

Determination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* community (SARM-com) in two hospitals in Guatemala

Abstract

The objective of this study was to determine the presence of strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community (MRSA-com) in isolates from skin infections of patients from Hospital Roosevelt and National Hospital Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala.

To do this we conducted a descriptive exploratory study which consisted of a sampling period of 12 weeks in the microbiology laboratory from Hospital Roosevelt and National Hospital Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala. Strains were collected the following criteria: to have been identified as *S. aureus*, submitted all beta-lactamics resistance by means of the resistance to oxacillin and cefoxitin according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria and variable resistance to macrolides and lincosamides. For the study we selected, strains isolated from skin and soft tissues of patients with less than 48 hours of hospitalization. The selected strains as suspicious were reseeded and stored for later shipment to the Reference Laboratory Gram Positive Cocáceas Public Health Institute of Chile for a study of phenotypic and genotypic characterization of strains for the *mecA* gene, *femA* and *Pvl*.

During the 12 weeks of sampling in the two national hospitals, we obtained 12 strains of MRSA-com suspicious from Roosevelt Hospital only, which were sent for typing. Of these, four were reported as contaminated and the remaining eight were analyzed for the identification of genes: *mecA* and *Pvl*. It was observed that the total strains presented the *mecA* gene and only two *Pvl* gene.

It was demonstrated the existence of strains MRSA-com producing *Pvl* gene in two isolates from discharge of patients from Hospital Roosevelt of Guatemala, this finding highlights the need for further studies to establish the magnitude of the health problem that represents to the country to that health professionals properly guide antimicrobial therapy in cases where there are associated risk factors.

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community (MRSA-com); beta-lactamics resistance; *mecA* and *Pvl* genes.

Introducción

A partir de 1967 diversos autores han determinado una alta incidencia de infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina –SARM–, especialmente de origen nosocomial, lo cual implica un aumento en la morbilidad y mortalidad a nivel hospitalario. Desde 1997, ha emergido el SARM de origen comunitario, denominado SARM-com, para diferenciarlo del hospitalario SARM-hos. Durante la última década, varios países, incluidos los países de América Latina, Canadá y EEUU notificaron brotes de cepas SARM-com altamente virulentas. Genéticamente, estas cepas de la comunidad difieren de las que se asocian a nivel hospitalario en que a menudo contienen los genes que codifican la toxina Pantón Valentine Leucocidina (*pvl*), además presentan un casete cromosómico tipo *mec* (*SCCmec*) y los alelos IV ó V. SARM-com causa principalmente infecciones de piel y tejidos blandos, pero también se ha asociado con enfermedades más severas, como la neumonía necrotizante (Sosa e Hincapie, 2007; Fang, 2008; Van de Griend, 2009).

En Guatemala no existen estudios previos de caracterización genotípica de las cepas de SARM-com, por lo cual la determinación de dicha cepa a través de un estudio exploratorio, es útil para establecer la existencia de la problemática en el país.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio exploratorio de tipo descriptivo el cual consistió en un muestreo de 12 semanas en el laboratorio de microbiología del hospital Roosevelt y del hospital nacional Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala. En tales laboratorios se realiza de rutina una identificación fenotípica de bacterias aisladas de muestras biológicas incluyendo susceptibilidad antimicrobiana a través de la determinación de la susceptibilidad antibiótica por medio de dispositivos automatizados (H. Roosevelt) y por el método de difusión de Kirby-Bauer (H. Nac. Hno. Pedro de Bethancourt), de acuerdo con los estándares del CLSI.

A partir de las boletas de solicitud de análisis y de resultados, fueron seleccionadas las cepas que cumplieran con los siguientes criterios: haber sido identificadas como *S. aureus*, que presentaran resistencia a todos los betalactámicos, por medio de la resistencia a oxacilina y cefoxitin, así como resistencia variable a macrólidos (eritromicina) y lincosamidas (clindamicina). Dichas cepas fueron almacenadas a una temperatura de 2 a 4°C en las cajas madre con agar manitol sal o agar sangre, selladas con Parafilm®. Una vez almacenadas estas cepas, se evaluaron para clasificar las aisladas de secreciones de piel y tejidos blandos y de estas, las que fueron tomadas de pacientes que habían permanecido en el hospital durante un tiempo menor a 48 horas. En el caso de los pacientes con aislamientos

múltiples de diferentes tipos de muestras biológicas, uno sólo de los aislamientos fue incluido en el estudio.

