

***Staphylococcus* coagulasa negativa**

RESUMEN: La resistencia de estafilococos a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del tipo B (antibióticos MLS_B) puede ser debida a tres mecanismos básicos. El primero es una resistencia cruzada a los tres grupos de antibióticos estructuralmente diferentes, dando efectos similares sobre la síntesis de proteínas bacterianas. Los genes responsables *ermA*, *ermB* y *ermC*, protegen al ribosoma de la unión del fármaco por una metilación de la subunidad 23S del rRNA, pudiéndose expresar de forma constitutiva o inducible. El segundo mecanismo confiere resistencia cruzada parcial a macrólidos y estreptograminas B, por medio de la expulsión activa de los antibióticos, la cual es conferida por el gen *msrA*. Otro sistema de expulsión es codificado por el gen *mef*, el cual confiere resistencia a macrólidos y sensibilidad a lincosamidas y estreptograminas. El tercer mecanismo es una modificación del antibiótico, las células que presentan el gen *linA*, inactivan a la lincomicina y la clindamicina. (eliminar: pero resisten altos niveles de lincomicina solamente. Para caracterizar de forma fenotípica y genotípica la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS) en cepas de *Staphylococcus* spp aisladas en el Hospital General de Acapulco, se analizaron 41 cepas de *S. aureus* y 141 de *Staphylococcus* coagulasa-negativa (CNS) colectadas durante el periodo de noviembre de 2000 a septiembre de 2004. La identificación a nivel de especie se realizó mediante la tinción de Gram, producción de catalasa y coagulasa, y por pruebas bioquímicas del API Staph. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por la técnica de difusión en disco y la concentración inhibitoria mínima por el método de dilución en agar. La resistencia inducible a clindamicina se determinó por la prueba de difusión de doble disco. La amplificación de los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *mef*, *msrA*, *linA*, y *vga* implicados en la resistencia a antibióticos MLS se llevó a cabo por la técnica de la PCR. La resistencia a eritromicina, clindamicina y quinupristina/dalfopristina fue del 29%, 22% y 15% para *S. aureus* y del 63%, 35% y 20% para los CNS. La resistencia inducible a clindamicina en *S. aureus* estuvo ausente y en los CNS fue del 4.3%, los cuales incluyeron las especies *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. Las cepas analizadas presentaron de uno a cuatro genes asociados a esta la resistencia a MLS; la prevalencia del gen *ermA* fue del 26%, de *ermB* del 1%, de *ermC* del 24%, de *msrA* del 20%, de *mef* del 4.4%, de *linA* del 15% y de *vga* del 22%. En conclusión, la resistencia a los antibióticos MLS fue mayor en los aislamientos clínicos de CNS comparado con *S. aureus*. Los genes que codifican para dicha resistencia presentaron una relación especie específica, siendo el gen *ermA* dominante en *S. aureus*, el gen *ermC* en *S. haemolyticus* y el gen *msrA* en los CNS.

INTRODUCCIÓN: En la actualidad se ha producido un cambio en la epidemiología de las infecciones en los hospitales, con un aumento en el número de casos causados por cocos Grampositivos, entre ellos, cepas de *S. epidermidis* y *S. aureus* que presentan resistencia a una variedad de antibióticos. Para llevar a cabo el tratamiento de las infecciones sistémicas, respiratorias, de la piel y tejidos blandos, entre otras, y que son causadas por los estafilococos, se emplean los antibióticos beta lactámicos, así como los macrólidos, las lincosamidas y las estreptograminas. En los estafilococos se han identificado diferentes genes que confieren resistencia a antibióticos MLS por medio de una variedad de mecanismos, como son la modificación del sitio blanco, que reduce la unión al agente antimicrobiano, la presencia de proteínas que activamente expulsan el

antibiótico al exterior de la célula y la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos. En México no tenemos estudios sobre los mecanismos de resistencia a antibióticos MLS presentes en aislamientos de *Staphylococcus* spp, que den a conocer la distribución de genes que codifican para la resistencia a estos antibióticos. Por lo que es clave generar información actualizada que permita conocer la prevalencia de los diferentes mecanismos de resistencia a MLS en los estafilococos y su asociación con la resistencia a la meticilina. Además de establecer la relación clonal de las cepas aisladas en un ambiente hospitalario, como es el Hospital General de Acapulco, Guerrero; lo que permitirá orientar políticas de antibioterapia, prevención, vigilancia y control de las infecciones intrahospitalarias que pueden ser aplicadas en éste y en otros hospitales. Es de vital importancia determinar si la resistencia a diferentes antibióticos en las cepas de SCN de origen hospitalario está asociada a la presencia de elementos genéticos que pueden ser transferidos a otras bacterias, lo cual involucraría un mayor riesgo para la comunidad hospitalaria debido a la facilidad de diseminación de la resistencia entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

MATERIAL Y MÉTODOS: En este estudio se analizaron 183 aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de pacientes del Hospital General de Acapulco, colectados durante el periodo comprendido de noviembre de 2000 a octubre de 2004. Se seleccionaron dos cepas de SCN de origen hospitalario, a partir de una colección de cepas de SCN con características variadas de resistencia a diversos antibióticos. La cepa SCN 206F que presenta un gran número de marcadores de resistencia (con resistencia a 11 marcadores) y la cepa SCN 203C tiene un número bajo de marcadores de resistencia (con resistencia a 6 marcadores). La cepa SCN 206F es susceptible a la rifampicina, mientras que la cepa SCN 203C es resistente a ese mismo antibiótico. La rifampicina fue el antibiótico seleccionado como marcador para corroborar que se llevó a cabo el proceso de transferencia de material genético. Ambas cepas de SCN seleccionadas pertenecen a la especie de *S. auricularis*.

Prueba de resistencia inducible a clindamicina. La resistencia inducible a clindamicina se determinó por la prueba D (Jorgensen *et al.*, 2004). Dicha técnica consiste en colocar un disco de eritromicina (15 µg) y otro de clindamicina (2 µg) separados por una distancia de 15 mm de borde a borde en una placa de agar Müller-Hinton que ha sido previamente inoculada con una suspensión (0,5 McFarland) del microorganismo. Después de 16 a 18 horas de incubación a 35° C, el achatamiento en la zona de inhibición a la clindamicina proxima al disco de eritromicina (efecto zona D) indica un fenotipo de resistencia inducible a clindamicina.

