

## Resistencia del *Staphylococcus* a la meticilina y cloxacilina

R. Díaz (\*), A. Chordi, A. Rodríguez-Burgos y J. Tormo

### RESUMEN

Se estudia la sensibilidad a antibióticos de 212 cepas de *Staphylococcus*, obtenidas de muestras clínicas. También se estudian las actividades bioquímicas de las cepas. No se encontró relación cualitativa entre resistencia y actividades bioquímicas. Se encontró un 2 % de resistencia a la metacilina y cloxacilina sin relación con la administración de estos antibióticos. Se discute el origen de la resistencia natural a estos derivados.

### INTRODUCCIÓN

Desde el aislamiento del ácido 6-aminopenicilánico en 1959<sup>6</sup> se han producido una gran cantidad de penicilinas semisintéticas. La meticilina y la cloxacilina han demostrado ser resistentes a la penicilinas del estafilococo y efectivas en los ensayos con los pacientes humanos<sup>4, 25</sup>. Al iniciarse la producción de la meticilina no se encontraron cepas resistentes a esta droga<sup>32</sup>. Sin embargo, se han hallado cada vez mayor número de cepas resistentes<sup>10, 15, 21, 23, 26, 31, 33, 38, 41, 42</sup>, demos-

trándose un incremento gradual en la frecuencia<sup>22</sup>.

Es tema de discusión si la resistencia a estos derivados es de tipo natural o es adquirida por el uso de esta droga. En España no existen preparados comerciales de oxacilinas, ni existían de meticilina en el comienzo de este trabajo. El estudio de las cepas en ese momento era de interés por no poder existir cepas con resistencia adquirida por el uso de estos antibióticos. Este es el fin del presente trabajo. Estábamos también interesados en conocer si la resistencia a los antibióticos determina alteración en las propiedades fisiológicas y altera por ello las pruebas relacionadas con la patogenicidad.

(\*) El presente trabajo fue realizado con una beca de la Comisaría de Protección Escolar (1964).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron estudiadas 212 cepas de *Staphylococcus* aisladas de muestras clínicas durante el año 1963. El aislamiento se efectuaba sobre agar salado manitol (Difco). Las colonias de las placas de agar salado manitol incubadas a 37° C durante 48 horas eran subcultivadas en caldo BHI (Difco) durante 18 horas. Parte de este subcultivo era utilizado para tinción por el método de Gram, para efectuar la prueba de la catalasa, y para estudiar las necesidades de oxígeno. La otra parte del subcultivo era utilizado para efectuar las restantes pruebas. Una cepa era catalogada de *Staphylococcus* cuando estaba compuesta por cocos Gram positivos, productores de catalasa y anaerobios facultativos.

Las pruebas de la coagulasa, manitol anaeróbico, producción de pigmento, gelatinasa, fosfatasa, hemolisinas, ureasa y crecimiento en telurito, se efectuaban de acuerdo a las técnicas descritas en trabajos anteriores<sup>11, 12</sup>.

La determinación de la sensibilidad a los antibióticos se efectuó sobre agar tripticasa Soya y se emplearon discos de baja concentración, de la casa Difco, según la técnica de Anderson<sup>1</sup>. Se estudiaron los siguientes antibióticos: penicilina, cloromicetina, tetraciclina, neomicina, kanamicina, eritromicina y estreptomina. En todas las cepas se estudió también la sensibilidad frente a la metilicina, 10 µg por disco, y la cloxacilina, 5 µg por disco.