Las cepas seleccionadas fueron resembradas en cajas de Petri con agar sangre, con el propósito de purificarlas. Luego, se procedió a inocular las cepas en tubos con agar base, los cuales se almacenaron a una temperatura de 2 - 4°C, para asegurar la sobrevivencia de las cepas en óptimas condiciones sin necesidad de resembrar periódicamente.

Para la determinación de cepas SARM-com productoras de *pvl*, se obtuvo la colaboración del Laboratorio de Referencia de Cocáceas Gram Positivas del Instituto de Salud Pública de Chile. Las cepas fueron resembradas en cajas de Petri con agar Sangre para revivirlas y se inocularon en crioviales conteniendo agar tripticasa soya (TS). Una vez en Chile, se realizó un estudio fenotípico con el fin de confirmar que se tratara de cepas SARM, en donde se identificó cualquier cepa que pudiera haberse contaminado posteriormente a la inoculación en los crioviales con TS. Las cepas que concordaron fenotípicamente tanto en Guatemala como en Chile, fueron posteriormente evaluadas a través de un estudio genotípico.

El estudio genotípico consistió en la extracción y purificación de ADN bacteriano, amplificación a través de PCR convencional y posterior tipificación de los siguientes genes: *mecA*, *femA* y *pvl*, indicador de resistencia a la meticilina, confirmatorio de *S. aureus* y productor

del factor de virulencia Leucocidina de Pantón-Valentine, respectivamente.

Resultados

Durante las 12 semanas de muestreo en los dos hospitales nacionales, se encontraron 12 casos sospechosos de SARM-com (Tabla 1). A partir de la información disponible de los pacientes con la infección, se tomó en consideración, que todos los aislamientos SARM positivos pertenecieran a pacientes que cumplieran un período de tiempo igual o menor a 48 horas de estadía en el hospital. Asimismo, no se encontró diferencia en el sexo ni en la distribución en la edad de los pacientes, esto sin tomar en cuenta los tres casos cuya edad se desconoce. Los tipos de muestra utilizados para la identificación del patógeno se obtuvieron principalmente de secreciones de piel y tejidos blandos -11 cepas- seguido de hisopados nasofaríngeos de los cuales sólo una cepa SARM positiva fue identificada.

El patrón del antibiograma obtenido de las 12 cepas SARM correspondió resistencia a la oxacilina, eritromicina y penicilina. Asimismo, se observó una variabilidad en la resistencia a los antibióticos clindamicina, levofloxacina y moxifloxacina (Tabla 2).

Tabla 1. Datos Generales obtenidos de pacientes con aislamiento SARM positivo

Datos demográficos	Frecuencia	Porcentaje
Sexo		
Femenino	7	58.33
Masculino	5	41.67
Edad* (años)		
0-12	1	11.00
13-24	2	22.00
25-36	1	11.00
37-48	2	22.00
49-60	0	0
61-72	1	11.00
72-84	2	22.00
Tipo de muestra		
Piel y tejidos blandos	11	91.66
Hisopado nasofaríngeo	1	8.33

Fuente: Datos experimentales. *Se desconoce la edad de 4 pacientes SARM positivo y la edad de un paciente SARM con *Pvl* positivo.

La tipificación de las cepas fue realizada por el Laboratorio de Referencia de Cocáceas Gram Positivas del Instituto de Salud Pública de Chile, en donde al realizar el estudio fenotípico para confirmar el aislamiento de SARM, se reportó que de las 12 cepas sospechosas, cuatro estaban contaminadas. Las ocho

estaban contaminadas. Las ocho cepas restantes se analizaron para la identificación de los genes: *mecA*, *femA* y *pvl* (Tabla 3), en donde se obtuvo que de las ocho cepas dos presentaron los genes *mecA* y *femA* y *pvl*, confirmando su carácter de SARM adquirido en la comunidad.