RESULTADOS: Incidencia de la resistencia inducible a clindamicina. Los aislamientos que fueron sensibles a clindamicina pero resistentes o intermedios a eritromicina fueron probados para la resistencia inducible por la prueba D. En el cuadro 8 se detalla la distribución de fenotipos y genotipos de resistencia a MLS_B en los *Staphylococcus* spp estudiados. Ninguna de las cepas de *S. aureus* que resultaron sensible a clindamicina y resistente a eritromicina mostró un comportamiento de resistencia inducible a clindamicina; mientras que el 4.3% de los aislamientos de SCN presentaron una resistencia inducible a clindamicina, las cuales incluyeron las especies *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. La prueba de inducción fue específica, ya que ninguno de los aislamientos susceptibles a eritromicina, presentaron algún estrechamiento de las zonas de inhibición de la clindamicina. Los aislamientos analizados presentaron de uno a dos genes asociados a la resistencia a MLS (presentados con asterisco); la prevalencia del gen *ermA* fue del 26% y del gen *ermC* del 24%, solo 1% de

los aislamientos clínicos presentaron el gen *ermB* y el 20% presentó el gen *msrA*, el cual estuvo relacionado con la resistencia a eritromicina pero no estuvo presente en las cepas con resistencia inducible a clindamicina ($C^{r\text{-const}}$). Los aislamientos de *S. epidermidis* con resistencia inducible a clindamicina ($C^{r\text{-ind}}$) presentaron el gen *ermC*. Dos aislamientos de *S. haemolyticus* con $C^{r\text{-ind}}$ presentaron el gen *ermA* y uno el gen *ermC*. En 10 aislamientos con resistencia constitutiva a clindamicina no fue detectado algún gen de resistencia a lincosamidas, lo que podría indicar la presencia de un nuevo determinante de resistencia.

Cuadro. Distribución de fenotipos y genotipos de resistencia a MLS_B en *Staphylococcus* spp., del Hospital General de Acapulco.

Organismo, fenotipo y (N)	Número de cepas	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>	Ninguno
<i>S. aureus</i> (41)						
C sensible	32	12	0	3	3	14
C r-ind	0	0	0	0	0	0
C r-const	9	1*	1	3+1*	0	4
<i>S. epidermidis</i> (47)						
C sensible	27	4 +2*	0	3+2*	4	14
C r-ind	3	0	0	3	0	0
C r-const	17	7 + 1*	1	4 +1*	3	1
<i>S. haemolyticus</i> (49)						
C sensible	26	3+2*	0	4+2*	9+2*	6
C r-ind	3	2	0	1	0	0
C r-const	20	2+1*	0	9+2*	6+1*	1
Otros SCN (45)						
C sensible	33	7+2*	0	2*	5	19
C r-ind	0	0	0	0	0	0
C r-const	12	1	0	3+1*	2+1*	5
Total (%)	182	47 (26%)	2 (1%)	44 (24%)	36 (20%)	64 (35%)

* = Cepas que presentan más de uno de los genes, C = Clindamicina, r-ind = resistencia inducible, r-const = resistencia constitutiva

Transferencia del material genético entre SCN 206F Y *E. coli* 133. Se realizó el proceso de conjugación entre las cepas, donadora SCN 206 F y la cepa receptora *E. coli*. La conjugación se evaluó con un antibiograma en medio EMB para determinar el número de marcadores de resistencia transferidos. Se obtuvo la cepa transconjugante SCN 206F/133-A, la cual presentó resistencia al aminoglucósido tobramicina (NN) y a la quinolona ciprofloxacina (CIP). También se obtuvo una resistencia intermedia al aminoglucósido neomicina (N) y a las quinolonas norfloxacina (NOR), ofloxacina (OFX) y gatifloxacina (GAT). Estos resultados muestran que después del proceso de conjugación la cepa receptora adquirió resistencia a varios antibióticos

de dos familias de diferentes, los aminoglucósidos y las quinolonas, siendo en esta última familia donde se transfirieron un mayor número de marcadores de resistencia.

Se realizaron tres ensayos adicionales de la conjugación entre las cepas SCN206F y *E. coli* con la finalidad de demostrar la reproducibilidad del experimento. De estos ensayos se obtuvieron 3 cepas transconjugantes denominadas SCN206F/133-B, SCN206F/133-C, SCN206F/133-D. Los antibiogramas para determinar el patrón de resistencia de cada una de las cepas se realizó en agar EMB.

En el siguiente cuadro se muestra la resistencia adquirida por las diferentes transconjugantes después del proceso de conjugación entre las cepas SCN 206F y *E. coli* 133. En los cuatro ensayos realizados existió transferencia de la resistencia hacia algunos antibióticos de la familia de las quinolonas, específicamente hacia dos quinolonas de segunda generación (NOR y OFX) y una de cuarta generación (GAT) y al aminoglucósido neomicina (N). Comparando las transconjugantes SCN 206F/133-B y SCN 206F/133-D se muestra transferencia de resistencia hacia toda la familia de las quinolonas.

En la familia de las cefalosporinas hubo transferencia de resistencia intermedia en las transconjugantes SCN 206F/133-B, SCN 206F/133-C y SCN 206F/133-D hacia el cefuroxime (CXM), cefalosporina de segunda generación. La transconjugante SCN 206F/133-B adquirió resistencia a la ceftizoxima (ZOX) y resistencia intermedia a la cefoperazona (CFP), ambas cefalosporinas de tercera generación. Y en la transconjugante SCN 206F/133-C se adquirió resistencia a ceftizoxima (ZOX) y ceftriaxona (CRO), que pertenece a la familia de las cefalosporinas de tercera generación. El patrón de resistencia de la primera transconjugante obtenida, SCN 206F/133-A, muestra que no hubo transferencia de la resistencia hacia ningún antibiótico de la familia de las cefalosporinas, al igual que en la transconjugante SCN 206F/133-D.