## RESULTADOS

En la Tabla I se exponen los tipos de resistencia hallados. De 212 cepas de *Staphylococcus*, 51 (24 %) mostraron ser sensibles a todos los antibióticos. Solamente una cepa fue resistente a todos los antibióticos. No se hallaron monorresistencias a la kanamicina, eritromicina, cloxacilina y metilicina. Las resistencias a estos dos últimos derivados se presentaron conjuntamente en las mismas 6 ce-

TABLA I

Antibiotipos de resistencia y distribución según las especies de *Staphylococcus*

	Sa	Se	Si		Sa	Se	Si
No resistencias	12	36	3	CTS	1	19	2
P	2	1		TSN	1	2	
C		1		PCTS	2	9	5
T		3		PCTE	1		
S	5	20	2	PTKE	1		
N		3		PTSN		1	
PT	1			CTSE		5	
PS	14	1		CTSN		1	
CS	2	3		PCKS		2	
TK	5	11		PTKSE	2		
PCT		1		CTKSOM		1	
PCS	2	1		PTSNOM		1	
PTS	14	3	1	PCKSOM	1		1
CTE		1		PCKSENOM	1		

P = Penicilina  
 C = Cloromicetina  
 T = Tetraciclina  
 K = Kanamicina  
 S = Estreptomina  
 E = Eritromicina

N = Neomicina  
 O = Cloxacilina  
 M = Metilicina  
 Sa = *S. aureus*  
 Se = *S. epidermidis*  
 Si = S. inclasificable

pas. Estas 6 cepas eran las más pronunciadamente multirresistentes.

Los antibiótipos de las cepas de *S. aureus* no mostraron ser del todo diferentes de los antibiótipos del *S. epidermidis*, aunque sí se mostraba una tendencia de presentarse un antibiótipo más acusadamente en una de las especies del *Staphylococcus*. Los antibiótipos más frecuentes encontrados en las cepas del *S. epidermidis* fueron, S, TK, CTS. Por el contrario, los más frecuentes de las cepas de *S. aureus* fueron PS y PTS. Muchos de los posibles antibiótipos no fueron encontrados en ninguna de las cepas.

Se aislaron 6 cepas (2 %) resistentes a la meticilina y cloxacilina. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento con estos derivados, ni con otras penicilinas semisintéticas.

De las 6 cepas, 2 eran *S. aureus*, 2 *S. epidermidis* y 2 *S.* inclasificable. Dentro de cada especie de estafilococos la frecuencia de aparición de la resistencia a estos antibióticos fue respectivamente de 2,8, 1,5 y 13 por ciento en las especies de *S. aureus*, *epidermidis* e inclasificable.

En las figuras 1 y 2 se esquematiza respectivamente la relación entre las resistencias a antibióticos individuales y las propiedades bioquímicas de las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*. Las resistencias a la kanamicina, eritromicina, neomicina, cloxacilina y meticilina no se incluyen en estas figuras, por existir escaso número de cepas para obtener índices comparables.

Las cepas resistentes a la penicilina no producían la fosfatasa con mayor frecuencia que las sensibles a este antibiótico. No se encontró que las cepas eritromicina-resistentes carecieran con mayor frecuencia de hemolisinas, ni tampoco se observó diferencia en la pigmentación en relación con la resistencia. La producción de gelatinasa por las cepas resistentes a la cloromicetina fue infe-

rior en frecuencia al resto de las cepas en el grupo *S. aureus*. Por el contrario, en el grupo de cepas de *S. epidermidis* el porcentaje de cepas productoras de gelatinasa fue similar al resto de las cepas. El escaso número de cepas con resistencia individual a la cloromicetina en el grupo de cepas de *S. aureus* resta valor al resultado hallado. En los resultados obtenidos no se observaron diferencias cualitativas de los caracteres fisiológicos de las cepas en relación con la resistencia.

## DISCUSIÓN

El 76 % de las cepas estudiadas eran resistentes a algunos de los antibióticos utilizados. Sin embargo, sólo una de las 212 cepas era resistente a todos los antibióticos. El aumento progresivo a través de los años de las cepas resistentes y a su vez, el aumento de los antibióticos y derivados con efectividad relativa sobre las cepas de *Staphylococcus* obligan cada vez más a la realización del antibiograma ante cualquier estafilococia.

