (agregando 400µL de la mezcla). Se mezcló en vortex. Se centrifugó a 14.000 rpm por 20 minutos. El ADN contenido en la fase acuosa fue precipitado con 1ml de etanol absoluto (100%) y se guardó a -20°C (toda la noche). Se centrifugó a 14.000rpm por 10 minutos. Se procedió a descartar el sobrenadante y agregar 400µL de etanol 70% y se descartó el sobrenadante por inversión. Se dejó secar durante 30 minutos y se resuspendió el sedimento en 100µL de buffer TE 10mM (3, 15).

Para la PCR se seleccionaron primers correspondientes a los genes de resistencia: *blaZ* (determinante de resistencia a penicilina), *mecA* (resistencia a oxacilina), *aac(6')/aph(2'')* (resistencia a gentamicina) y *ermA*, *ermB*, *ermC* y *msrA*. (resistencia a eritromicina) (Tabla 1). Las mezclas para PCR múltiple se prepararon tomando en consideración

**Tabla 1.** Genes de resistencia y primers específicos utilizados en este estudio.

Gen Blanco	Secuencia del Primer
<i>blaZ</i>	5'-ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC-3' 5'-TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC-3'
<i>ermA</i>	5'-TAT CTT ATC GTT GAG AAG GGA TT-3' 5'-CTA CAC TTG GCT TAG GAT GAA A-3'
<i>ermB</i>	5'-CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATT-3' 5'-GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA-3'
<i>ermC</i>	5'-CTT GTT GAT CAC GAT AAT TTC C-3' 5'-ATC TTT TAG CAA ACC CGT ATT C-3'
<i>mecA</i>	5'-AAC AGG TGA ATT ATT AGC ACT TGT AAG-3' 5'-ATT GCT GTT AAT ATT TTT TGA GTT GAA-3'
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	5'-TTG GGA AGA TGA AGT TTT TAG A-3' 5'-CCT TTA CTC CAA TAA TTT GGC T-3'
<i>S. aureus</i>	5'-AAT CTT TGT CGGTAC ACG ATA TTC TTC ACG-3' 5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3'

Fuente: Martineau F. 2000. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 44(2):231-238.

el tamaño de los amplicones, por lo cual se utilizaron cuatro combinaciones diferentes, incluyendo en todas, el gen de control interno de amplificación para la identificación de *S. aureus* (Tabla 2).

Se tomó una alícuota de 3µL del ADN previamente extraído de *S. aureus*, la cual se transfirió directamente a 20µL de mezcla para PCR conteniendo: 50mM KCl; 10mM Tris-HCl (pH 9,0); 0,1% Tritón X-100; 2,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,4µM de cada uno de los primers, 200µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato y 0,5U de ADN polimerasa *Taq* (Promega®). Las mezclas de PCR fueron sometidas a un ciclo térmico en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc., Watertown, Mass), como se describe a continuación: 5 minutos a 96°C; 35 ciclos de 20 segundos a 95°C; 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. Luego, 5 minutos a 72°C y conservados indefinidamente a 4°C.

Los productos de la amplificación (5µL) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% conteniendo 0,5µg de bromuro de etidio por ml. en buffer Tris-Borato-EDTA (89mM Tris, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA) a 80V/cm por 90 minutos. Los geles se visualizaron bajo luz UV (254nm) y se fotografiaron con una cámara digital. El tamaño de los productos de amplificación del PCR se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de 100bp.

Para el análisis genético de la resistencia, los resultados de la detección del gen *mecA* fueron utilizados como criterio para la clasificación de las cepas como resistentes a β-lactámicos, independientemente de la detección o no del gen *blaZ*.

### Análisis estadístico

Para el registro de la información y la determinación de los porcentajes de susceptibilidad, así como los perfiles de resistencia antimicrobiana se utilizó el programa Whonet™, versión 5,4 (World Health Organization).

Para el análisis estadístico se determinó la asociación entre los fenotipos y genotipos de resistencia mediante el estadístico X<sup>2</sup>. El grado de concordancia entre los resultados obtenidos por ambos métodos (fenotípicos y genotípicos) para la detección de resistencia antimicrobiana fue determinado a través del índice *kappa* de Cohen, que mide la confiabilidad y validez del diagnóstico, utilizando el programa SPSS™, versión 20. Un valor de 0 para *k* indica no concordancia y un valor de 1 indica concordancia perfecta. Un buen método diagnóstico exhibe buena concordancia; los criterios para la interpretación de la fuerza de concordancia del índice *kappa* van de acuerdo con el valor de *k*: < 0,20 pobre; 0,21-0,40 débil; 0,41-0,60 moderada; 0,61-0,80 buena; 0,81-1,00 muy buena.

