



Infectio

Print ISSN 0123-9392

Infect. vol.2 no.2 Bogotá Jan./June 1998



How to cite this article

Perfiles plasmídicos de aislamientos multirresistentes de *Staphylococcus epidermidis* en un servicio hospitalario neonatal

Odette Ferré¹, Sandra Donoso¹, Santiago Buendía², Clara Rosa Amón de Levy³, Emilia María Valenzuela de Silva³, Ramón Mantilla³, Carlos A. Agudelo C.⁴

¹ Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Santafé de Bogotá, Colombia.

² Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Microbiología y Parasitología. Instituto Materno Infantil. Santafé de Bogotá, Colombia.

³ Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Santafé de Bogotá, Colombia.

⁴ Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Microbiología y Parasitología. Instituto de Salud en el Trópico. Santafé de Bogotá, Colombia.

Resumen

Se estudiaron 24 aislamientos de *Staphylococcus epidermidis*, obtenidos de hemocultivos de pacientes que presentaban cuadro clínico de sepsis compatible con infección nosocomial, en la Unidad de Recién Nacidos del Instituto Materno Infantil, Santa Fe de Bogotá.

A los aislamientos se les determinó la susceptibilidad antimicrobiana a penicilina, oxacilina, meticilina, cefotaxime, netilmicina y rifampicina. Se extrajeron los plásmidos y se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

El 75% de los aislamientos fueron multirresistentes, en especial con respecto a los antibióticos betalactámicos, con un 87.50/o Se encontraron plásmidos en 10 de los 24 aislamientos estudiados; los plásmidos presentaron rangos de 1.2 a 3.5 megadaitons. El coeficiente de similitud de los plásmidos de varios aislamientos osciló entre 1 y 0.3. En el grupo de aislamientos con plásmidos el 70% presentó multirresistencia, mientras que sólo el 36% del grupo sin plásmidos presentó multirresistencia.

Las probabilidades de asignar dos aislamientos tomados al azar a la misma categoría fue de $P = 0.0764$ para el antibiograma, $P = 0.160$ para los plásmidos y $P = 0.0694$ para la integración de los dos métodos.

Los perfiles plasmídicos de *S. epidermidis* indican que en la unidad hospitalaria está circulando y se encuentra en proceso de selección clonal, una bacteria con capacidad infectante y potencial epidémico.

El *S. epidermidis* es parte de la flora normal de piel y mucosas. En los servicios r hospitalarios de cuidados intensivos y de neonatos se le identifica con frecuencia, incluso en hemocultivos,

pero se ha encontrado que hasta en el 94% de los casos se trata de contaminación. También se le encuentra asociado a ciertos factores de riesgo como el bajo peso al nacer, la inmadurez del sistema inmunológico, la utilización continua de catéteres, sondas y otros similares, y el uso indiscriminado de antibióticos (1 -8). Puede producir infección y expresarse en un cuadro clínico caracterizado por apnea, bradicardia, letargia, baja perfusión, estupor, fiebre mayor de 38°C, emesis, distensión abdominal y residuos gástricos (1). Con frecuencia no es posible determinar la capacidad infecciosa de estas bacterias ni su potencial epidémico.

El *S. epidermidis* es una bacteria que tiene una alta diversidad fenotípica y presenta una creciente tendencia a la resistencia con respecto a múltiples antibióticos, aun cuando se trata de cepas contaminantes. Utiliza de manera amplia el sistema de plásmidos para transferir, por variados mecanismos, la resistencia y otras funciones de virulencia (6, 9-15).

Debido a la importancia de esta bacteria en las infecciones nosocomiales, se ha desarrollado un conjunto de métodos que, además de la biotipificación, permiten identificar características fenotípicas y estructurales de la bacteria. Cabe destacar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y el análisis del ADN plasmídico y cromosomal (2,3,9,13,16-31). Probablemente los métodos más efectivos para estudiar el *S. epidermidis* han sido el análisis de plásmidos y la electroforesis de campo pulsado (32).

En el presente estudio se caracterizaron un conjunto de aislamientos de *S. epidermidis* obtenidos en una unidad hospitalaria neonatal, por medio del análisis de los fenotipos de resistencia a los antibióticos y de los plásmidos, con el fin de establecer su capacidad infectante y su potencial epidémico.

Materiales y métodos

Aislamientos Bacterianos y cepas de control

Se utilizaron 24 aislamientos de *Staphylococcus epidermidis* obtenidos en hemocultivos de recién nacidos que presentaron cuadros clínicos de sepsis en el Instituto Materno Infantil de Santa Fe de Bogotá, durante los meses de junio y julio de 1995. Como control se utilizaron cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228 multirresistente y la cepa 201 aislada de la piel de un individuo sano, ambas de origen diferente al de los aislamientos en estudio.