No se encontró relación entre resistencia y propiedades bioquímicas. Se ha demostrado repetidas veces que las cepas al hacerse resistentes alteran cualitativamente el índice de crecimiento y de fermentación<sup>14</sup>. También se ha descrito alteración del tipo de fago<sup>9</sup> y cambios en la constitución antigénica<sup>30</sup>. Estos datos se han interpretado como una alteración en las propiedades bioquímicas. Elek<sup>14</sup> al revisar este tema encuentra una diferencia cuantitativa más que cualitativa. De acuerdo con esto, en nuestro estudio no se encontró relación entre pigmento y resistencia, en contraposición a los datos de otros trabajos<sup>20, 43</sup>, ni entre resistencia a penicilina y producción de la fosfatasa, de acuerdo a los trabajos de otros autores<sup>2, 5, 7, 8</sup>. Es más, la frecuencia de una propiedad bioquímica era similar en las cepas sensibles a todos los antibióti-

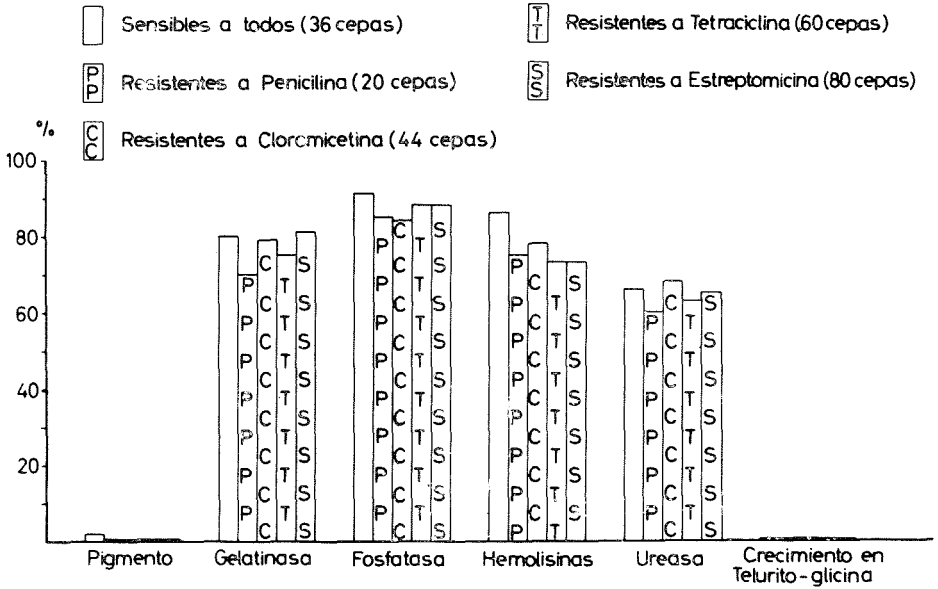


Fig. 1.—Estudio de la producción de pigmento, enzimas y crecimiento en telurito del *S. epidermidis* entre las cepas sensibles a todos los antibióticos y las cepas resistentes a la penicilina, cloromicetina, tetraciclina y estreptomicina