Las transconjugantes SCN 206F/133-A, SCN 206F/133-C y SCN 206F/133-D adquirieron resistencia intermedia a la neomicina (N), antibiótico perteneciente a la familia de los aminoglucósidos y sólo la transconjugante SCN 206F/133-B adquirió resistencia a este mismo antibiótico.

Se adquirió resistencia y resistencia intermedia a la tobramicina (NN), de la familia de los aminoglucósidos, en las cepas transconjugantes SCN 206F/133-A y SCN 206F/133-B respectivamente.

De los cuatro ensayos realizados se observa que la transconjugante SCN 206F/133-B es la que adquirió un mayor número de marcadores de resistencia transferidos. De los 25 antibióticos utilizados en la conjugación para esta cepa hubo transferencia de la resistencia en 10 de ellos, tres de los cuales únicamente adquirieron resistencia intermedia (CXM, CFP y NN). Esta transconjugante adquirió determinantes de resistencia para tres cefalosporinas, una de segunda generación (CXM) y dos de tercera generación (CFP y ZOX); así como a dos antibióticos de la familia de los aminoglucósidos (NN y N) y a toda la familia de quinolonas.

Las transconjugantes SCN 206F/133-C y SCN 206F/133-D adquirieron resistencia a 7 antibióticos de los 25 utilizados. En la transconjugante SCN 206F/133-D hubo transferencia de la resistencia hacia todos los antibióticos de la familia de las quinolonas, siendo la levofloxacina (LVX) la única quinolona a la cual se adquirió resistencia intermedia. Las otras dos resistencias intermedias adquiridas en esta transconjugantes

fueron hacia el cefuroxime (CXM), cefalosporina de segunda generación; y a la neomicina (N) que es un aminoglucósido.

En la transconjugante SCN 206F/133-C únicamente se adquirió resistencia a tres quinolonas, dos de segunda generación (NOR y OFX) y una de cuarta generación (GAT); dos de las cuales presentaron una resistencia intermedia (OFX y GAT). También se generó resistencia a 2 cefalosporinas de tercera generación (ZOX y CRO) y resistencia intermedia a una cefalosporina de segunda generación (CXM) y a un aminoglucósido (N).

Finalmente la transconjugante SCN 206F/133-A fue la que adquirió menor resistencia a diversos antibióticos después del proceso de conjugación, debido a que de un total de 27 antibióticos utilizados para esta cepa sólo de adquirió resistencia a 6, cuatro de los cuales fueron resistencia intermedia (N, NOR, OFX y GAT). En esta transconjugante la resistencia adquirida fue hacia la familia de las quinolonas, a excepción de la levofloxacina (LVX) en donde no existió transferencia de la resistencia. En esta familia tres de las cuatro resistencias adquiridas son resistencias intermedias (NOR, OFX y GAT). También existió transferencia de la resistencia a dos antibióticos de la familia de los aminoglucósidos tobramicina (NN) y neomicina (N), éste último adquiriendo una resistencia intermedia.

En general, después de los procesos de conjugación existió en las cuatro cepas transconjugantes transferencia de la resistencia a la mayoría de los antibióticos de la familia de las quinolonas y los aminoglucósidos, y sólo en las transconjugantes SCN 206F/133-B, SCN 206F/133-C y SCN 206F/133-D se adquirió resistencia a algunas cefalosporinas de segunda y tercera generación.

Cuadro . Comparación de los resultados de la transferencia del material genético por el método de conjugación para cuatro ensayos entre las cepas SCN 206 F y *E. coli* 133.

SUSCEPTIBILIDAD A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS (DIÁMETRO EN MM)						
Agente antimicrobiano	SCN206F Donadora	<i>E. coli</i> 133 Receptora	Transconjugante 206F/133-A	Transconjugante 206F/133-B	Transconjugante 206F/133-C	Transconjugante 206F/133-D
β- LACTÁMICOS						
PENICILINAS						
Amoxicilina (AMC)	0mm (R)	0mm (R)	9mm (R)	12mm (R)	0mm (R)	0mm (R)
Penicilina (P)	0mm (R)	0mm (R)	0mm (R)	0mm (R)	9mm (R)	0mm (R)
CARBAPENEMAS						
Meropenem (MEM)	0mm (R)	20mm (S)	25mm (S)	20mm (S)	36mm (S)	25mm (S)
CEFALOSPORINAS						
PRIMERA GENERACIÓN						
Cefazoline (CZ)	0mm (R)	14mm (R)	18 (S)	14mm (R)	18mm (S)	14mm (R)
Cefalotina (CF)	0mm (R)	15mm (R)	0mm (R)	13mm (R)	0mm (R)	15mm (R)
SEGUNDA GENERACIÓN						
Cefuroxime (CXM)	0mm (R)	23mm (S)	22mm (S)	16mm (I)	16mm (I)	15mm (I)
Cefoxitina (FOX)	0mm (R)	11mm (R)	0mm (R)	10mm (R)	10mm(R)	0mm (R)
Cefaclor (CEC)	0mm (R)	21mm (S)	26mm (S)	20mm (S)	33mm (S)	22mm (S)
TERCERA GENERACIÓN						
Cefoperazona (CFP)	0mm (R)	33mm (S)	30mm (S)	16mm (I)	34mm (S)	22mm (S)
Ceftizoxima (ZOX)	0mm (R)	32mm (S)	25mm (S)	13mm (R)	0mm (R)	21mm (S)
Ceftriaxona (CRO)	0mm (R)	32mm (S)	28mm (S)	23mm (S)	0mm (R)	23mm (S)
Ceftazidima (CAZ)	0mm (R)	31mm (S)	27mm (S)	NR*	NR*	NR*
CUARTA GENERACIÓN						
Cefepime (FEP)	0mm (R)	29mm (S)	30mm (S)	NR*	NR*	NR*
AMINOGLUCÓSIDOS						
Netilmicina (NET)	18mm (S)	24mm (S)	15mm (S)	15mm (S)	23mm (S)	18mm (S)
Tobramicina (NN)	0mm (R)	22mm(S)	12mm (R)	13mm (I)	18mm (S)	17mm (S)
Amikacina (AN)	12mm (R)	24mm (S)	18mm (S)	18mm (S)	21mm (S)	26mm (S)
Neomicina (N)	10mm(R)	19mm (S)	13mm (I)	12mm (R)	13mm (I)	15mm (I)
TETRACICLINAS						
Tetraciclina (TE)	17mm (I)	17mm (I)	21mm (S)	14mm (R)	22mm (S)	17mm (I)
Doxiciclina (D)	17mm (S)	15mm (I)	19mm (S)	14mm (I)	13mm (I)	15mm (I)
QUINOLONAS						
SEGUNDA GENERACIÓN						
Ciprofloxacina (CIP)	0mm (R)	24mm (S)	14mm (R)	12mm (R)	21mm (S)	15mm (R)
Levofloxacina (LVX)	0mm(R)	29mm (S)	17mm (S)	10mm (R)	18mm (S)	14mm(I)
Norfloxacina (NOR)	0mm (R)	20mm (S)	15mm (I)	0mm (R)	12mm (R)	0mm (R)
Ofloxacina (OFX)	0mm (R)	22mm (S)	15mm (I)	10mm (IR)	15mm (I)	8 mm (R)
CUARTA GENERACIÓN						
Gatifloxacina(GAT)	17mm (I)	25mm (S)	16mm (I)	14mm (R)	16mm (I)	12mm (R)
MISCELANEOS						
Cloramfenicol (C)	0mm (R)	25mm (S)	27mm (S)	25mm (S)	33mm (S)	31mm (S)
Nitrofurantoina (F/M)	19mm (S)	27mm (S)	23mm (S)	17mm (S)	30mm (S)	21mm (S)
Rifampicina (RA)	40mm (S)	0mm (R)	9m (R)	0mm (R)	0mm (R)	16mm(R)