Tabla 2. Patrón de susceptibilidad expresada por SARM

	SARM (n=12)		
	R	I	S
Oxacilina	12	0	0
Penicilina	12	0	0
Eritromicina	12	0	0
Gentamicina	0	0	12
Tetraciclina	0	0	12
Trimetoprima	0	0	12
Vancomicina	0	0	12
Linezolid	0	0	12
Nitrofurantoína	0	0	11*
Rifampicina	0	0	10*
Clindamicina	11	0	1
Levofloxacin	10	1	1
Moxifloxacin	11	0	1

Fuente: Datos experimentales. S: susceptible, I: intermedia, R: Resistente

*Se desconoce la susceptibilidad para el antibiótico de alguna cepa.

Tabla 3. Resultados obtenidos de fenotipificación y tipificación del Laboratorio de Referencia de Cocáceas Gram Positivas del Instituto de Salud Pública de Chile

Análisis	Frecuencia
Fenotipificación	
SARM	8
Tipificación	Frecuencia
* Gen <i>mecA</i>	8
†Gen <i>femA</i>	8
‡Gen <i>pvl</i>	2

Fuente: Datos experimentales. *Gen *mecA*: Gen de resistencia a Meticilina. †Gen *femA*: gen específico de especie de *S. aureus*. ‡ Gen *pvl*: Gen de Leucocidina Pantón-Valentine.

De las dos cepas confirmadas SARM-com *pvl* positivo, una fue aislada a partir de secreción de piel de un paciente de sexo masculino, de cinco años de edad, con diagnóstico de sepsis, quien fue atendido en la emergencia de Pediatría del Hospital Roosevelt; se desconoce la evolución de este paciente. El otro aislamiento fue obtenido de la secreción de herida de una paciente de sexo femenino de 33 años de edad, quien fue atendida por infección crónica en el cráneo; al momento del ingreso fue medicada con penicilina y cefotaxime, evolucionó favorablemente y egresó 20 días después.

Discusión

Desde la década de los años noventa se han presentado numerosos casos confirmados de pacientes con *S. aureus* meticilino resistente (SARM-com), los cuales se encuentran distribuidos alrededor del mundo, habiendo sido reportados en Estados Unidos, Europa y ciertos países de Latinoamérica como Colombia, Argentina y Uruguay.

Genéticamente, estas cepas de la comunidad difieren de las que se asocian a nivel hospitalario (SARM-hos) en que a menudo contienen los genes que codifican la toxina Leucocidina Pantón Valentine (*pvl*), además presentan un casete cromosómico tipo *mec* (SCC*mec*) con los alelos IV o V (Teglia, 2007) (Huang, 2008; Vorobieva, 2008; Gosbell, 2005; Otter & French, 2008).

En Guatemala no existen estudios previos de caracterización genotípica de las cepas de SARM-com, por lo tanto la determinación de dicha cepa a través de un estudio exploratorio, es útil para establecer la existencia de la problemática en el país y encaminar nuevas investigaciones que permitan establecer la distribución de la cepa.

Las cepas SARM-com pueden diagnosticarse en el laboratorio con base en los siguientes criterios: aislamiento del patógeno, concordancia del antibiograma con las características esperadas, evidencia del gen *mecA* y del gen *pvl*. Como resultado de 12 semanas de muestreo, se obtuvieron 12 cepas SARM

provenientes únicamente del Hospital Roosevelt, coincidentes con el perfil de resistencia de las cepas comunitarias, de las cuales 91.66% fue aislado de secreciones de piel y tejidos blandos, mientras que 8.33% se aisló de hisopados nasofaríngeos. De acuerdo con los estudios SARM-com ha sido aislado predominantemente de infecciones de piel y tejidos blandos a diferencia de SARM-hos, que se caracteriza por causar bacteremias e infecciones del tracto urinario y respiratorio. Sin embargo, se ha reportado que SARM-com también ha sido aislado en infecciones más severas a nivel vascular (endocarditis pulmonar, neumonía necrotizante, huesos y articulaciones, osteomielitis o infecciones mediadas por toxinas, síndrome de shock tóxico) (Sosa e Hincapie, 2007; Dumitrescu, 2008; Kluytmans-VandenBergh & Kluytmans, 2006).