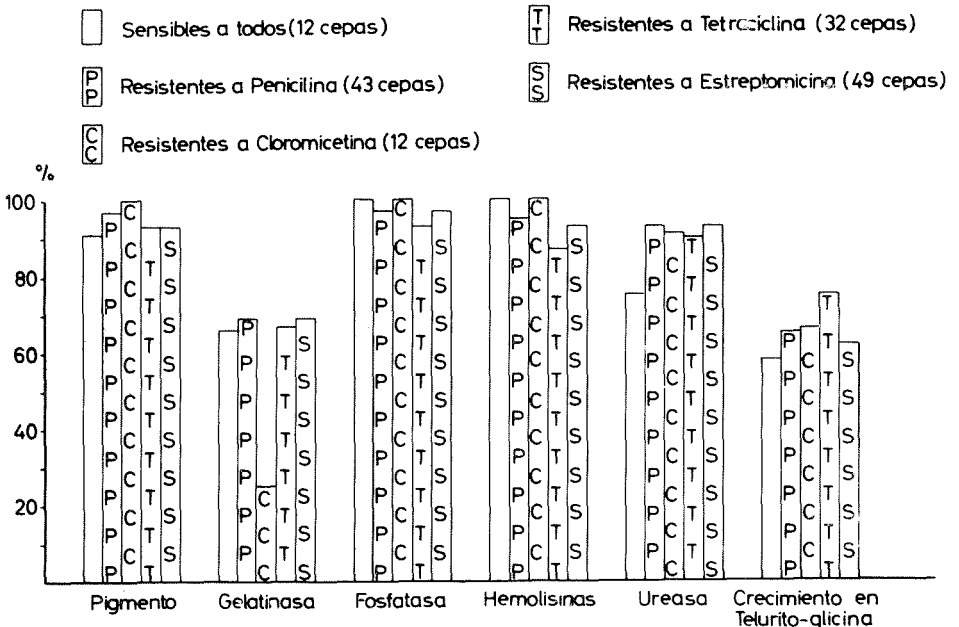


Fig. 2.—Estudio comparado de la producción de pigmento, enzimas y crecimiento en telurito del *S. aureus* entre las cepas sensibles a todos los antibióticos y las cepas resistentes a la penicilina, cloromicetina, tetraciclina y estreptomicina

cos que en las cepas resistentes. Esto hace creer que la resistencia no altera cualitativamente las características fisiológicas de las cepas.

No se estudió la frecuencia de resistencia a otros antibióticos con carácter epidemiológico, por no considerarlo de valor estadístico, por el gran predominio de cepas de *S. epidermidis* estudiadas. Los resultados de las resistencias individuales en relación con la especie de estafilococo están en relación con los hallazgos de otros autores<sup>18, 19, 28, 34, 36, 40</sup>.

Otro hallazgo de interés por su aplicación práctica fue el que sólo se encontró una cepa resistente de manera simultánea a la eritromicina y neomicina. Esta cepa era resistente a todos los antibióticos utilizados. Aunque el número de cepas resistentes a estos antibióticos fue superior al número de cepas resistentes a las penicilinas semisintéticas, la combinación de ambos puede ser efectiva y permite una visión más optimista acerca del tratamiento futuro de las estafilococias.

Las resistencias halladas frente a la metilicina y cloxacilina presentan un gran interés, a pesar de que no se ha determinado la misma concentración inhibitoria. En Septiembre de 1960, cuando la metilicina empezó a producirse en Inglaterra, no se encontró ninguna cepa resistente a este derivado<sup>32</sup>. Jevons<sup>21</sup> encontró por primera vez en Noviembre de 1960 tres cepas resistentes en el mismo hospital y del mismo tipo de fago, sobre 5.440 cepas. La cifra media de resistencia en Enero de 1961 era de 0,02 % del conjunto de un número de trabajos<sup>15, 21, 23, 32, 33, 38, 41</sup>. El índice de resistencia durante los años 1961 y 1962 fue del 0,1 al 0,2 %<sup>10, 26, 31, 42</sup>. Sin embargo, el estudio más amplio es el trabajo de Jevons, Coe y Parker<sup>22</sup>, que estudian 27.479 cepas desde Octubre de 1960 durante un periodo de dos años. El porcentaje de resistencia a la metilicina fue de 0,055 %

en el último trimestre de 1960, de 0,39 en el año 1961 y de 0,60 en el año 1962.

Como se puede observar en Inglaterra, donde se descubrió la metilicina e inmediatamente se introdujo comercialmente, el número de cepas resistentes a este antibiótico va aumentando progresivamente. Era de esperar que en España, donde no existían preparados comerciales de este producto en el comienzo de la obtención de las cepas, ni existen actualmente de oxacilinas, no se encontrarán cepas resistentes a estas penicilinas semisintéticas. Sin embargo, en nuestra casuística se encontró una elevada frecuencia (2 %) de cepas resistentes.