**Tabla 2.** Ensayo de PCR Múltiple.

Nº Múltiple	PCR: Pares combinados de Primers (tamaño de los amplicones)
1	<i>S. aureus</i> (108bp) + <i>mecA</i> (174 bp) + <i>ermB</i> (142 bp)
2	<i>S. aureus</i> (108bp) + <i>aac(6'')/aph(2'')</i> (174 bp) + <i>ermA</i> (139 bp)
3	<i>S. aureus</i> (108bp) + <i>msrA</i> (163 bp) + <i>ermC</i> (190 bp)
4	<i>S. aureus</i> (108bp) + <i>blaZ</i> (173 bp)

Fuente: Martineau F. 2000. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 44(2):231-238.

## Resultados

Fenotípicamente, por el método del disco, se encontraron 103 cepas (97,17%) resistentes a penicilina; 54 resistentes a oxacilina/cefoxitin (50,94%); 46 resistentes a eritromicina (43,39%) y 37 (34,91%) a gentamicina (Tabla 3).

Treinta y ocho cepas de *S. aureus* (35,85%) aparecieron fenotípicamente resistentes tanto a eritromicina como a clindamicina; 21 mostraron resistencia únicamente a eritromicina (19,81%); 47 (44,34%) resultaron sensibles a los dos antibióticos y ninguna expresó el fenotipo de resistencia a clindamicina y susceptibilidad a eritromicina. Ninguna de las cepas resultó D-test positiva; en consecuencia, todas las cepas resistentes a eritromicina y clindamicina, expresaron el fenotipo de resistencia  $MLS_B$  constitutivo. Las cepas resistentes a eritromicina pero sensibles a clindamicina, correspondieron al fenotipo de eflujo ( $MS_B$ ); mientras que en las restantes 47 cepas, no se detectó ningún determinante de la resistencia a este grupo de antibióticos.

Genéticamente, la presencia de *blaz* se observó en 90 cepas (84,91%) (Figura 1); *mecA* en 53 (50%) (Figura 2); *ermA* en 41 (38,68%) (Figura 3); *msrA* en 17 (16,08%) (Figura 4) y *aac6'/aph2* en 11 (10,37%) (Fi-

gura 3). Ninguna cepa resultó positiva para *ermB* ó *ermC*.

Los perfiles genéticos de resistencia obtenidos mediante la PCR se describen en la Tabla 4; no encontrándose ninguno de los determinantes de resistencia estudiados en 3 cepas (2,84%); 40 (37,74%) portaban sólo uno de los genes investigados; 27 (25,47%) albergaban dos de estos genes; 26 (24,53%) acarreaban tres de los determinantes ensayados y 10 (9,43%) poseían los cuatro determinantes de resistencia probados.

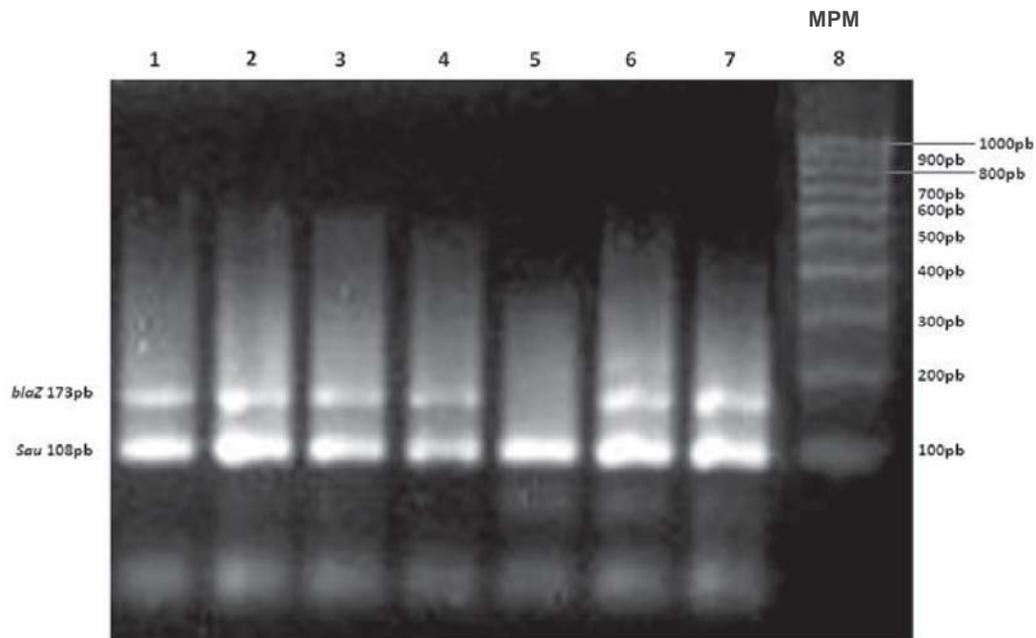
La concordancia entre los fenotipos de resistencia a PG y la presencia del determinante genético de resistencia, *blaZ* aparece en la Tabla 5. Del total de cepas estudiadas, 103 (97,17%) resultaron fenotípicamente resistentes a este antibiótico y 90 (84,91%) portaban el gen *blaZ* por PCR.

