



En este número:

Artículo de investigación

La importancia de los aspectos psicológicos en oncología pediátrica

Artículo de investigación

Estudio de la resistencia molecular contra Vancomicina en cepas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas de ojo humano

Artículo

Cómo acercar a las personas sordas a la lectura. Sala de Silentes

Artículo

Aplicación actual de la bioética en investigación clínica (segunda parte)

Artículo

Obesidad infantil y resistencia a la insulina (segunda parte)



Estudio de la resistencia molecular contra Vancomicina en cepas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas de ojo humano

Arteaga-Hernández G¹, Cancino-Díaz JC², Betanzos-Cabrera G¹.

¹Área Académica de Nutrición, Instituto de Ciencias de la Salud, UAEH.

²Depto. de Microbiología Gral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus epidermidis es una bacteria Gram (+), coagulasa negativa (a diferencia de *Staphylococcus aureus*)^{1,2}. Aunque normalmente es parte de la flora normal de la piel y otras mucosas, suele causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos o pacientes cateterizados en hospitales, siendo entonces una bacteria oportunista y uno de los principales agentes etiológicos de infecciones nosocomiales^{3,4}.

La prevalencia de cepas de *S. aureus* como de estafilococos coagulasa negativa resistentes a multidrogas, se está incrementando en todo el mundo; por lo que es necesario encontrar nuevos antibióticos efectivos. A principios de los años 70's, entre el 70 y el 85% de aislados de *S. aureus* y *S. epidermidis* fueron resistentes a penicilina y meticilina^{4,5}, por lo que el uso de vancomicina se ha incrementado dramáticamente en los últimos 20 años^{6,7}. La vancomicina, que se descubrió en 1955, es un glicopéptido (Fig. 1) producido por el actinomiceto *Streptomyces orientalis*, se introdujo clínicamente en 1958 para el tratamiento de bacterias Gram (+) y es uno de los antibióticos de elección para el tratamiento de enfermedades infecciosas por *Staphylococcus* spp como la neumonía y la endocarditis⁸.

El mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, mediante la fijación de la vancomicina a la porción D alanyl-D-alanina del carboxilo libre terminal de las unidades precursoras de la pared celular (Fig. 2)⁹.

La Organización Panamericana de la Salud ha señalado reiteradamente que el mal uso de antibióticos en el tratamiento de agentes infecciosos cada vez provoca la resistencia de los mismos⁸. Aparentemente, este mal uso, también ha provocado un notorio incremento en la resistencia de *S. aureus* y *S. epidermidis* ante diversos antibióticos^{3,5,9,7,10,11}.

Figura 1. Estructura de Vancomicina. El antibiótico pertenece a la familia de los glicopéptidos, siendo un derivado tricíclico de ellos.

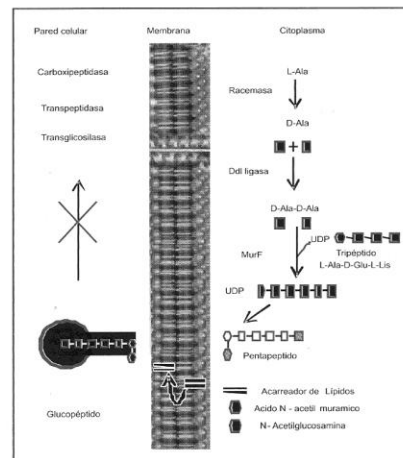
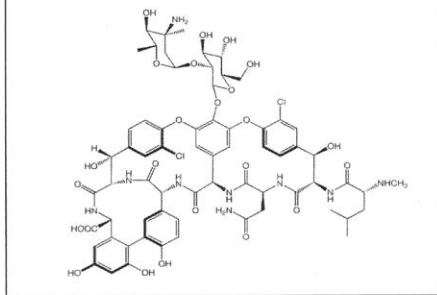


Figura 2. Biosíntesis de Peptidoglicana y mecanismo de acción de Vancomicina. Unión del antibiótico al C-terminal del dipeptido D-Ala-D-Ala de los precursores de la peptidoglicana inhibe las reacciones catalizadas por las transglucosilasas, transpeptidasas y la D-D carboxipeptidasas. Abreviaciones: DdI, D-Ala-D-Ala; MurF, una proteína de sintetasa; UDP uracil de fosfato. Tomada de Courvalin, et al., 2006.

OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tiene como objetivo determinar y explorar mecanismos de resistencia a vancomicina de cepas de *S. epidermidis* aisladas en infecciones de ojo humano.

MATERIAL Y MÉTODO

Muestras

El ensayo experimental se realizó con 60 cepas de *S. epidermidis* aisladas y bioquímicamente caracterizadas de infecciones oculares obtenidas del Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana", en la Ciudad de México, a través del Dr. Juan Carlos Cancino Díaz del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. El trabajo fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Politécnico Nacional.

Propagación y mantenimiento de cepas

Las cepas fueron propagadas y mantenidas en medio de cultivo sólido o líquido de Infusión Cerebro Corazón (BHI). Los cultivos se incubaron a 37°C por 12-48 h.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de vancomicina se realizó tanto en placa como en tubo. Para ello, cultivos de *S. epidermidis* fueron crecidos en medio BHI hasta alcanzar la fase logarítmica (± 0.5 DO). Para el caso de ensayo en placa se sembraron con un replicador en cajas de Petri con medio BHI conteniendo diferentes concentraciones de vancomicina (2, 4, 8, 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$); las cajas se incubaron a 37°C haciendo lecturas de crecimiento a 24 y 48 h. Para el caso en tubo, se preparó una serie de tubos con 5 mL de medio líquido BHI con las mismas concentraciones probadas en placa; para este caso alícuotas de 10 μL de cultivo en fase log se sembraron en cada tubo y posteriormente se agitaron a 100 rpm a 37°C. Se tomaron lecturas a 24 y 48 h. Se clasificó la resistencia de las cepas de acuerdo con el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico de los Estados Unidos (NCCLS por sus siglas en inglés), donde MIC de vancomicina = 4 $\mu\text{g/mL}$ es sensible, MIC entre 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ es intermedia y aquellas con MIC = 32 $\mu\text{g/mL}$ son resistentes⁷.

Detección molecular de genes de resistencia por PCR múltiple

A fin de amplificar una región de los seis tipos del gen *Van* de resistencia a vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*) se realizaron reacciones de PCR múltiple según Depardieu¹², para cada una de las cepas. Los productos de reacción de PCR fueron separados en electroforesis en gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. Asimismo, otro par de iniciadores dentro de la misma reacción se incluyeron para la amplificación de una región específica de *S. epidermidis*.

Determinación de Biopelícula por el Método de microplaca

El ensayo de la formación de biopelícula se realizó con

modificaciones según Christensen¹³. Las cepas de *S. epidermidis* se cultivaron en 5 mL de BHI por 24 h a 37°C. Cuando se requirió, se agregó NaCl a una concentración final de 5% para inducir la formación de biopelícula. Posteriormente, se realizó una dilución de 1:200 con medio TBS fresco y se colocaron 200 μL en un pozo de una microplaca de 96 pozos (el ensayo se realizó por cuadruplicado para cada cepa), la placa se incubó a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con regulador fosfato salina (PBS) 1X al final de los lavados se agregó 200 μL de safranina al 0.1% y se dejó reposar por 5 min. Se retiró la safranina por decantación y se lavó dos veces con PBS 1X, posteriormente se midió absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA, empleando como blanco medio de cultivo sin crecimiento, valores = 0.12 DO fueron considerados positivos para la formación de biopelícula.

