

# EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS CON RESISTENCIA A MÚLTIPLES DROGAS PROVENIENTES DE AISLADOS CLÍNICOS EN AMBIENTES HOSPITALARIOS

Carranza López Claudia Teresa (1), Deveze Álvarez Martha Alicia (1), Ramírez Morales Marco Antonio (1), Zapata Morales Juan Ramón (1) Mendoza Macías Claudia Leticia (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato] | [claudia-0094@hotmail.com]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [cl.mendoza@ugto.mx]

## Resumen

Con la aparición de los antibióticos se esperaba que las enfermedades causadas por microorganismos desaparecieran, su prometedor inicio se vio pronto amenazado por la rápida aparición de resistencias, debido al uso indiscriminado de antibióticos. El problema de la resistencia antimicrobiana aumenta año con año. La incidencia de microorganismos multiresistentes (MMR) está en aumento, tanto en el medio comunitario, como en el hospitalario. Para hacer frente a este problema, se están buscando nuevas moléculas que sean capaces de revertir la resistencia. En el presente trabajo se evaluaron los perfiles de susceptibilidad de aislados clínicos y se determinó la CMI a cada uno de los aislados utilizando ciprofloxacino en diferentes concentraciones, obteniéndose su caracterización fenotípica en términos de resistencia para su posterior utilización en la búsqueda de nuevos inhibidores de bombas de eflujo asociadas a la resistencia a fármacos.

## Abstract

With the appearance of antibiotics it was expected that diseases caused by microorganisms would disappear, its promising beginning was soon threatened by the fast appearance of resistances, due to the indiscriminate use of antibiotics. The problem of antimicrobial resistance increases year by year. The incidence of multiresistant microorganisms is increasing, both in community and in hospital environment. To deal with this problem, research on new molecules that can reverse the resistance is in progress. In the present work, the susceptibility profiles of clinical isolates were evaluated and the MIC was determined for each of the isolates using ciprofloxacin at different concentrations obtaining the phenotypic characterization in terms of resistance that allow the search of new efflux pump inhibitors related to drug resistance.

### Palabras Clave

Resistencia antimicrobiana; Cepas multiresistentes; infecciones nosocomiales; bombas de eflujo

## INTRODUCCIÓN

### Infecciones nosocomiales y Resistencia bacteriana

La aparición de los antibióticos revolucionó la Medicina al facilitar el tratamiento de la patología infecciosa. Su prometedor inicio se vio pronto amenazado por la rápida aparición de resistencias debido principalmente a su amplia y, en ocasiones, inadecuada utilización. En el ámbito hospitalario, las infecciones contraídas durante la estancia del paciente y/o en el personal del establecimiento son consideradas un problema de salud pública. [1] En estos casos la mayor complicación se presenta cuando el microorganismo responsable no responde a los tratamientos antimicrobianos disponibles, fenómeno que se conoce como resistencia bacteriana.

### Resistencia bacteriana

La resistencia a múltiples fármacos (MDR) es un problema de salud pública que se observa a nivel mundial ligado al uso de los antibióticos. Durante los últimos veinte años el uso indiscriminado de antibióticos ha hecho que las bacterias a través de mecanismos bioquímicos, genéticos-moleculares y celulares desarrollen estrategias intrínsecas y adquiridas, que les permiten evadir con efectividad la acción de estos compuestos. [2]

- *Resistencia intrínseca y resistencia adquirida*

La resistencia intrínseca es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todas las bacterias Gram negativas son resistentes a la vancomicina, y esta situación no es variable. La resistencia adquirida es variable y es obtenida por mutaciones en el DNA y transmisión de información genética de una bacteria a otra a través de plásmidos. [3]

#### Mecanismos de resistencia

- *Inactivación enzimática.*

El principal mecanismo es la hidrólisis, como sucede con las betalactamasas y los antibióticos betalactámicos, pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos. [3]

- *Modificaciones en el sitio blanco*

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se debería unir a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas. [4]

- *Alteraciones de las membranas bacterianas*

Las bacterias pueden generar cambios en la permeabilidad de la membrana, principalmente, por porinas, proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico. [5]

- *Bombas de eflujo*

Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas. [5]

### Alternativas terapéuticas para bacterias multiresistentes

Debido a la cada vez más amplia distribución de aislados multiresistentes y con el objetivo de contar con alternativas terapéuticas más eficaces se han diseñado estrategias como la síntesis de nuevos antibióticos, búsqueda de compuestos inhibidores de bombas de eflujo y/o eliminadores de plásmidos. [6] Para la evaluación de nuevos compuestos es imprescindible contar con modelos

bacterianos aislados clínicos caracterizados en su resistencia a los fármacos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivos bacterianos

Se obtuvieron aislados clínicos del Hospital de Alta Especialidad Bajío: *Escherichia coli* 135, *Escherichia coli* 291, *Pseudomonas aeruginosa* 255, *Pseudomonas aeruginosa* 54, *Staphylococcus aureus* 107, *Staphylococcus aureus* 176, *Enterococcus faecalis* 24 y *Enterococcus faecalis* 40. Se cultivaron en placas de agar sangre (BD) a 36°C por 18 h. Se almacenaron a -70°C con glicerol al 10% en medio Luria Bertani (LB).