Pseudomonas aeruginosa

RESUMEN: *Pseudomonas aeruginosa* es el principal patógeno responsable de los altos índices de mortalidad y morbilidad en pacientes que sufren de fibrosis quística pulmonar, así como infecciones intrahospitalarias, principalmente en la unidad de cuidados intensivos. El tratamiento integral a estos pacientes incluye el uso de antibióticos, principalmente de la familia de los beta-lactámicos; por lo que este microorganismo, recibe una estimulación continua hacia dichos antimicrobianos propiciándose así la selección de cepas resistentes. La resistencia puede estar mediada por diversos mecanismos bioquímicos, resaltándose aquellos asociados a la producción de beta-lactamasas, las cuales pueden ser del tipo serin-beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL) o metalo-beta-lactamasas (MBL); así como a la acción de bombas de expulsión o eflujo. El objetivo de esta parte del proyecto se relacionó con el análisis de beta-lactamasas de los tipos ESBL y MBL, así como de la alteración de 3 mecanismos de eflujo. Se emplearon los métodos de difusión en discos de papel filtro y de dilución seriada en placa y en microplaca para detectar aquellas cepas resistentes al imipenem, a cefalosporinas de 3ª generación, a quinolonas y a aminoglucósidos; los cuales constituyen el esquema terapéutico al que son sometidos los pacientes con infecciones por *P. aeruginosa*, apreciándose una presión de selección de cepas resistentes a estos antimicrobianos. Las pruebas fenotípicas de sinergismo que permiten detectar a las beta-lactamasas, mostraron en lo general una correlación, entre cepas resistentes a ceftazidima y presencia de ESBL y cepas resistentes a imipenem presentando una MBL; sugiriendo así que el mecanismo de resistencia es debido a la producción de las enzimas respectivas. Se empleó la prueba genotípica de PCR para detectar algún gen de las 4 MBL descritas a la fecha. Se observó que en esta colección de cepas, sólo se obtuvieron amplificadores de los iniciadores diseñados para detectar el gen del tipo VIM. Después de secuenciados, el análisis bioinformático reveló una correspondencia con la variante VIM-11, confirmándose la presencia de este tipo de MBL en las cepas de *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, datos que evidencian por primera vez este mecanismo de resistencia y que no han sido reportados en cepas aisladas de pacientes con FQ. La utilización de iniciadores degenerados no permitió el amplificar todo el gen, por lo que se están siguiendo otras estrategias y así poder caracterizar la variante de beta lactamasa VIM que presentan las cepas provenientes de pacientes con fibrosis quística y aquellas provenientes de pacientes que sufrieron algún tipo de infección intrahospitalaria. En presencia del inhibidor PaBN 10 cepas mostraron una CIM sensible a cabenecilina, 5 cepas disminuyeron la CIM para gentamicina de 7-8 diluciones, 18 cepas mostraron sensibilidad a eritromicina, 12 fueron sensibles a norfloxacin. Todas las cepas incluidas en este estudio disminuyen la CIM para al menos un sustrato de los SE. La resistencia a los 4 sustratos evaluados fue reestablecida en los ensayos sin PaBN lo que sugiere el fenómeno de multiresistencia que muestran estas cepas pueden ser resultado de la expresión de uno o mas sistemas de eflujo.

INTRODUCCIÓN: Se ha demostrado la estrecha asociación entre *P. aeruginosa* y los pacientes con FQ, quienes pueden ser colonizados por esta bacteria desde edades muy tempranas, llegando a fallecer por la infección bacteriana crónica o bien por las complicaciones derivadas de ésta. El tratamiento integral de estos pacientes con FQ incluye el uso de antibióticos, principalmente de la familia de los beta-lactámicos; por lo que este microorganismo recibe una estimulación continua por estos antimicrobianos propiciándose así la selección de cepas resistentes.

Dicha resistencia puede estar mediada por diversos mecanismos bioquímicos, resaltándose aquél asociado a la producción de beta-lactamasas, las cuales pueden ser del tipo serin-beta-lactamasas o metalo-beta-lactamasas. Por lo anterior y dado que en nuestro país son múltiples los reportes que demuestran el carácter de multiresistencia de cepas de *P. aeruginosa*, el presente trabajo pretende proporcionar información acerca del tipo de beta-lactamasas producidas por cepas clínicas asociadas a pacientes con FQ, mediante el uso de pruebas fenotípicas y de biología molecular; lo que contribuirá en la mejor comprensión de este mecanismo de resistencia.