La concordancia entre la resistencia a oxacilina y la presencia del gen *mecA* se resume en la Tabla 5. Hubo 54 de 106 (50,94%) cepas de *S. aureus*, que eran resistentes a oxacilina por los métodos fenotípicos; sin embargo, sólo 53 (50%) portaban el gen *mecA*, según los resultados de la PCR y resultaron productores de PBP2a.

La Tabla 5 muestra la concordancia entre la resistencia a eritromicina y la presencia de los genes *ermA*, *ermB*, *ermC* y *msrA*. De las 47 cepas susceptibles (44,34%), ninguna

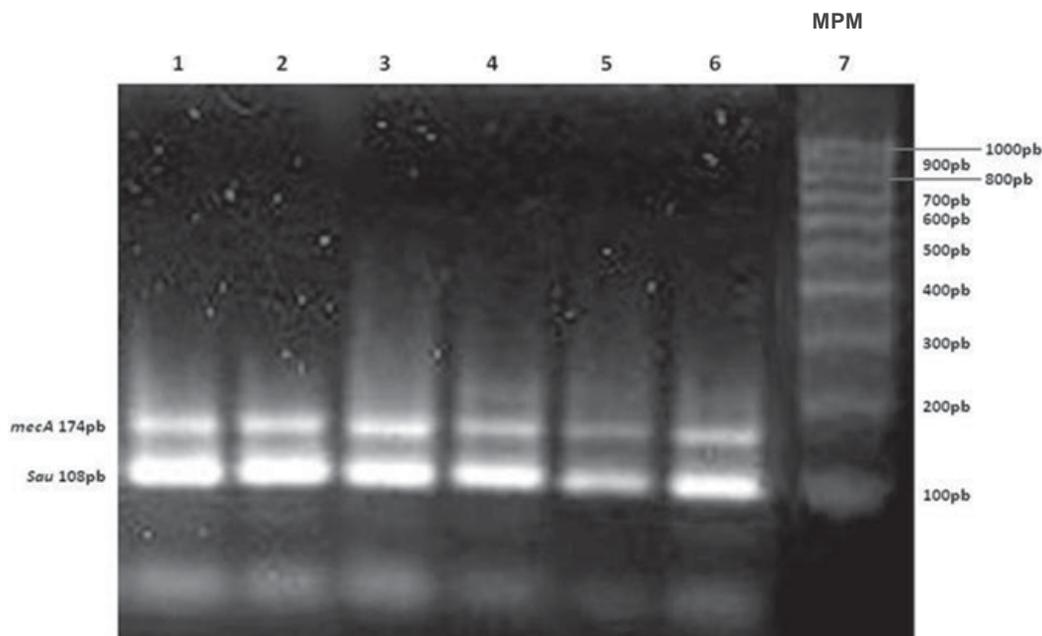
**Tabla 3.** Fenotipos de Resistencia Antimicrobiana en cepas de *S. aureus* aisladas en el CRB-SAHUM. Maracaibo-Enero-Marzo 2009 (n=106).

Antibiótico	Fenotipos					
	Resistentes		Intermedios		Sensibles	
	No.	%	No.	%	No.	%
Penicilina G	103	97,17	-	-	3	2,83
Oxacilina	54	50,94	-	-	52	49,06
Eritromicina	46	43,39	13	12,26	47	44,34
Gentamicina	37	34,91	-	-	69	65,09