Identificación, antibiograma y conservación

Los aislamientos fueron identificados en el laboratorio del Instituto Materno Infantil por métodos de rutina y se les practicó la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por medio del método de Kirby-Bauer (33), en agar Mueller- Hinton, con sensidiscos comerciales. Se utilizaron los siguientes antibióticos: oxacilina, cefotaxima, netilmicina, rifampicina, penicilina G y meticilina.

Hasta el momento del procesamiento los aislamientos se conservaron en agar sangre y en agar semisólido nutritivo a base de peptona, triptosa y cloruro de sodio, a 4°C.

Extracción del ADN plasmídico

Se probaron los métodos previamente descritos por Goering (17), Zucarelli (18), Mickelsen (30) y Sippel (19).

Este último método mostró el mejor resultado y se estandarizó introduciéndole algunas modificaciones para adaptarlo a las condiciones del laboratorio.

Brevemente, se tomaron 2-3 colonias de cada uno de los aislamientos en estudio, se resuspendieron en 15 ml de caldo BHI (con 20 mg/ml de penicilina) y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación. Se centrifugaron a 11.600 r.p.m. durante 7 minutos y el sedimento se resuspendió en 50 µl de buffer (8% sucrosa, 5% tritón 100X, EDTA 50 mM, Tris-HCL 50 mM a pH 8); se adicionó 1.8 µl de lisostafina (SIGMA) a una concentración de 1 mg/ml, y se

incubaron las muestras a 37°C durante 4 horas. El contenido se hirvió por 90 segundos, se colectó el sobrenadante o lisado claro por centrifugación, se agregó un volumen igual de isopropanol y se llevó a -70°C por 15 minutos. El pellet se colectó y se diluyó en 20 ml de buffer TE al que se le habían añadido 100 mg/ml de RNAasa. La muestra se incubó a 37°C por 30 minutos y se agregaron 10 ml de buffer de carga.

Electroforesis y estimación de las pares de bases de los plásmidos

La electroforesis horizontal se llevó a cabo en gel de agarosa al 0.8 % con bromuro de etidio, a 100V durante 1.5 horas. La visualización se realizó en un transiluminador de luz UV y las fotografías se tomaron con una cámara apropiada. Para estimar las pares de bases de los plásmidos encontrados se utilizó como patrón la Escbem'chia pV 51 7.

Análisis de los resultados

La comparación de las bandas de ADN plasmídico obtenidas por electroforesis se llevó a cabo por medio del coeficiente de similitud o coeficiente de Dice (34).

$$D = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$$

donde,

n = número de fragmentos idénticos en los dos XY aislamientos

n_x = número de fragmentos del aislamiento x

n_y = número de fragmentos del aislamiento y

Cuando $D = 1$ los dos aislamientos tienen un patrón idéntico. Cuando $D = 0$, los dos aislamientos tienen un patrón totalmente diferente.

Para examinar la relación entre plásmidos y resistencia se utilizaron la prueba de t Student para proporciones y una prueba de independencia entre aquellas variables en una tabla de contingencia de 2 x 2. La significancia de los resultados se valoró por medio de la prueba de χ^2 con corrección de Yates para continuidad y el Test exacto de Fisher. Se utilizó el programa EPI INFO 6.

La probabilidad de asignar dos aislamientos tomados al azar al mismo tipo o categoría, en cada sistema de caracterización o una combinación de los mismos, se estableció por medio del siguiente modelo (35): $P = (a/n) + (b/n) + (c/n) + \dots (z/n)$.

Donde a, b, c, ... representan el número de aislamientos en las categorías A, B, C, ... y n es igual al número total de aislamientos caracterizados.

Resultados

Susceptibilidad a los antimicrobianos

De los 24 aislamientos de *Staphylococcus epidermidis* se encontraron 22 (96%) resistentes a la penicilina, 18 (75%) a la oxacilina, 11 (54.80%) a la cefotaxime, 9 (37.5%) a la meticilina, y 2 (8.3%) a la netilmicina. Globalmente, 75% de los aislamientos fueron multirresistentes, en especial con respecto a los antibióticos betalactámicos, con un 87.5%. Sólo 3 aislamientos resultaron sensibles a todos los antibióticos utilizados. La cepa ATCC 12228 fue resistente a todos los antibióticos, excepto a la meticilina y la cepa 201 resultó sensible a todos los antibióticos excepto a la penicilina ([Tabla 1](#)).