MATERIAL Y MÉTODOS: Las cepas clínicas de *P. aeruginosa* que se usaron en este estudio fueron proporcionadas por el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza del IMSS. Cepas del Instituto Nacional de la Nutrición. Las cepas de FQ fueron proveídas por el Instituto Nacional de Pediatría.

DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR UTILIZANDO DISCOS DE PAPEL FILTRO (CLSI/NCCLS, 2005b). El procedimiento que se describe a continuación se realizó tanto para las cepas de referencia empleadas para llevar a cabo el control de calidad del procedimiento, así como para las cepas intrahospitalarias motivo de este estudio y de acuerdo a las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute* [CLSI]), antes conocido como el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (*National Committee for Clinical Laboratory Standards* [NCCLS]) (CLSI/NCCLS, 2005b). Para cada cepa aislada e identificada, se tocaron con un asa cuatro o cinco colonias del mismo tipo morfológico y se inocularon en un tubo con caldo Müeller- Hinton, incubándose de 2 a 4 h a 37°C hasta que apareció una leve turbidez. Lo anterior se hizo con el propósito de ajustar el inóculo de prueba, tomando como referencia el tubo 0.5 de la escala del Nefelómetro de McFarland, igualando la turbidez de los tubos problema y del Nefelómetro sobre un fondo blanco bien iluminado que presentaba una línea negra gruesa. La siembra del inóculo se hizo en cajas con 20 mL de gelosa Müeller-Hinton con 4 mm de espesor conservadas a 4°C en bolsas de plástico y selladas para evitar la deshidratación, usando un hisopo que se sumergió en la suspensión bacteriana ajustada, quitando el exceso de inóculo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna de tubo por arriba del nivel del caldo. Cada caja se sembró en tres direcciones y a un ángulo de 60°, para obtener una distribución uniforme sobre toda la superficie del agar. Las cajas inoculadas se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente para que se absorbiera el inóculo. Se colocaron los unidiscos no más de cinco en cada caja de Petri. Los discos se distribuyeron uniformemente para evitar una sobreposición de las zonas de inhibición del crecimiento. Para asegurar un contacto con la superficie, los sensidiscos se presionaron suavemente sobre la gelosa con ayuda de una pinza estéril. La selección de los discos, así como la concentración del antibiótico se hizo con base en las recomendaciones del CLSI, (CLSI/NCCLS, 2005b; CLSI/NCCLS, 2005c).

Los discos empleados fueron de la marca Becton Dickinson y se mantuvieron en bolsas selladas en refrigeración de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las placas se invirtieron e incubaron a 37°C durante 18 a 24 h.

Posteriormente se midieron los halos de inhibición en milímetros con un vernier por el fondo de la caja, los resultados se registraron y después fueron comparados con los valores señalados en la tabla 6. Los diámetros

de las zonas de inhibición de las cepas clínicas se interpretaron y se utilizaron para determinar las categorías de susceptible y resistente. Este procedimiento se repitió por triplicado obteniéndose resultados reproducibles.

Diámetros de los halos de inhibición (mm) de la prueba de susceptibilidad por el método de difusión en agar

ANTIMICROBIANOS	CONTENIDO DEL DISCO μg	RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE
AMIKACINA	30	≤ 14	15-16	≥ 17
AZLOCILINA	75	≤ 17	-	≥ 18
AZTREONAM	30	≤ 15	16-21	≥ 22
CARBENICILINA	100	≤ 13	14-16	≥ 17
CEFEPIME	30	≤ 14	15-17	≥ 18
CEFOPERAZONA	75	≤ 15	16-20	≥ 21
CEFTAZIDIMA	30	≤ 14	15-17	≥ 18
CEFTIZOXIMA	30	≤ 14	15-19	≥ 20
CEFTRIAZONE	30	≤ 13	14-21	≥ 21
CIPROFLOXACINA	5	≤ 15	16-20	≥ 21
IMIPENEM	10	≤ 13	14-15	≥ 16
LEVOFLOXACINA	5	≤ 13	14-16	≥ 17
MEROPENEM	10	≤ 13	14-15	≥ 16
MEZCLOCILINA	75	≤ 15	-	≥ 16
NETILMICINA	30	≤ 12	13-14	≥ 15
NORFLOXACINA	10	≤ 12	13-16	≥ 17
OFLOXACINA	5	≤ 12	13-15	≥ 16
PIPERACILINA	100	≤ 17	-	≥ 18
TICARCILINA	75	≤ 14	-	≥ 15
TICARCILINA/ ACIDO CLAVULÁNICO	75/10	≤ 14	15-19	≥ 20
TOBRAMICINA	10	≤ 12	13-14	≥ 15

Tomada de: CLSI/NCCLS, 2005c.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) POR EL MÉTODO DE DILUCION EN AGAR. El procedimiento que se describe a continuación se realizó tanto con la cepa de referencia empleada para llevar a cabo el control de calidad del procedimiento, como con las cepas clínicas motivo de este estudio de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (CLSI/NCCLS, 2005a). Este procedimiento se realizó exclusivamente para evaluar la actividad del imipenem, debido a que es uno de los antibióticos que se administra en los casos de infección más severos por su actividad contra cepas de *P. aeruginosa*. Lo primero que se realizó fue la preparación de las cajas conteniendo diferentes concentraciones del antibiótico. Se utilizó la sal del imipenem (Merck Sharp y Dohme), la cual se disolvió y diluyó en agua desionizada calidad inyectable. La concentración inicial de trabajo fue de 110,000