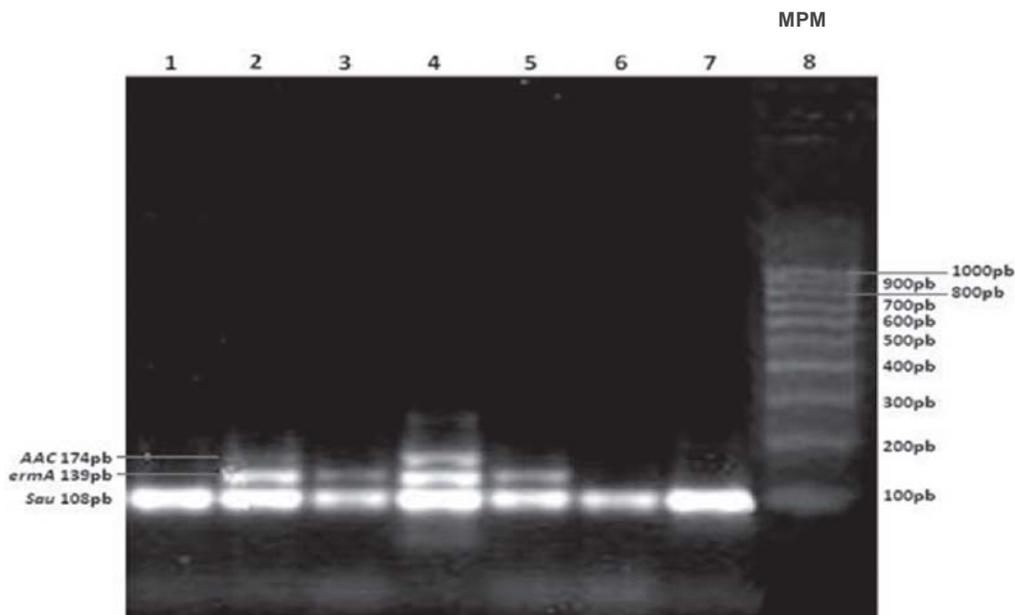
Los carriles 1; 2; 3; 4; 6 y 7 muestran 2 bandas, una superior que corresponde a la amplificación del gen *blaZ* (173pb) y una banda inferior que se refiere al control interno (*S. aureus*). El carril 5 no amplificó el gen *blaZ* (negativo), por lo que presenta una sola banda. El carril 8 corresponde al MPM (marcador de peso molecular).

**Figura 1.** Resultado de la PCR para el gen *blaZ* en cepas de *S. aureus* aisladas en el CRB-SAHUM. Maracaibo-Enero-Marzo 2009 (n=106).



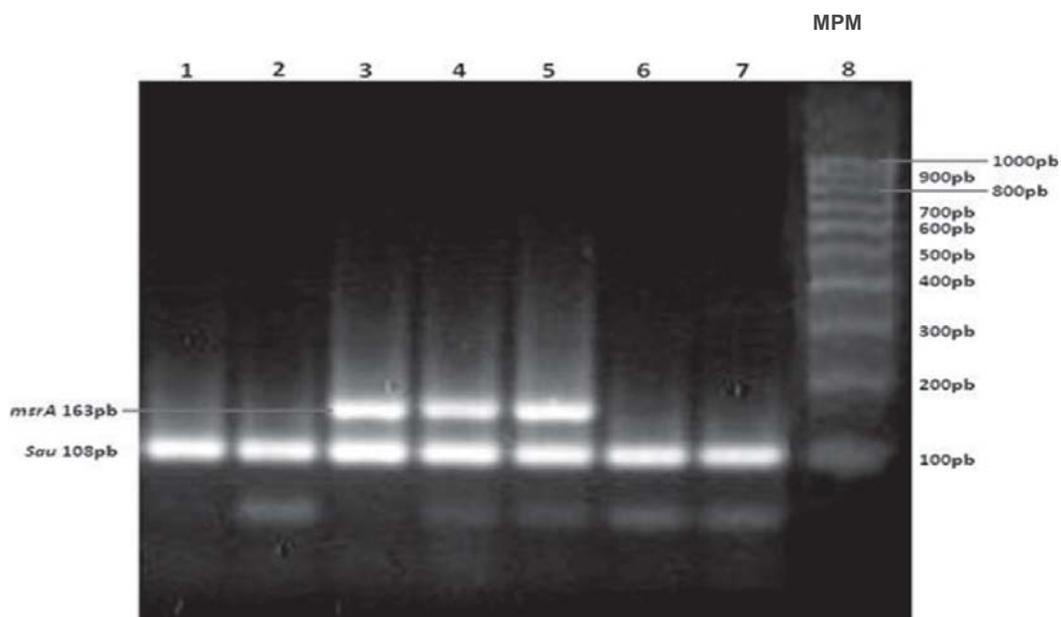
Los carriles 1 al 6 muestran 2 bandas: una inferior que se refiere al control interno para la identificación de *S. aureus* (108 pb), y una superior que corresponde a la amplificación del gen *mecA* (responsable de la resistencia a meticilina) (174 pb). El carril 7 corresponde al marcador de peso molecular (MPM).