El agrupamiento de los aislamientos según su patrón de resistencia permitió identificar 16 fenotipos diferentes.

La probabilidad de asignación de dos aislamientos de *S. epidermidis* tomados al azar al mismo fenotipo de resistencia fue de $P = 0.0764$.

Se encontraron plásmidos en 10 de los 24 aislamientos. Un solo plásmido en 3 aislamientos, dos

plásmidos en 4 aislamientos y tres plásmidos en 3 aislamientos, mientras la cepa ATCC 12228 mostró dos plásmidos (Figura 1). De acuerdo con el número de plásmidos y sus tamaños en Megadaltons, se identificaron siete perfiles plasmídicos diferentes.

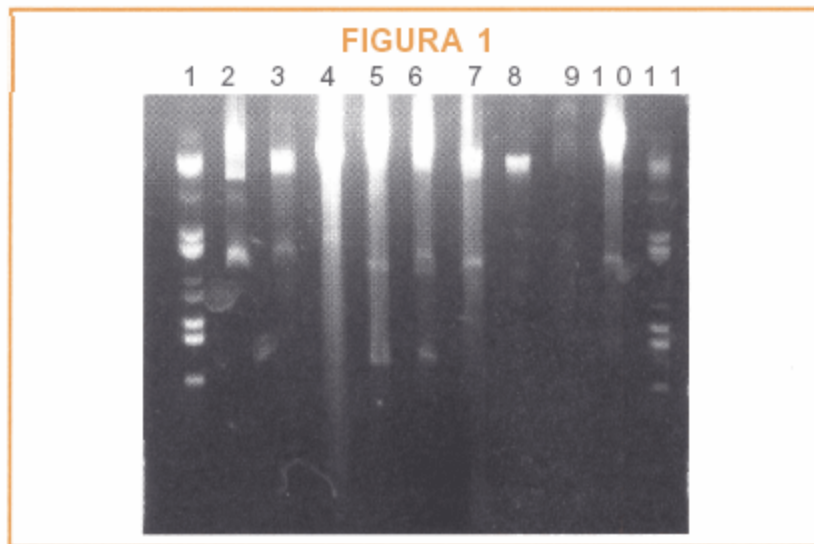


FIGURA 1
Bandas de ADN plasmídico, obtenidas por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Líneas: 1 y 11: marcador de peso pV 517 (ADN plasmídico obtenido por la técnica de Miniprep Lisis Alcalina); 2: cepa ATCC 12228; Líneas 3-10 aislamientos en estudio, como sigue: 3:768; 4:849; 5:438; 6:850; 7:851; 8:447; 9:672; 10:834. Al lado izquierdo: kilopares de bases; C: ADN cromosomal.

La comparación de los plásmidos por el coeficiente de similitud o de Dice indicó $D=1$ entre los aislamientos 849-768, 787-507; $D=0.8$ entre los aislamientos 850-834, 851-833; $D=0.6$ entre los aislamientos 849-834, 768-834; $D < 0.5$ entre los aislamientos 850-768, 850-849; $D=0.4$ entre los aislamientos 787-438, 507-438; $D < 0.3$ entre los aislamientos 850-851, 850-438, 851-438, 447-787 y 447-507.

La probabilidad de asignar dos aislamientos tomados al azar al mismo tipo plasmídico fue de $P = 0.160$.

Resistencia y plásmidos

En el grupo de bacterias con plásmidos todos los aislamientos presentaron resistencia y en 70% de los mismos se encontró multirresistencia (4 ó más antibióticos). En el grupo de aislamientos sin plásmidos, tres fueron completamente sensibles y sólo el 36% de ellos presentó Bandas de ADN plasmídico, obtenidas por electroforesis en gel de multirresistencia. Estas diferencias son significativas ($t = 1.94$; $91 = 22$; $p < 0.05$).

De otra parte, en las pruebas de independencia se encontró asociación entre plásmidos y resistencia sólo en el caso de la rifampicina, por medio del test exacto de Fisher ($\alpha = 0.032$).

La probabilidad de asignar dos aislamientos de *S. epidermidis* tomados al azar a la misma categoría, utilizando simultáneamente la susceptibilidad a los antimicrobianos y la presencia de plásmidos fue de $P = 0.0694$.