Por otra parte, también en Turquía, Cetin y Ang<sup>10</sup> encuentran cepas resistentes a la cloxacilina en un 2 % de las cepas estudiadas.

Esta elevada frecuencia de cepas resistentes en regiones donde no se han administrado estos antibióticos plantea una serie de problemas. Se cree y se ha demostrado<sup>24</sup> que el tipo de resistencia a estos antibióticos es del tipo de tolerancia a drogas. Se acepta generalmente que existen dos tipos de resistencia a la penicilina en el estafilococo: la resistencia del tipo de la penicilinasas y la del tipo de resistencia a drogas. La resistencia tipo penicilinasas infecta nuestros hospitales, es la más frecuente, y las cepas que la presentan no son "per se" altamente resistentes a la penicilina. Los grandes inóculos resisten a grandes cantidades de penicilina —por la liberación de gran cantidad de penicilinasas— pero los pequeños inóculos resisten sólo a pequeñas cantidades de penicilina. El otro tipo de resistencia es del tipo de tolerancia a drogas, y es una resistencia de la cepa "per se" inherente. Las cepas son altamente resistentes a la penicilina, lo mismo con grandes inóculos que con pequeños. A una cepa de estafilococo se le puede hacer adquirir este tipo de re-

sistencia por sucesivos cultivos en medios con penicilina en cantidades progresivas. En las cepas meticilin resistentes encontradas durante estos tres años, el tipo de resistencia es del tipo de resistencia a drogas<sup>24</sup> y en Inglaterra se ha atribuido esta resistencia al uso de este antibiótico, por no haberse encontrado cepas naturalmente resistentes al antibiótico antes de su uso, y al progresivo aumento de cepas meticilin resistentes. Sin embargo, éste no es el caso en España, donde estos antibióticos no han sido usados, o lo han sido en escasa cuantía. La posibilidad de transmisión de cepas<sup>8</sup> meticilin resistentes desde otros países tiene que ser desechada por la elevada frecuencia de cepas encontradas. Sólo cabe la explicación de la existencia de: 1) una resistencia inherente natural, 2) un mecanismo cruzado de resistencia ó 3) de una inactivación o destrucción de la meticilina y oxacilina por estas cepas.

El problema de la inactivación o destrucción de la meticilina por las cepas de estafilococos fue objeto de una interesante y copiosa discusión tenida en el *British Medical Journal* durante 1962 y 1963. Actualmente no se puede admitir la existencia en las cepas resistentes a la meticilina y cloxacilina de una específica meticilinasasa ó cloxacilinasasa<sup>25</sup>. Sin embargo, la creencia durante estos últimos años de que las cepas de estafilococos no pueden destruir la meticilina y cloxacilina ha tenido que ser desechada. Ayliffe y Barber<sup>3</sup> y Knox y Smith<sup>25</sup> han demostrado que algunas cepas destruyen lentamente la meticilina y la cloxacilina, tanto si son resistentes o no a estas penicilinas. El grado de inactivación estaba relacionado con la producción de penicilinasasa de las cepas y no con la resistencia a estas penicilinas. De ello resulta que estos derivados de la penicilina —que se creían sensibles a la acción de la penicilinasasa— difieren de

estas otras penicilinas solamente de manera cuantitativa en su sensibilidad a la acción de la penicilinasasa. Sin embargo, la destrucción de la meticilina y cloxacilina por la penicilinasasa es tan pequeña y tan lenta que no puede dar lugar realmente a resistencias.