**Figura 2.** Resultado de la PCR para el gen *mecA* en cepas de *S. aureus* aisladas en el CRB-SAHUM Maracaibo-Enero-Marzo 2009 (n=106).



Se indica la amplificación del gen *ermA* (responsable de la resistencia a eritromicina) (139 pb) en los carriles 2, 3, 4 y 5 y la amplificación del gen *aac(6)/aph(2)* (uno de los responsables de la resistencia a los aminoglicósidos) (174 pb) en los carriles 2 y 4. La banda inferior corresponde al control interno (*S. aureus*). El carril 8 corresponde al MPM (marcador de peso molecular).

**Figura 3.** Resultado de la PCR para los genes *ermA* y *aac(6)/aph(2)* en cepas de *S. aureus* aisladas en el CRB-SAHUM. Maracaibo-Enero-Marzo 2009 (n=106).



Los carriles 3, 4 y 5, muestran 2 bandas: una inferior (108 pb) que se refiere al control interno para la identificación de *S. aureus*, y una superior (163 pb) que corresponde a la amplificación del gen *msrA* (uno de los genes responsables de la resistencia a eritromicina). Los carriles 1, 2, 6 y 7, amplificaron una sola banda, correspondiente al control interno de *S. aureus*. El carril 8 contiene el marcador de peso molecular (MPM).

**Figura 4.** Resultado de la PCR para el gen *msrA* en cepas de *S. aureus* aisladas en el CRB-SAHUM Maracaibo-Enero-Marzo 2009 (n=106).

**Tabla 4.** Genotipos de Resistencia obtenidos mediante PCR en cepas de *S. aureus* aisladas en el CRB-SAHUM. Maracaibo-Enero-Marzo 2009 (n=106).

Genotipo de Resistencia	No	%
<i>blaZ</i>	36	33,97
<i>mecA blaZ ermA</i>	16	15,08
<i>mecA blaZ ermA aac(6')/aph(2'')</i> ,	10	9,43
<i>mecA blaZ msrA</i>	9	8,49
<i>blaZ ermA</i>	7	6,60
<i>mecA ermA</i>	7	6,60
<i>blaZ msrA</i>	6	5,66
<i>blaZ mecA</i>	5	4,73
<i>mecA</i>	4	3,77
Ninguno	3	2,84
<i>mecA msrA</i>	2	1,89
<i>blaZ ermA aac(6')/aph(2'')</i>	1	0,94
Total	106	100,00

**Tabla 5.** Determinación de la Concordancia entre los Genotipos y Fenotipos de Resistencia Anti-microbiana en cepas de *S. aureus* aisladas en el CRB-SAHUM. Maracaibo. Enero-Marzo 2009 (n=106).

Fenotipo	Genotipo						Gen Investigado	Anti-biótico	Indice <i>kappa</i> de Cohen
	Positivo	%	Negativo	%	Total	%			
Resistente	90	84,90	13	12,26	103	97,16	<i>blaZ</i>	PG	0,282
Sensible	0	-	3	2,84	3	2,84			
Resistente	53	50	1	0,94	54	50,94	<i>mecA</i>	OX	0,981
Sensible	0	-	52	49,06	52	49,06			
Resistente	47	44,34	0	-	47	44,34	<i>ermA</i> <i>msrA</i>	E	0,795
Sensible	11	10,38	48	45,28	59	55,66			
Resistente	70	66,04	0	-	70	66,04	<i>aac(6')/aph(2'')</i>	GM	0,337
Sensible	26	24,53	10	9,43	36	33,96			

poseía alguno de los cuatro genes asociados con la resistencia, basada en los ensayos de PCR múltiple. Por su parte, 59 cepas (55,67%) aparecieron fenotípicamente resistentes a este macrólido, encontrándose el gen *ermA* en 41 aislados (38,68%) y *msrA* en 17

(16,04%). Ninguna cepa resultó portadora de los genes *ermB* y/o *ermC*, también responsables de la resistencia a macrólidos. Todos los aislados poseían un solo mecanismo de resistencia a este grupo de antibióticos. En una de las cepas de *S. aureus* estudiadas con fenoti-

po de resistencia a eritromicina no se obtuvo producto de amplificación con ninguno de los genes estudiados.