Discusión

La amplia multirresistencia y los cuantiosos fenotipos encontrados coinciden con los resultados obtenidos en otros estudios (1, 7, 13, 25, 26, 27, 30). Entre los factores que pueden haber determinado tal situación cabe mencionar: abundante flora bacteriana, un alto número de portadores de *S. epidermidis*, procesos contaminantes y la utilización de antibióticos. En este

último aspecto, gran parte de los genes que confieren resistencia son regulados por sistemas de represión de tal manera que cuando el antibiótico procesado entra en la célula se une al gen represor, impidiendo el bloqueo de la región promotora del gen que codifica la resistencia, con la cual se inicia la transcripción de tal función (36).

Con frecuencia se ha encontrado que cerca del 90% de los aislamientos de *S. epidermidis* obtenidos en el medio hospitalario tienen como mínimo un plásmido (30). En el presente estudio el 41.6% de los aislamientos tuvieron por lo menos un plásmido. Esta diferencia puede deberse a que una parte de los aislamientos eran contaminantes sin plásmidos. También cabría la hipótesis de que un grupo de aislamientos contaminantes o infectantes con plásmidos, los perdieron durante el procesamiento. Los plásmidos, en uno y otro caso, pueden haber transferido resistencia o ésta puede haberse adquirido por otros medios y haber sido incorporada al cromosoma antes de la toma de las muestras.

Los perfiles plasmídicos de aislamientos de *S. epidermidis* contaminantes, que pueden producir bacteremias transitorias, son completamente diferentes entre sí, debido a la variación policlonal que a su vez se expresa en múltiples fenotipos de resistencia a los antibióticos (9). Los aislamientos que son al tiempo infectantes y multirresistentes provienen de unos pocos clones ancestrales o de un subgrupo genéticamente restringido o genotipos que poseen una más alta patogenicidad, probablemente ligada a las adhesinas de superficie (10, 32). Esto se evidencia cuando se estudia el genoma de aislamientos infectantes por medio de electroforesis de campo pulsado o por ribotipos (32). Como la multirresistencia y otros factores de virulencia pueden ser transferidas por plásmidos, cuando dos o más aislamientos no relacionados en lo epidemiológico, presentan un perfil plasmídico idéntico o semejante, tales microorganismos pueden ser progenie de unos pocos clones infectantes. Si tal situación se produce de manera repetida en una misma unidad hospitalaria existe la posibilidad de que tales microorganismos generen procesos infecciosos aislados o de carácter epidémico (9).

Los aislamientos estudiados no estaban relacionados epidemiológicamente entre sí. A pesar de que todos provenían de la misma unidad hospitalaria, la recolección se realizó en un período en que no se presentó un brote epidémico sino un número de casos acorde con la experiencia previa de la unidad hospitalaria, no se identificó una fuente común de infección y los intervalos de tiempo en que fueron recolectados los aislamientos cuyos perfiles de plásmidos presentaron mayor similitud oscilaron entre 1 y 34 días (tabla 1). Tal similitud allí donde se espera encontrar plásmidos polimórficos, indica que varios aislamientos se encontraban en proceso de expansión clonal, desplegando su capacidad viminaria, potencialmente epidémica.

El poder discriminatorio del antibiograma fue ligeramente superior al encontrado en estudios internacionales en los cuales la probabilidad de asignación de dos aislamientos, tomados al azar, al mismo fenotipo de resistencia ha estado alrededor de $P = 0.05$ (35).

Teniendo en cuenta este parámetro, el poder discriminatorio del sistema plasmídico puede considerarse elevado, lo cual indicaría que se transformaron algunas características de la población bacteriana normal, no infectante, fortaleciendo la hipótesis de selección clonal. Por otros estudios se sabe que el análisis de plásmidos es efectivo para diferenciar aislamientos epidémicos de aquellos que no lo son, pero es menos consistente para detectar aislamientos epidémicos (32).

La integración del antibiograma y el perfil plasmídico tiene un bajo poder discriminatorio porque crea un alto número de categorías (18 categorías), pero este resultado no puede ser generalizado ya que se circunscribe al pequeño número de aislamientos utilizados en el estudio.

Por lo contrario, se ha confirmado el valor que tiene el análisis simultáneo de los resultados obtenidos por aparte con el antibiograma y el perfil plasmídico, metodología que es ampliamente utilizada a nivel internacional porque toma características cualitativamente diferentes y suma, de manera parcial, el poder discriminatorio de cada uno de estos métodos.

Agradecimientos

A los doctores Elsa Cristina Gómez y Carlos José Robayo. Al señor Luis Alonso. Al Instituto Materno Infantil. especialmente a los miembros del Laboratorio Clínico.