El mayor número de los casos de infecciones por SARM-com, se ha detectado en internos de cárceles, equipos deportivos, niños y adolescentes que viven en hacinamiento familiar y guarderías infantiles. No obstante, en ninguna de las investigaciones se describe alguna correlación con el sexo de los pacientes. Esto concuerda con los resultados del presente estudio, donde se encontró que 41.67% de los aislamientos se obtuvo de pacientes de sexo masculino y 58.33% de sexo femenino. Sin embargo, tomando en cuenta que la mayoría de pacientes que acuden a consulta en el Hospital Roosevelt por tratamientos terapéuticos, viven en pobreza o pobreza extrema, es posible

que presenten factores de riesgo como hacinamiento familiar y limitación en los servicios básicos, lo que fomenta la transmisión familiar y a gran escala del patógeno (Teglia, 2007; Kluytmans-VandenBergh & Kluytmans, 2006; Wolter, 2007).

De acuerdo con la literatura, las principales características de los procesos generados por SARM-com son, entre otras, lesiones de inicio brusco, predominante en niños y adolescentes previamente sanos. Sin embargo, de acuerdo con los datos obtenidos del presente estudio, no es posible establecer dicha predominancia, debido a que sólo una de las cepas SARM-com *pvl* positivo fue aislada a partir de un menor de edad (Teglia, 2007; Bocher, 2008; Santay, 2005; Udo, 1993; Richardson, 2008).

Según los criterios tomados de 48 horas, se trataron de captar aislamientos provenientes de la comunidad, sin embargo, se necesita realizar otros estudios a fin de conocer si existen cepas con este perfil circulando a nivel intrahospitalario. Las 12 cepas obtenidas de los casos confirmados en el estudio concuerdan con este requerimiento, de acuerdo con la información proporcionada por el laboratorio de microbiología del hospital (Richardson, 2008).

Doce cepas fueron enviadas al Laboratorio de Referencia de Cocáceas Gram Positivas del Instituto de Salud Pública de Chile en donde la confirmación fenotípica evidenció que 8 cepas presentaron los genes *femA* y *mecA*,

mismos que son específicos de la especie y resistencia a antibióticos betalactámicos, respectivamente. De estas ocho cepas, dos presentaron el gen *pvl*. Las seis cepas no productoras de *pvl* no pueden descartarse totalmente como SARM-com, debido a que de acuerdo con la literatura se ha establecido que aproximadamente un 10% de las cepas SARM-com pueden no ser productoras de este factor de virulencia (Teglia, 2007).

Habiéndose confirmado genótipicamente las cepas SARM-com, se observó que las dos cepas productoras de *pvl* mostraron susceptibilidad a la gentamicina, tetraciclina, trimetoprima, vancomicina, nitrofurantoína y linezolid. Solamente en una se observó resistencia a la clindamicina (Teglia, 2007; Richardson, 2008; Charlebois, 2004; Skiest, 2006).

Entre las limitaciones el estudio se incluyen el número de cepas SARM-com obtenido, el cual no permite realizar conclusiones concretas acerca de la magnitud del problema al cual Guatemala se enfrenta. Figura además, el registro incompleto de la información de los pacientes cuyas muestras se remiten al laboratorio para análisis, tales como la edad, sexo, tipo y sitio anatómico de donde se obtuvo la muestra; así como la variabilidad en los antibióticos utilizados en el antibiograma para una misma especie bacteriana. A lo anterior se suma, que el análisis de los datos se vio afectado por las cepas clasificadas como contaminadas, debido a que en estas no se determinó la producción del factor de virulencia. La falta de laboratorios de

Biología Molecular a disposición de investigadores de instituciones públicas, representa una dificultad para el desarrollo de temas de esta índole, a pesar del impacto que tienen los resultados para el sistema de salud del país.