La concordancia entre la resistencia a gentamicina y la presencia de *aac(6')/aph(2'')* se resume en la Tabla 5. Del total de cepas de *S. aureus* estudiadas, 69 (65,09%) eran susceptibles a gentamicina según la determinación por el método de difusión con disco en agar y negativas por PCR para *aac(6')/aph(2'')*. De las 37 cepas resistentes (34,91%), sólo 10 (27,02%) albergaban el gen *aac(6')/aph(2'')*; mientras que 27 de estas cepas (72,97%) no mostraron el determinante genético de resistencia en estudio.

Al determinar la asociación entre las dos variables (fenotipo y genotipo de resistencia), se encontró que estaban relacionadas ( $p < 0,05$ ). Al calcular el índice *kappa*, se encontró una muy buena concordancia entre el análisis genotípico y fenotípico para oxacilina y *mecA* ( $kappa = 0,981$ ); buena para eritromicina y *ermA/msrA* ( $kappa = 0,795$ ) y; baja para gentamicina y *aac6'/aph2''* ( $kappa = 0,337$ ) y para penicilina y *blaz* ( $kappa = 0,282$ ) (Tabla 5).

## Discusión

Uno de los criterios más importantes a considerar en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* es si el microorganismo es resistente a los  $\beta$ -lactámicos; y si este es el caso, si también expresa resistencia a otros grupos de antibióticos (5).

Está bien establecido que la identificación rápida y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana tienen un impacto positivo sobre los resultados clínicos de las infecciones graves (3). La PCR para el gen *mecA* es considerada como el método de referencia para la detección de resistencia a meticilina (oxacilina) en *S. aureus*; debido a que, con

frecuencia, ésta se expresa de manera heterogénea *in vitro* (16).

Hasta mediados de la década de 1990, la mayoría de los aislamientos SAMR exhibió un fenotipo de multirresistencia. Por lo tanto, la demostración de *mecA* como marcador básico fue considerado “clave” para la elección de los glicopéptidos como una alternativa terapéutica (15, 16). Sin embargo, es evidente el cambio en la dinámica de los clones SAMR en las últimas décadas y se ha detectado un aumento de la prevalencia de nuevos brotes por cepas con patrones de resistencia más estrechos (16).

Por otra parte, se han notificado brotes con cepas epidémicas “viejas” que han adquirido resistencia a otros agentes antimicrobianos de utilidad en el tratamiento de las infecciones por SAMR, incluyendo los más recientemente desarrollados (15, 16). Por lo tanto, la detección de genes que confieren resistencia a los antibióticos “viejos” como macrólidos, lincosamidas, aminoglicósidos y tetraciclinas se ha vuelto clínicamente relevante, razones por las cuales, las pruebas de diagnóstico rápido para SAMR deberían incluir pruebas de resistencia a antibióticos estándar, así como a los compuestos recientemente introducidos.

Desde su aparición en 1941, la resistencia a penicilina es común en cepas de *S. aureus*, al punto que más del 90% de las cepas expresan esta resistencia (17). Esta afirmación encuentra sustento en los resultados de la presente investigación, donde 97,16% de las cepas de *S. aureus* estudiadas se mostraron resistentes a penicilina en el antibiograma. Sin embargo, al determinar la producción de  $\beta$ -lactamasas, se encontró que 12,62% de las cepas resultaron negativas. El gen responsable de la producción de esta enzima inactivadora de antibióticos se encontró en el 87,38% de los casos.

Resultados similares han sido descritos con anterioridad, cepas SAMR recientemente aisladas tienen altos niveles de resistencia a penicilina y producen  $\beta$ -lactamasas con menos frecuencia que las cepas susceptibles a la meticilina. Este fenómeno se ha observado con mayor frecuencia en Japón (18, 19). Al analizar el gen de  $\beta$ -lactamasas (*blaZ*) por PCR, se encontró que el 50% de las cepas SAMR poseían este gen. Además, el estudio indica que este tipo de cepas tiene una mayor capacidad de colonizar exitosamente individuos, incrementando su potencial epidémico, probablemente a causa del ahorro de la energía consumida en la producción de  $\beta$ -lactamasas y la pérdida del plásmido de  $\beta$ -lactamasa codificando el gen represor *mec*, lo que resulta en la producción de PBP2a constitutiva. Estos factores pueden contribuir a la propagación de cepas SAMR en un entorno nosocomial.