RESULTADOS

De las 60 cepas analizadas, 4 (1986, 1654, 1843 y 983) tuvieron una MIC de vancomicina de 16 $\mu\text{g/mL}$, por lo que de acuerdo al NCCLS son considerados como cepas de resistencia intermedia.

Al hacer el escrutinio molecular de todas las cepas por PCR múltiple, no se logró detectar la presencia de ningún gen *Van*, sólo se logró obtener un amplificado de 125 pb en todas las cepas, que corresponde al tamaño esperado para identificar a *S. epidermidis*.

Las cepas con resistencia intermedia fueron analizadas para determinar la formación de la biopelícula, encontrándose que las cepas 1986, 1654 y 1668 fueron productoras, lo que puede explicar en parte la resistencia al antibiótico (Fig. 3).

Interesantemente, el crecimiento de las cepas 1986 y 1654 en NaCl 8% (inductor de formación de biopelícula) incrementó la MIC a 32 $\mu\text{g/mL}$, por lo que según al NCCLS pasaron de resistencia intermedia a altamente resistentes. Por el contrario, la cepa 983 fue negativa a esta prueba, lo que sugiere que otros mecanismos de resistencia deben estar presentes.

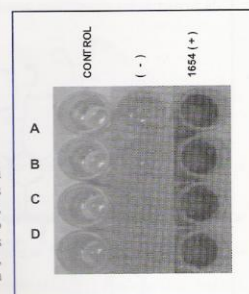


Figura 4. Formación de biopelícula en microplaca. La cepa 1654 es positiva para la formación de biopelícula, nótese la intensidad en el color rojo (aquí en gris oscuro, por las características de la impresión), comparada con una cepa negativa en los pozos centrales.

DISCUSIÓN

S. epidermidis ha sido la bacteria más frecuentemente aislada de infecciones oculares^{14,15}, debido a que en los últimos años se ha incrementado notablemente la resistencia de estafilococos contra vancomicina⁶. En el presente trabajo nos enfocamos a estudiar la resistencia de cepas aisladas de infecciones oculares contra vancomicina. Los datos obtenidos muestran que en placa como en tubo, el 6.66 % de las cepas aisladas tuvieron resistencia intermedia, lo cual es un porcentaje similar a lo reportado⁷. Sin embargo, no se logró demostrar por PCR múltiple la amplificación de genes de resistencia *Van*; sólo hubo amplificación en todas las cepas de una banda de 125 pb que identifica la especie; lo que comprueba que las cepas aisladas son *S. epidermidis* (Figura 3).

Sin embargo, al demostrar mecanismos de resistencia contra el antibiótico por la capacidad de desarrollar biopelícula, las cepas 1986, 1654 y 1843 fueron productoras de biopelícula, lo que puede explicar en parte la resistencia¹⁶, mientras que la cepa 983 fue negativa a esta prueba. Por lo que no se descarta la

posibilidad que otros mecanismos puedan contribuir a la resistencia a vancomicina, tales como la presencia de genes de resistencia a vancomicina codificada por plásmidos¹⁷ o mecanismo de flujo capaz de expulsar al antimicrobiano de la célula bacteriana¹⁸. *S. aureus* por ejemplo, tiene un mecanismo de flujo activo que contribuye sustancialmente al fenotipo de resistencia¹⁰.

En conclusión nosotros reportamos cepas de *S. epidermidis* con resistencia intermedia a vancomicina en infecciones oculares. De igual forma se encontró asociación entre la resistencia y capacidad de formación de biopelícula, como un mecanismo de resistencia contra el antibiótico. Los resultados sugieren tomar en cuenta el incremento de la resistencia de *S. epidermidis* en el tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria y motiva a seguir explorando más mecanismos de resistencia.

Agradecimiento. Este trabajo fue parcialmente apoyado por el CONACYT (46537), PAI 2006 y AMMFEN.