El origen de estas cepas, meticilin y cloxacilin resistentes hay que buscarlo por otros mecanismos. La existencia de una específica resistencia natural inherente a estos antibióticos tampoco es fácil de aceptar cuando no se encontraron en el año 1960, aunque es uno de los mecanismos que puede explicarlo<sup>16</sup>. Es más fácil de comprender que estas cepas se deban a un mecanismo cruzado de resistencia inherente. Existen algunas cepas de estafilococos que tienen los dos tipos de resistencia a la penicilina, el tipo penicilinasasa y el tipo de tolerancia a drogas. La resistencia a penicilina G existía antes de la introducción de la penicilina G<sup>29</sup>, aunque desconocemos el tipo de resistencia. Es de esperar que la resistencia inherente a la penicilina aumente con el uso de este antibiótico, aunque también aumente el número de cepas productoras de penicilinasasa por un mecanismo de selección. Recientemente Ayliffe y Barber<sup>3</sup> estudiando un grupo de cepas penicilin resistentes, encontraron que el 45 % de las cepas producían intensamente penicilinasasa, el 25 % la producían débilmente y el 30 % de las cepas no producían penicilinasasa, a pesar de ser penicilin resistentes.

Por otra parte, se ha encontrado resistencia cruzada entre la meticilina y la cloxacilina<sup>17, 22, 27</sup> en las cepas aisladas de material clínico. Es más, la mayoría de las cepas meticilin y cloxacilin resistentes muestran también resistencia a la penicilina, estreptomocina y tetraciclina en toda la literatura<sup>16, 22, 37</sup> y en el presente trabajo. Finalmente las cepas hechas resistentes "in vitro" por pases sucesivos

en medio de cultivo con meticilina o cloxacilina presentan resistencia cruzada a la tetraciclina, cloromicetina, penicilina y derivados semisintéticos de ésta<sup>13, 39</sup>. En el presente trabajo las 6 cepas meticilina y cloxacilina resistentes presentaron la

mayor multirresistencia a las 212 cepas estudiadas.

**Reconocimiento.**—Agradecemos a Bechman Laboratorios y a Mast Laboratories el amable suministro de discos de Cloxacilina (Orbein) y Meticilina (Celbenin).

#### SUMMARY

### Staphylococcus resistance to methyciline and cloxaciline

In 212 *Staphylococcus* clones taken from clinical samples a study is made of their antibiotic sensibility. Their biochemical activity is also studied. No qualitative relation was found between resistance and biochemical activity.