Las discrepancias observadas entre los métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de la resistencia a meticilina están representadas por una cepa SAMR-*mecA* negativa que mostraba un nivel límite de resistencia (resistencia borderline) basada en las pruebas de difusión con disco en agar y determinación de la susceptibilidad mediante determinación de la concentración inhibitoria mínima a oxacilina (CIM=4mg/mL). Se realizaron pruebas adicionales para verificar si correspondía a una hiper-producción de  $\beta$ -lactamasas, un mecanismo que puede mediar la resistencia a meticilina en *S. aureus*. Se obtuvo una reacción positiva a la nitrocefina, la presencia del gen *blaZ* revelado por PCR y la positividad de la prueba *in vitro* con discos de amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico, confirmando que esta cepa era efectivamente, hiper-productora de  $\beta$ -lactamasas. Ninguna cepa resultó sensible a oxacilina y positiva para *mecA*.

Contrariamente a lo esperado, en este estudio, la enzima bifuncional AAC(6')/APH(2'') fue la EMA presente en apenas 10,37% de las cepas de *S. aureus* probadas. Estudios previos reseñan que esta enzima es la más prevalente en este patógeno, reportando valores que varían de 66 a 68%, seguida de la enzima ANT(4)-IA (24%) y APH(3')-IIIA (8%), respectivamente (4, 6, 7). Estas diferencias en las prevalencias de las EMAs pueden obedecer a variaciones de acuerdo al área geográfica y a las políticas vigentes de uso de los antibióticos implicados (5). La discrepancia existente entre el número de cepas con genotipo *aac(6')/aph(2'')* 10,37% y el fenotipo de resistencia a gentamicina (34,91%) sugiere la posibilidad de que en esta área geográfica exista una mayor prevalencia de las restantes EMAs observables en *S. aureus*, las cuales no fueron objeto de estudio.

Cambios en la prevalencia de los genes que codifican EMAs podrían deberse a cambios en las políticas de antibióticos o por la introducción y/o consecuente propagación inter-hospitalaria de cepas resistentes, especialmente SAMR. Además, no puede excluirse la posibilidad de que estos genes de resistencia se originaran en una fuente del medio ambiente. De hecho, con frecuencia se han notificado que especies saprófitas portan factores determinantes de resistencia, incluyendo genes que codifican EMAs y como tales, tienen la capacidad para funcionar como un reservorio. Se ha demostrado la transferencia genética por conjugación de factores determinantes de resistencia entre *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativa, conducentes a la rápida difusión de estos determinantes en el entorno de hospital. En cada aislamiento que manifiesta fenotípicamente resistencia a cualquiera de los compuestos probados, se ha detectado un gen conocido para una EMA que puede ser representativo del

fenotipo. Esto sugiere que no están circulando nuevos genes de resistencia a aminoglicósidos dentro de la población de estafilococos (5).

En el 55,57% de las cepas de *S. aureus* resistentes a eritromicina estudiadas, se detectó la presencia de algunos de los genes implicados en la resistencia a macrólidos. El gen *mrsA* se detectó en todos los aislados con fenotipo de bomba de expulsión (MS<sub>B</sub>). En el resto de las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> (constitutivo), fue el gen *ermA* el único detectado.

Otros estudios coinciden al señalar que el mecanismo de resistencia MLS<sub>B</sub> constitutivo es el más común en *S. aureus* (9); sin embargo, también existen autores que han encontrado mayor frecuencia para el fenotipo inducible (20-22), siendo el gen de resistencia más frecuentemente detectado en las cepas resistentes a eritromicina, el *ermC* a diferencia de los resultados aquí presentados en los cuales, el determinante prevalente es el *ermA* presente en 36,68% de los aislamientos eritromicina resistentes. Todos los aislamientos poseían un solo mecanismo de resistencia (*msrA* o *ermA*).

De acuerdo a lo referido en otras investigaciones, ninguno de los aislados SAMR poseía el gen *ermB* o *ermC*. El gen *ermB* ha sido detectado en un pequeño porcentaje de cepas de estafilococos, principalmente en aislados de procedencia animal (9, 19). Por su parte, el gen *ermC* es más común en especies de estafilococos coagulasa negativos (9).

En una de las cepas SAMR resistentes a eritromicina no se obtuvo producto de amplificación con ninguno de los genes estudiados, lo cual permite suponer que podrían poseer un mecanismo distinto de resistencia a eritromicina, como por ejemplo, una mutación en el ARN 23S ya descrita en *Streptococcus pneumoniae* (8, 9).

La concordancia entre los métodos fenotípicos (difusión con discos) y genotípicos ayuda a inferir el posible mecanismo molecular de resistencia a presente en *S. aureus*, facilitando de este modo la instauración del tratamiento antimicrobiano más adecuado, así como apreciar las diferencias epidemiológicas en su distribución (9). De hecho, altas tasas de resistencia a los penicilina G, oxacilina, aminoglicósidos y/o macrólidos deben ser consideradas cuando se planifica el tratamiento de infecciones por este patógeno en hospitales donde los estudios moleculares no están disponibles.