BIBLIOGRAFÍA

1. O'gara J, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. J. Med Microbiol 2001;50:582-587.
2. Srinivasan A, Dick J, Perl T. *Vancomycin Resistance in Staphylococci*. Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev 2002;15 (3):4430-4438.
3. Shalit I, Berger SA, Gorea A, Frimerman H. *Widespread quinolone resistance among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in a general hospital*. Antimicrob Agents Ch 1989; 33:593-594.
4. Chamber, HF. *The changing epidemiology of Staphylococcus aureus?* Emerg Infect Dis 2001;7:178-182.
5. Isaacs RD, Kunkle PJ, Cohen RL, Smith JW. *Ciprofloxacin resistance in epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Lancet 1998;ii:843.
6. Courvalin, P. *Vancomycin resistance in Gram-Positive Cocci*. Clin Infect Dis 2006;42 (1): 25-34.
7. Juárez V. M., Reyes LM, Cancino DM, Muñoz SS, Rodríguez MS, Zavala DF, Henández RC. Isolation, Vancomycin resistance and biofilm production of *Staphylococcus epidermidis* from patients with conjunctivitis, corneal ulcers, and endophthalmitis. Rev Latinoamericana de Microbiología 2006. 48(3-4):238-246.
8. OPS. Organización Panamericana de Salud. 2000. *Farmacorresistencia a los Antimicrobianos: Panorama regional, datos por microorganismo y país*. http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/antimicrob_index.htm#fuente%20de%20datos Fecha de acceso: 05/11/2008
9. Hans-Jörg, L, Schmidt M, Fuchs E, Reischl U, Niller HH, Lehn N. *In vitro* activities of six quinolones and mechanisms of resistance in staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci. Antimicrob Agents Ch 2001. 45:1553-1557.
10. Betanzos-Cabrera G, Juárez-Verdages, M, González-Gonzalez G, Cancino-Diaz M, Cancino-Diaz J. *Gatifloxacin-, moxifloxacin-, and balofloxacin-resistance due to mutations in the gyrA and parC genes of Staphylococcus epidermidis strains isolated from patients with endophthalmitis, corneal ulcers and conjunctivitis*. Ophthal Res 2008. En prensa.
11. Yamada M, Yoshida J, Hatou S, Yoshida T, Minagawa Y. *Mutations in the quinolone resistance determining region in Staphylococcus epidermidis recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones*. Br J Ophthalmol 2008. 92:848-851.
12. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. *Detection of the van Alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at species level by Multiplex PCR*. J Clin Microbiol 2004. 42 (12):5857-5860.
13. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. *Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces*. Infect Immun 1982. 37:318-326
14. Fisch A, Salvaneet A, Prazuck T, Forestier F, Gerbaud L, Coscas G, Lafaix C. *Epidemiology of infective endophthalmitis in France. The French Collaborative Study Group on Endophthalmitis*. Lancet. 1991. 338:1373-1376.
15. Benz MS, Scott IU, Flynn HW, Jr Unonius N, Miller D. *Endophthalmitis isolates and antibiotic sensitivities: a 6-year review of culture-proven cases*. Am J Ophthalmol 2004. 37:38-42.
16. Moreno G, Ruiz E. *Staphylococcus epidermidis* formador de biofilm en blefarconjuntivitis. Rev. Med Hosp Gen Mex 2007. 70(1):24-29.
17. Avsaroglu MD, Helmuth R, Junker E, Hertwig S, Schroeter A, Akcelik M, Bozoglu F, Guerra B. 2007. *Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by qnrS1 in Salmonella enterica serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin*. J Antimicrob Chemot 2007. 60:1146-1150.
18. Biedenbach DJ, Jone RN. *Fluoroquinolone-resistant Haemophilus influenzae: frequency of occurrence and analysis of confirmed strains in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North and Latin America)*. Dign Microbiol Infect Dis 2000. 36:255-259.
19. Schaefer S. *Methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus resistant to quinolones*. J Clin Microbiol 1989. 27:335-336