### Evaluación de Susceptibilidad por Técnica de Kirby-Bauer

A partir de colonias jóvenes obtenidas en una placa de agar sangre con 18 horas de crecimiento, se preparó suspensión bacteriana en solución salina al 0.9% a una D.O.<sub>630nm</sub> de 0.9, con la que se inocularon placas de agar Muller-Hinton (MH) y se colocan sensibilizadores (BBL) cuya selección se realizó acorde al microorganismo a evaluar y las Tablas 2A-1 a 2J-1 del documento M100 del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* [7]; las placas se incubaron por 18 horas, se midió el halo de inhibición formado y se interpretó la respuesta al fármaco de acuerdo al documento M100 del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* [7]. Los resultados de esta metodología se compararon con los perfiles obtenidos de origen en el HRAEB mediante la técnica de microdilución en caldo con el equipo automatizado VersaTREK Sensititre ARIS 2X (Thermo Scientific).

### Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se partió de cultivos de 18 horas de incubación de las bacterias a evaluar. Se empleó la técnica de microdilución en placa de 96 pozos con caldo MH

(BBL) acorde a la metodología del CLSI [7] y se evaluaron diluciones dobles seriadas para los antibióticos tetraciclina (SIGMA) y ciprofloxacino (SIGMA) para obtener concentraciones de 19.5 µg/mL a 1250 µg/mL y 0.125 µg/mL a 16 µg/mL, respectivamente. La CMI fue definida como la menor concentración que inhibe totalmente el crecimiento bacteriano después de 18 horas de incubación a 37°C a 180 rpm, de acuerdo al documento M100 del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* [7].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron ocho aislados clínicos bacterianos del HRAEB procedentes de muestras biológicas diversas prevaleciendo los urocultivos, como se muestra en la Tabla 1. Para evaluar el perfil de susceptibilidad a antibióticos de cada aislado, se realizó un antibiograma, utilizando la técnica de Kirby-Bauer (KB), los resultados se muestran en la Tabla 2. Algunos antibióticos no se evaluaron en todos los aislados, como el caso de los macrólidos en los Gram negativos, ya que este grupo de antibióticos son hidrofóbicos y no son capaces de atravesar la membrana externa de estas bacterias, por ello presentan resistencia natural a este grupo de fármacos. [7]

A partir de los datos obtenidos en el HRAEB por la técnica de microdilución en caldo (Imagen 1) y los obtenidos en el presente estudio (Imagen 2), se calculó el porcentaje de antibióticos resistentes en los aislados y aquellos del mismo género y especie con el menor porcentaje se atribuyó el fenotipo sensible y los que presentaron mayor porcentaje como resistentes. Los aislados con fenotipo sensible resultaron EC-291, SA-107, PA-54 y EF-24 mientras que EC-135, SA-176, PA-255, EF-142 resultaron resistentes. Solo en el caso de *P. aeruginosa*, los perfiles de resistencia obtenidos discreparon entre los dos métodos evaluados, lo que puede atribuirse al número de antibióticos evaluados por cada técnica (18 para microdilución y 7 para KB; específicamente la técnica de KB no se probaron los carbapenémicos ni cefalosporinas, para los cuales el cultivo de *P. aeruginosa* 54 mostró sensibilidad en el equipo automatizado y a los cuales *P. aeruginosa* 255 presentó resistencia, el único antibiótico al que presentó sensibilidad de

los probados en el equipo automatizado fue amikacina, el cual se probó para KB.

### Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para contar con modelos bacterianos sensibles y resistentes aislados clínicos caracterizados en su respuesta a antibióticos y que permitan la búsqueda de inhibidores de bombas de eflujo asociados a resistencia bacteriana, se evaluó la CMI a tetraciclina y ciprofloxacino. En la Tabla 3 se muestran los resultados, encontrándose diferencias en las CMI entre los aislados sensibles y resistentes como se esperaba. En cuanto a la respuesta a la tetraciclina solo fueron evaluados los cultivos bacterianos de *E. coli*, obteniéndose en EC291 una CMI de 78 µg/mL y para EC135 fue de 156 µg/mL, siendo ambas resistentes a tetraciclina.

### CONCLUSIONES

Con la técnica de Kirby-Bauer se confirmaron los perfiles obtenidos por el equipo automatizado, con la excepción de *P. aeruginosa* que se observaron diferencias, esto posiblemente a que no se probaron el mismo número de antibióticos para cada técnica.

Con las concentraciones mínimas inhibitorias determinadas de los aislados de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*, para ciprofloxacino y para tetraciclina en *E. coli*, se podrá evaluar nuevas moléculas que sean capaces de revertir la resistencia y lograr una disminución en las CMI obtenidas en este trabajo.

### AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado por la beca recibida para la realización de este trabajo. A Arturo Reyes Gualito por su apoyo técnico en la realización de los experimentos.

### REFERENCIAS

[1] Benenson AS. Control of communicable diseases manual, 16th edition. Washington, American Public Health Association, 1995.

[2] Linares JF, Martínez JL. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 23: 86-93.