$\mu\text{g/mL}$ y a partir de ésta, se realizaron una serie de diluciones dobles en agar dando lugar a concentraciones entre $256 \mu\text{g/mL}$ y $0.0156 \mu\text{g/mL}$. Cada placa se llevó a un volumen final de 15 mL correspondiendo 1.5 mL de la dilución con 13.5 mL de gelosa Müller Hinton, considerando el mezclar suavemente para evitar la formación de burbujas y se vertió el contenido en cajas de Petri colocadas sobre una superficie plana sin desniveles. Después se realizó la preparación del inóculo, para lo cual con un asa se tocaron de cuatro o cinco colonias aisladas del mismo tipo morfológico y se inocularon en un tubo con caldo Müller-Hinton, incubándose de 2 a 4 h a 37°C hasta que apareció una leve opacidad. Lo anterior se hizo con el propósito de ajustar el inóculo de prueba, tomando como referencia el tubo 0.5 de la escala del nefelómetro de McFarland, colocando los tubos problema y del nefelómetro sobre un fondo blanco bien iluminado que presentaba una línea negra gruesa. Se realizó una dilución 1:10 de la suspensión previamente ajustada, para obtener una densidad bacteriana de 10^7 y se cargó en un replicador de Steers. En seguida se inocularon las placas que contenían las diferentes concentraciones del antibiótico, disponiendo en su sitio la base del replicador de Steers que contenía las cepas ajustadas y se inocularon una a una las cajas de Petri que contenían las diferentes concentraciones del antibiótico. Las cajas se invirtieron e incubaron a 37°C por 18 h. Finalmente, se determinó la concentración mínima que inhibió el desarrollo de cada una de las cepas, para así determinar las categorías de susceptible y de resistente. El control de calidad del procedimiento se realizó utilizando como microorganismos de referencia la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853, la cual se empleó en cada prueba, observándose la concentración del imipenem que inhibió el crecimiento.

RESULTADOS: Detección fenotípica de beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL) y metalo-beta-lactamasas (MBL), mediante pruebas de sinergismo. La detección fenotípica de beta-lactamasas se realizó empleando pruebas de sinergismo con doble disco, siguiendo las recomendaciones de la literatura consultada, así como las condiciones experimentales establecidas en proyectos previos dentro del grupo de trabajo. Fue posible detectar la presencia del fenotipo MBL en cepas con una CIM de $16 \mu\text{g/mL}$, pero no en las cepas con niveles de resistencia intermedia, CIM de $8 \mu\text{g/mL}$. Así mismo, el fenotipo ESBL sólo fue detectado en cepas con una CIM $\geq 32 \mu\text{g/mL}$. En la figura se muestran algunas de las cepas que dieron positiva las pruebas de sinergismo para IMP y CAZ. Una de las cepas que da positiva la prueba de sinergismo para MBL de forma muy evidente es la cepa correspondiente a *S. maltophilia*, cepa con los mayores niveles de CIM para IMP detectados en el cepario de trabajo.

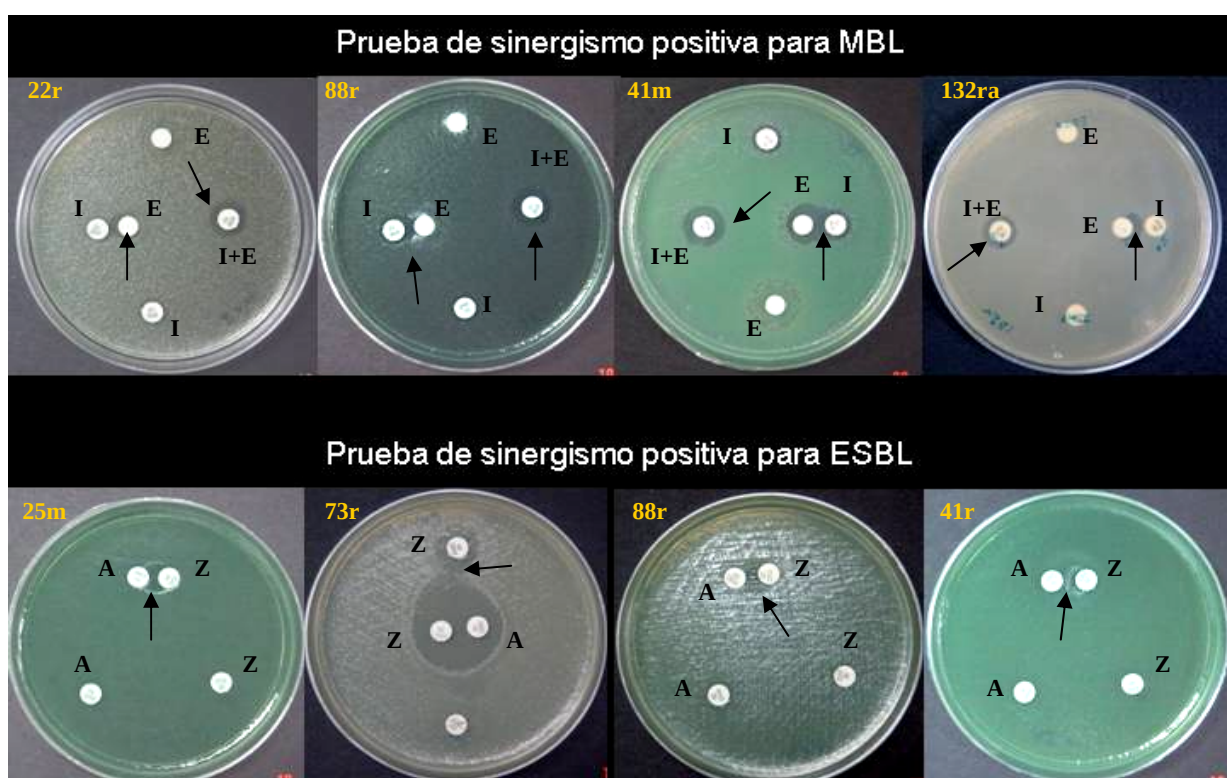


Figura. Detección fenotípica de ESBL y MBL mediante pruebas de sinergismo.; I= disco con imipenem, E= disco con EDTA; I+E= disco con imipenem adicionado de EDTA; Z= disco con ceftazidima, A=disco con ácido clavulánico. Las puntas de la flechas señalan el incremento del halo de inhibición del crecimiento bacteriano causado por la sinergia entre el antibiótico (IMP o CAZ) y el agente quelante (EDTA) o el inhibidor “suicida” (ácido clavulánico), según corresponda.