La existencia de SARM-com en Guatemala evidencia la necesidad de realizar estudios posteriores para establecer la magnitud del problema de salud que representa para el país y la difusión de estos hallazgos permite que los profesionales de la salud orienten adecuadamente las terapias antimicrobianas en los casos donde existan factores de riesgo asociados, sin tener que recurrir a vancomicina u otros antibióticos de amplio espectro que deban reservarse para casos en los que el agente patógeno sea multirresistente. El tratamiento adecuado de infecciones por SARM-com reduce el riesgo de que otras cepas bacterianas que sean hospitalarias adquieran el gen *pvl* o evite que las cepas SARM-com *pvl* positivo, adquieran el poder multirresistente de las cepas intrahospitalarias.

Agradecimientos

Agradecemos al hospital Roosevelt y hospital nacional Pedro de Bethancourt, Laboratorios BIOLAB® y al Laboratorio de Referencia de Cocáceas Gram Positivas del Instituto de Salud Pública de Chile.

Referencias

- Böcher, S., Gervelmeyer, A., Monnet, D., Mølbak, K., & Skov, R. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: risk factors associated with community-onset infections in Denmark. *Clinical Microbiology & Infection*, 14.
- Casellas, J. (2008). CA-MRSA: Que son? Como diagnosticarlos, como tratar sus infecciones? *La Gaceta*, 2,1-3.
- Charlebois, E., Perdreau-Remington, F., Kreiswirth B., Bangsberg, D., Ciccarone, D., Diep, B., *et al.* (2004). Origins of Community Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infections Diseases*, 39.
- Dumitrescu, O., Badiou, C., Bes, M., Reverdy, M., Vandenesch, F., & Etienne, J. *et al.* (2008). Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clinical Microbiology & Infection*, 14, 384-387.
- Fang, H., Hedin, G., Li, C., & Nord, E. (2008). Genetic Diversity of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Southern Stockholm. *Clinical Microbiology & Infection*, 14, 370-376.
- Gosbell, G. (2005). Epidemiology, clinical features and management of infections due to community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (cMRSA). *Internal Medicine Journal*, 35, 120-135
- Huang, Y., Ho, C., Chen, C., Su, L., & Lin, T. (2008). Comparative molecular analysis of community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children in northern Taiwan. *Clinical Microbiology & Infection*, 14, 1167-1172.
- Kluytmans-VandenBergh, M., & Kluytmans, A. (2006). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. *Clinical Microbiology & Infection*, 12, 9-15.
- Otter, J., & French, G., (2008). The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000-2006. *Clinical Microbiology & Infection*, 14, 670-676.
- Richardson, A., Libby, S., & Fang, F. (2008). A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science*, 319, 1672-1676.

- Santay, K. (2005). Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Its Emerging Virulence. *Clinical Medicine & Research*, 3, 57-60.
- Skiest, D., Brown, K., Hester, J., Moore, T., Crosby, C., Mussa, H., et al. (2006). Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a urban HIV clinic. *HIV Medicine*, 7, 361-368.
- Sosa, L., y Hincapie, M. (2007). Portadores Nasales de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente en Contactos de Pacientes Pediatricos con Enfermedad Diseminada Adquirida en la Comunidad. *MedUNAB*, 10, 195-199
- Teglia, O., Gregorini, E., Notario, R., Fay, F., & Casellas, J. (2007). *Staphylococcus aureus* Meticilino-Resistente emergente de la Comunidad. *Revista Médica de Rosario*, 77, 73-81.
- Udo, E., Pearman, J., & Grubb W. (1993). Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *Journal of Hospital Infection*, 25, 97-108.
- Van de Griend, P., Herwaldt, L., Alvis, B., DeMartino, M., Heilmann, K., Doern, G., et al. (2009). Community associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infections Diseases*, 15, 1582-1588.
- Vorobieva, V., Bazhukova, T., Hanssen, M., Caugant, D., Semenova, N., Haldorsen, B., et al. (2008). Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from the Arkhangelsk region, Russia: Antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, and distribution of Panton-Valentine leucocidin genes. *Acta Patológica Microbiológica Scandinavica*, 116, 877-887.
- Wolter, D., Tenover, F., & Goering, R. (2007). Allelic variation in genes encoding Panton-Valentine leukocidin from community-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology & Infection*, 13, 827-830.