[3] Vignoli R, Seija V. (2008). Temas de Bacteriología y Micología Médica. Oficina del libro FEFMUR. 650-652.

[4] Cavaco LM, Frimodt-Moller N, Hasman H, Guardabassi L, Nielsen L, Aarestrup FM. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microb Drug Resist*. 2008;14:163-9.

[5] Vila J, Martí S, Sanchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1210-5.

[6] Barcelona, L; Marin, M y Stambouljan, D. Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas: Amoxicilina-sulbactam. *Medicina (B. Aires)* [online]. 2008, vol.68, n.1, pp. 65-74 .

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25.

Tabla 1: Aislados clínicos de cultivos bacterianos

Género y especie	Código de identificación	Origen
<i>Escherichia coli</i>	EC-291	Urocultivo
<i>Escherichia coli</i>	EC-135	Urocultivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA-54	Aspirado bronquial
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA-255	Urocultivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA-107	Expectoración
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA-176	Secreción de herida
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF-24	Absceso retroperitoneal
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF-142	Urocultivo

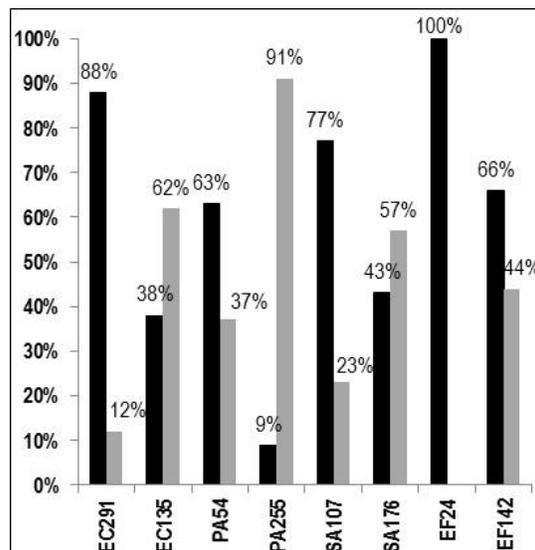
**Tabla 2. Perfiles de susceptibilidad por técnica de Kirby-Bauer**

Antibiótico	EC-291	EC-135	PA-54	PA-255	SA-107	SA-176	EF-24	EF-142
Ciprofloxacino	I	R	R	R	S	R	S	R
Levofloxacino	S	R	R	R	S	R	S	R
Norfloxacino	S	R	R	R	S	R	S	R
Gatifloxacino	S	R	R	R	S	R	S	R
Ofloxacino	ND	ND	R	R	S	R	ND	ND
Ácido nalidíxico	S	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tetraciclina	R	R	ND	ND	S	S	S	S
Doxiciclina	S	S	ND	ND	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	S	ND	ND	S	S	S	S
Ampicilina Sulbactam	S	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gentamicina	S	R	R	R	S	S	ND	ND
Amikacina	I	I	R	S	ND	ND	ND	ND
Eritromicina	ND	ND	ND	ND	R	R	S	R
Clindamicina	ND	ND	ND	ND	S	R	ND	ND
Oxacilina	ND	ND	ND	ND	R	S	ND	ND
Penicilina	ND	ND	ND	ND	R	R	S	R
Trimetoprim Sulfametoxazol	ND	ND	ND	ND	S	S	ND	ND

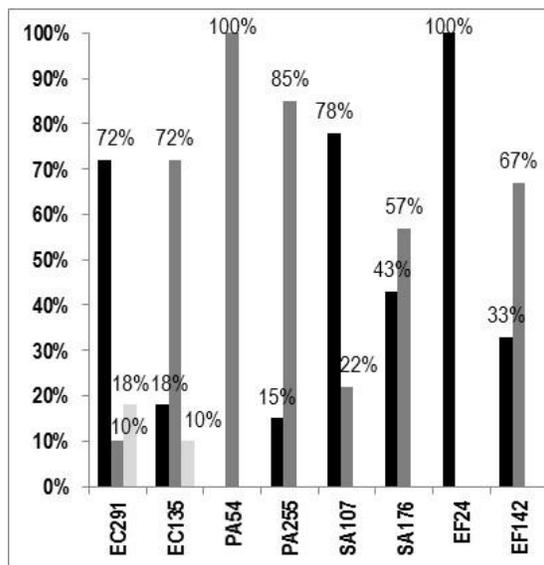
I, Intermedio; S, Sensible; R, Resistente; ND, no determinado.

**Tabla 3: Concentración mínima inhibitoria para ciprofloxacino**

Bacteria	CMI(µg/mL)	Interpretación
PA-54	32	Resistente
PA-255	16	Resistente
EF-24	1	Sensible
EF-142	>32	Resistente



**Imagen 1: Fenotipo de resistencias por equipo automatizado. Porcentaje de aislados sensible (barras negras); resistentes (barras gris oscuro) e intermedios (barras gris claro).**



**Imagen 2: Fenotipo de resistencias por técnica de Kirby-Bauer. Porcentaje de aislados sensible (barras negras); resistentes (barras gris oscuro) e intermedios (barras gris claro).**