Con base en los resultados obtenidos para las pruebas fenotípicas y los datos de la CIM, se generaron 3 grupos de cepas denominados como A, B y C; cuya descripción se hace en las tablas 16-18. En el grupo A, se encuentran las cepas que presentan resistencia tanto a IMP como a CAZ en sus valores más elevados; la CIM para este grupo está en el intervalo de 64-256 ug/mL. El grupo B, está comprendido por aquellas cepas que únicamente presentan resistencia a IMP, quedando incluida la cepa de *S. maltophilia*, a diferencia de esta cepa, el resto de las cepas corresponden a *P. aeruginosa* con una CIM de 16 ug/mL. Finalmente, el grupo C quedó integrado por las cepas de *P. aeruginosa* resistentes sólo a CAZ, con valores de CIM de 32-128 ug/mL. Las cepas mostraron fenotipo de multiresistencia, con el método realizado no se logró detectar la producción de BLEE, se observó el fenómeno de sinergismo en una de las 17 cepas utilizando IMP y ácido 2-mercaptoetanol como inhibidor, lo que sugiere la presencia de MBL, sin embargo, la presencia de ESBL y MBL debe ser confirmada o descartada por métodos genotípicos. En presencia del inhibidor PaBN 10/21 mostraron una CIM sensible a cefepime, 5/21 cepas disminuyeron la CIM para gentamicina de 7-8 diluciones, 18/21 cepas mostraron sensibilidad a eritromicina, 12/21 fueron sensibles a norfloxacin. Todas las cepas incluidas en este estudio disminuyeron la CIM para al menos un sustrato de los SE. La resistencia a los 4 sustratos evaluados fue reestablecida en los ensayos sin PaBN lo que sugiere el fenómeno de multiresistencia que muestran estas cepas pueden ser resultado de la expresión de uno o mas sistemas de eflujo.

DETECCIÓN GENOTÍPICA DE MBL. Debido a que un resultado positivo en las pruebas fenotípicas no es suficiente para identificar el tipo de las beta-lactamasas, es necesario corroborar dicho resultado poniendo de manifiesto el gen que codifica para dichas enzimas. En este trabajo nos enfocamos básicamente al estudio genotípico de MBL empleando la PCR ya que en proyectos anteriores dentro del grupo de trabajo, se ha detectado la presencia de la MBL del tipo VIM (Castillo-Vera 2006, tesis de Maestría); la cual a la fecha no ha sido reportada en México por algún otro grupo de investigación. Las reacciones de PCR empleando los 4 juegos de iniciadores para cada MBL fueron realizadas en las cepas que presentaron una CIM en los intervalos de 8 hasta >256 ug/mL, quedando incluidas las cepas que dieron tanto positiva como negativa la prueba de sinergismo para MBL. Al emplear los iniciadores para los genes que codifican para *bla_{IMP}*, *bla_{SPM}* y *bla_{GIM}*, no se obtuvo algún amplificado; sin embargo con los iniciadores para *bla_{VIM}* se obtuvieron resultados positivos.

A partir de las 17 cepas en las cuales se obtuvieron amplificados con los iniciadores para *bla_{VIM}*, se seleccionaron tres cepas al azar que se especifican en la tabla siguiente, ya que presentaron una banda de tamaño similar a la cepa de referencia, para después purificar los productos de PCR y secuenciarlos.

Tabla. Amplificados obtenidos con los iniciadores para *bla_{VIM}* de 3 cepas.

Cepa	Tamaño del Producto de PCR (VIM)
71r	~500 pb
132ra	~ 550 pb
66mA	600 pb

Los fragmentos de DNA purificados se utilizaron como molde para realizar una reamplificación con los mismos oligonucleótidos, para obtener un abasto suficiente de DNA para su secuenciación. En todos los casos se obtuvo como producto final un fragmento de DNA de 500 pb, lo que podría indicar que uno de los oligonucleótidos pudiera estar hibridando bajo ciertas condiciones en más de un sitio, como en el caso de la cepa 66mA en donde inicialmente se obtuvo un fragmento de 600pb y en la segunda amplificación se obtiene el fragmento esperado de 500pb, como si se tratara de una PCR anidada.

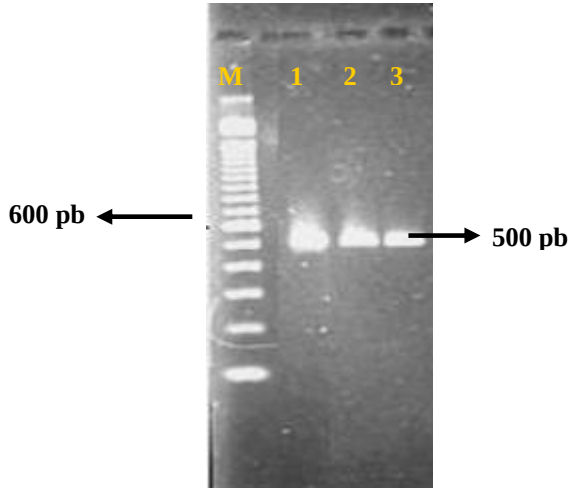


Figura. Electroferograma de los productos reamplificados y purificados del gen *bla_{VIM}*. M) marcador 100 pb; 1) 71r; 2 y 3) 132ra; 4) 66mA. En los carriles 1, 3 y 4 se observan bandas intensas del producto de purificación del tamaño deseado (500 pb). En el carril 2 la banda tenue es debido a que corresponde al remanente en la columna de purificación del producto amplificado de la cepa 132ra.

Los productos ya purificados se secuenciaron y sometieron al análisis bioinformático, obteniéndose, para las 3 cepas, los resultados mostrados en la siguiente figura.