Los resultados encontrados demuestran la relación entre los fenotipos y genotipos de resistencia antimicrobiana; ya que cada vez que se detecta un gen de resistencia, ésta se hace presente; sin embargo, existe una marcada variabilidad en los determinantes genéticos de la resistencia lo que repercute, indudablemente en su expresión fenotípica, razón por la cual se torna muy difícil detectar la resistencia mediante los métodos fenotípicos convencionales; ya que la resistencia obedece a múltiples factores que las pruebas fenotípicas clásicas no pueden englobar.

En general, para oxacilina y en menor proporción para eritromicina, existe una buena concordancia entre los fenotipos y genotipos de resistencia encontrados; observándose la mayor discrepancia en los aminoglicósidos, debido a que en la mayoría de las cepas fenotípicamente resistentes no se pudo identificar el gen determinante de la resistencia investigado y para penicilina G, debido a la presencia del gen *mecA*, que implica resistencia a todos los antibióticos del grupo de los  $\beta$ -lactámicos; independientemente de la presencia de *blaZ*.

## Referencias bibliográficas

- (1) Chambers H. The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis 2001; 7(2):178-82.
- (2) Fluit AC, Visser M, Schmitz F. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4):836-71.
- (3) Martineau F, Picard F, Lansac N, Menard C, Roy P, Ouellette M. et al. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 2000 Feb 1; 44(2):231-8.
- (4) Schmitz F, Fluit A, Gondolf, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J. et al. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. J Antimicrob Chemother 1999; 43(2):253-9.
- (5) Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. Microbiol Res 2006; 161(1):49-54.
- (6) Choi S, Kim S, Kim H, Lee D, Choi J, Yoo J. et al. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. J Korean Med Sci 2003; 18(5):631-6.
- (7) Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes by Susceptibility Testing: Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. J Clin Microbiol 2001; 39(9):3115-21.
- (8) Lewis J, Jorgensen J. Inducible clindamycin resistance in Staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? Clin Infect Dis 2005; 40(2):280-5.
- (9) Merino-Diaz L, Cantos de la CA, Torres-Sanchez M, Heznar-Martin J. Detection of inducible resistance to clindamycin in cutaneous isolates of *Staphylococcus spp.* by phenotypic and genotypic methods. Enferm Infecc Microbiol Clin 2007; 25(2):77-81.
- (10) Steward C, Raney P, Morrell A, Williams P, McDougal L, Jevitt L. et al. Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43(4):1716-21.
- (11) Daurel C, Huet C, Dhalluin A, Bes M, Etienne J, Leclercq R. Differences in potential for selection of clindamycin-resistant mutants between inducible *erm(A)* and *erm(C)* *Staphylococcus aureus* genes. J Clin Microbiol 2008; 46(2):546-50.
- (12) Sekiguchi J, Fujino T, Saruta K, Konosaki H, Nishimura H, Kawana A. et al. Prevalence of erythromycin-, tetracycline-, and aminoglycoside- resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tokyo and Kumamo. Jpn J Infect Dis 2004; 57:74-7.
- (13) Becker K, vonEiff C. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: Versalovic J Carrol K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editors. Manual of Clinical Microbiology. Tenth ed. Washington, DC. ASM Press; 2011.
- (14) CLSI (Clinical Laboratory Standardization Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement M100-S19. CLSI, editor. 19th[29], 1-156. 2009. USA.
- (15) Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1998; 36(3):618-23.
- (16) Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41(9):4089-94.
- (17) Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-

- Screen Latex Agglutination Test. *J Clin Microbiol* 2002; 40(8):2766-71.
- (18) Yokoyama T, Honda J, Kawayama T, Kajimura K, Oizumi K. Increased incidence of beta-lactamase-plasmid negative, high level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Kurume Med J* 1996; 43(3): 199-206.
- (19) Kaase M, Lenga S, Friedrich S, Szabados F, Sakinc T, Kleine B, et al. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(6):614-6.
- (20) Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(5):1062-6.
- (21) Hamilton-Miller J, Shah S. Patterns of phenotypic resistance to the macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(6):941-9.
- (22) Ghebremedhin B, Olugbosi M, Raji A, Layer F, Bakare R, Konig B, et al. Emergence of a Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain with a Unique Resistance Profile in Southwest Nigeria. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9): 2975-80.