There was a 2 % resistance to metaciline and cloxociline which had no relation to the administration of these drugs. There is a discussion of the origin of the natural resistance to these products.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. ANDERSON, T. G. *Antibiotics Annual 1959-1960*, New York 1960. Págs. 587-595.
2. AKATOV, A. K. y Z. I. LEBEDEV. *Antibiotiki*, 6: 363, 1961.
3. AYLIFFE, G. A. J. y M. BARBER. *Brit. Med. J.*, 2: 202, 1963.
4. BARBER, M. y P. M. WATERWORTH. *Brit. Med. J.*, 1: 1159, 1962.
5. BASS, T. M., *Vrach. Delo*, 1: 97, 1963.
6. BATOHELOR, F. R.; F. P. DOYLE; T. H. NAYLOR y G. N. ROLINSON. *Nature*, 183: 257, 1959.
7. BROWN, R. L. y J. B. EVANS. *J. Bacteriol.*, 85: 1409, 1963.
8. CANNOW, F. D. y C. V. Z. HAWN. *J. Bacteriol.*, 86: 1052, 1963.
9. CETIN, E. T. *Antibiotic and Chemother.*, 12: 377, 1962.
10. CETIN, E. T. y O. ANG. *New Istanbul Contr. Clin. Sci.*, 5: 317, 1962.
11. DÍAZ, R., A. CHORDI, A. RODRÍGUEZ-BURGOS y J. TORMO. *Microbiol. Esp.* 1964 (en prensa).
12. DÍAZ, R., A. CHORDI, J. TORMO y A. RODRÍGUEZ-BURGOS. *Rev. Med. Univ. Navarra*, 8: 172, 1964.
13. DONALSON, J., A. J. MORIARITY, N. YOSHI y D. G. DALE. *Canad. J. Microbiol.*, 10: 163, 1964.
14. ELEK, S. D. *Staphylococcus pyogenes and its relation to disease*. 1959. Londres: Livingstones LTD.
15. ELEK, S. D. y P. C. FLEMING. *Lancet*, 2: 569, 1960.
16. ERIKSEN, K. R. *Acta Path. Microbiol. Scanáinav.* 61: 154, 1964.
17. ERIKSEN, K. R. y I. ERICHSEN. *Ugeskr. Laeg.*, 125: 1234, 1963.
18. GRÜN, L., H. RIESCHEL y H. W. FLEISCHHÄNER. *Disch. Med. Wschr.*, 78: 1298, 1953.
19. HONMAT, T. *Arch. Jap. Chir.*, 31: 225, 1962.
20. JACOBS, S. I., A. T. WILLIS y G. M. GOOD BURN. *J. Path. Bact.* 87: 151, 1964.
21. JEVONS, M. P. *Brit. Med. J.*, 1: 124, 1962.
22. JEVONS, M. P., A. W. COE y M. T. PARKER. *Lancet*, 1: 904, 1963.
23. KNOX, R. *Brit. Med. J.*, 2: 690, 1960.
24. KNOX, R. y J. T. SMITH. *Lancet*, 2: 520, 1961.
25. KNOX, R. y J. T. SMITH. *Brit. Med. J.*, 2: 206, 1963.
26. KNOX, R., D. M. MACLAREN, J. T. SMITH, J. A. P. TRAFFORD y R. D. S. BARNES. *Brit. Med. J.*, 2: 831, 1962.
27. KNUDSEN, E. T., D. M. BROWN y G. N. ROLINSON. *Lancet*, 2: 634, 1962.
28. KRYNSKI, S., W. KEDZIA, E. BECLA y A. KRASOWSKI. *Ann. Inst. Pasteur*, 102: 231, 1962.
29. MUNCH-PETERSON, E. y C. BOUNDY. *Bull. Wold. Hlth Org.*, 26: 241, 1962.

30. NORKRANS, B. y L. WAHSTROM. *Acta Path. Microbiol. Scandinav.*, 56: 451, 1962.
31. PEARSON, J. K. L. y T. D. BEATTLE. *Comp. Path.*, 72: 266, 1962.
32. ROLINSON, G. N. *Brit. Med. J.*, 1: 125, 1961.
33. ROLINSON, G. N., S. STEVEWS, F. R. BATCHELOR, J. CAMERON y E. B. CHAIN. *Lancet*, 2: 564, 1960.
34. SAKAKIBARA, E. *Acta Sch. Med. Univ. Kyoto*, 28: 125, 1961.
35. SIMÓN, H. J. y L. A. RANTZ, *Ann. Intern. Med.*, 57: 335, 1962.
36. SPINK, W. W. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 65: 175, 1956.
37. STEWARD, G. T. y R. J. HALT. *Brit. Med. J.*, 1: 308, 1963.
33. STEWARD, G. T., P. M. HARRISON y R. J. HOLT. *Brit. Med. J.*, 2: 1964, 1960.
39. SUTHERLAND, R., B. SLOCOMBE y G. N. ROLINSON. *Nature*, 203: 548, 1964.
40. TAKAHASHI, I. J. *Wat. Med. Ass.*, 13: 682, 1961.
41. THOMPSON, R. E. M.; J. W. HARDING y R. D. SIMÓN. *Brit. Med. J.* 2: 708, 1960.
42. WILLIS, A. T., S. I. JACOBS y G. M. GOODBURN. *J. Path. Bacteriol.*, 87: 157, 1964.
43. YOSHIDA, K., M. TAKAHASHI, *Medicine*, 19: 657, 1962.