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF116550.1	Acinetobacter baumannii class I integron metallo-beta-lactamase VIM	859	859	98%	0.0	99%
DQ835309.1	Acinetobacter baumannii unnamed integron metallo-beta-lactamase V	859	859	98%	0.0	99%
AY605049.2	Pseudomonas aeruginosa M5109 class I integron VIM-11 (blaVIM-11)	859	859	98%	0.0	99%
AJ628983.2	Pseudomonas aeruginosa class I integron, int11 gene (partial), blaVIM	859	859	98%	0.0	99%
DQ022682.1	Acinetobacter haemolyticus metallo-beta-lactamase VIM-11 gene, cor	859	859	98%	0.0	99%
EF614235.1	Pseudomonas aeruginosa plasmid pV2GY3 class I integron insertion s	856	856	98%	0.0	99%
EF577409.1	Pseudomonas putida strain PP-SD1 class I integron Int11 (int11), AacF	856	856	98%	0.0	99%
EF577406.1	Pseudomonas aeruginosa strain PA-SL1 class I integron Int11 (int11),	856	856	98%	0.0	99%
EF522838.1	Pseudomonas putida class I integron integrase gene, partial cds, and	856	856	98%	0.0	99%
EF207719.1	Pseudomonas aeruginosa strain YMC 05/5/2030 class I integron DNA	856	856	98%	0.0	99%

resultados de la secuenciación de las cepas 71r, 132ra y 66mA, las cuales presentaron un 99% de identidad para la MBL tipo VIM-11, como se muestra en el recuadro naranja.

Con los resultados anteriores se encontró un 99% identidad de los productos amplificados con *bla_{VIM}*-(2, 3, 6, 8, 9, 10 y 11). Una vez editadas las secuencias de los productos de amplificación, y realizado el alineamiento de las mismas, junto con las secuencias de la cepa 208 control positivo y las secuencias obtenidas del servidor NCBI para las variantes *bla_{VIM}*-(1-11), (ver códigos de acceso en el apartado 5.11); se identificaron las mutaciones señaladas por Pasteran *et al.* (2005), que permiten la diferenciación entre las variantes antes mencionadas; siendo así que la presencia de C por T en la posición 416 permite descartar la variante *bla_{VIM}*-9, y el cambio de

G por A en la posición 443, diferencia nuestra secuencias de *bla*_{VIM-1, 2, 4, 5, 9 y 10}. Por lo anterior, se observa que las secuencias de las cepas 71r, 132ra y 66mA tienen una alta identidad con la secuencia de los genes *bla*_{VIM-3}, *bla*_{VIM-6} *bla*_{VIM-11}

Streptococcus pyogenes

En los últimos años se han incrementado los reportes de infecciones producidas por *Streptococcus pyogenes* (GAS), observándose una elevación en el índice de mortalidad. Considerando que la proteína M representa el principal antígeno de virulencia y que ciertos serotipos se han asociado a algunas enfermedades, las cuales se presentan con grados tan amplios en cuanto a gravedad. Diferenciar el daño que pueden producir aislamientos de gas con diferentes características de virulencia, en diversos tejidos celulares, se hace necesario para conocer cuales características de virulencia, entre las que destaca el tipo de proteína M; son las responsables de la capacidad de GAS para sobrevivir, invadir y multiplicarse en ciertas células del cuerpo humano.

Pruebas de susceptibilidad.- La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias, mostraron que la totalidad de las cepas (100%) fueron sensibles a la penicilina y a la clindamicina, mientras que 7 cepas (9.2%), mostraron ser resistentes a la eritromicina a la concentración de 2 y 4 µg/mL.

Determinación de fenotipos de resistencia.- Se determinó que los 7 aislados que mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria mostraron resistencia a eritomicina presentaron el fenotipo M. Ninguna de las cepas mostraron algún otro de los fenotipos determinados (MSLB RC: resistencia constitutiva a todos los macrólidos o MSLB RI: resistencia inducida por la eritromicina hacia la clindamicina).

Detección de genes *erm* (TR y B) y *mef* A, mediante la técnica de PCR en los aislamientos de GAS. Se generó mediante la PCR, un amplificado de aproximadamente 450 pb, correspondiente al gen *mef* A (fig. 3), dicho amplificado estuvo presente en los 7 aislados que mediante concentración mínima inhibitoria y prueba del doble disco mostraron resistencia a eritromicina. Por otro lado, ninguna de las cepas amplificó en la búsqueda de los genes *erm* (a y b), correspondiendo en forma directa con los resultados arrojados por la determinación de los fenotipos de resistencia.

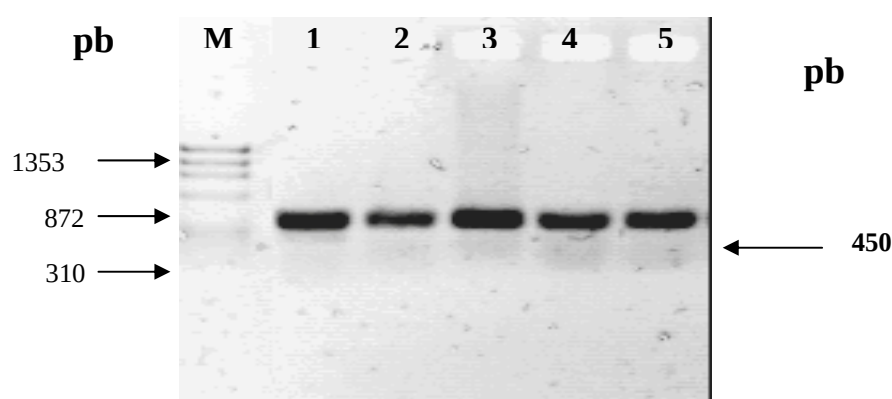


Figura. Amplificación del gen *mef* A de GAS. M; marcador de peso molecular (DNA del fago Φ 174), 1-5; cepas de GAS en estudio que presentaron el gen.

IMPACTO

El impacto en el sector de bienes y servicios se refleja por el hecho de que las cepas que se incluyen en este estudio corresponden a Instituciones del Sector Salud del país y en la manera que contribuimos con datos referentes a las características particulares de las cepas es en la medida que se pueden aplicar medidas correctivas para evitar las infecciones.

El impacto en el sector social es por consecuencia, ya que el tener un sector salud mejor documentado permite brindar una mejor calidad de servicio y una mejor calidad de vida de los ciudadanos.

El beneficio educativo se refleja en completar los programas académicos de estudiantes que cursan los niveles de licenciatura, de maestría y de doctorado.