Referencias bibliográficas

1. **Lyytikainen O, Saxen H, Ryhanen R, Vaara M, Vuopio-Varkila J.** Persistente of a multiresistant clone of *S. epidermidis* in a neonatal intensive-care unit for a four-year period. *Clin Infect Dis* 1995; 20:24-29.
2. **Pansi J, Robbins J, Lampson B, Hecht D.** Characterization of a Machrolide, lincosamine and streptolisin resistance plasmid in *S. epidermidis*. *J Bacteriol* 1981; 148(3):559-564.
3. **Parisi J, Hecht D.** Plasmid profiles in epidemiologic studies of infections by *S. epidermidis*. *J Infect Dis* 1980; 141 (5):637-643.
4. **Polin R,** Clinics in perinatology. Neonatal Sepsis. Ed. Guest Editors. Philadelphia 1991.
5. **Kleeman KD.** Species distribution of coagulase negative Staphylococcal isolates at a community Hospital and implications for selection of Staphylococcal identification procedures. *J Clin Microbiol* 1993; 31(5):324-327.
6. **Musser J, Kapur B.** Clonal of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain from intercontinental sources: association of mec with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol* 1992; 30(8):2058-2063.
7. **Inglis B, Ei-Adhami W, Stewart P.** Methicillin sensitive and resistant homologues of *Staphylococcus aureus* occur together among clinical isolates. *J Infect Dis* 1993; 163:323-328.
8. **Jarlov JO, Hansen ES, Rosdahl V, Espersen E** The typing of *S. epidermidis* by a lectine-binding assay. *J Med Microbiol*; 1992 37:195-200.
9. **Archer G, Karchmer A.** Plasmid patterns analysis of the differentiation of infecting from non-infecting *S. epidermidis*. *J Infect Dis* 1984; 149(6):913-920.
10. **Timmerman M, Fleer A, Besnier JM, De graaf L, Cremers F, Verhoef L.** Characterization of a proteinaceous adhesin of *S. epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* 1991; 59(11):4187-4192.
11. **Braude A, Davis CH.** Infection diseases and medical microbiology. Ed. WB. Saunders Company. 2ed. Vol.2. 1986.
12. **Kloos W, Orban B, Ublker D.** Plasmid composition of *Staphylococcus* species. *Can J Microbiol* 1981; 27:271278.
13. **Lebeau C.** Absence of distinctive characteristics between *S. epidermidis* strains responsible of non-hospital infectious endocarditis and commensal strains. *Pathol Biol Paris* 1993; 41(7):583-588.
14. **Deighton M, Borland R.** Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun* 1993; 8:743-749
15. **Sanyal D, Greenwood D.** An electron microscope study of glycopeptide antibiotic resistant strains of *S. epidermidis*. *J Med Microbiol* 1993; 39(3)
16. **Ludlam A, Noble R, Marples R, Phillips I.** The evaluation of a typing scheme for coagulase-negative Staphylococci suitable for epidemiological studies. *J Med Microbiol* 1989; 30:

161-165.

17. **Goering RB, Winters MA.** Rapid Method for epidemiological evaluation of Grampositive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (3): 426-429.

18. **Zuccarelli AJ, Roy I, Harding G, Couperus J.** Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin resistant *S. aureus*. *J Ciin Microbiol* 1990; 28(1): 97-102.

19. **Sippel J, Dunkle L.** Rapid Microprocedure for extraction of plasmid DNA from *S. aureus*. *J Infect Dis* 1984; 149(6):921-923.

20. **Rickwood D, Hames BD.** Gel Electrophoresis of Nucleic Acids. A Practica1 Approach. Ed. Oxford University Press. 2ed. Oxford 1990.

21. **Meyer J, Sanchez D, Elweii P, Falkow C.** Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid deoxirribonucleic acid. *J. Bacteriol* 1976; 127(3): 1529-1 537.

22. **Gaston MA, Duff S, Naidoo J, Ellis K, Roberts S, Richardson JF.** Marples R Cooke M. Evaluation of Electrophoretic method for typing methiciliine resistant *S. aureus*. *J Med Microbiol* 1988; 26: 189-197.

23. **Patnck CC, Plaunt S, Swett R, Patrick GS.** Defining of *S. epidermidis* ceii waii proteins. *J Clin Microbiol* 1990; 28(12): 2557-2562.

24. **Renaud F, Freney J, Etienne J, Bes M, Brun Y, Barsotti O, Andre S, Fleurette J.** Restriction endonuclease analysis of *Staphylococcus epidermidis* DNA may be a usefd epidemiological marker. *J Ciin Microbiol* 1988; 26(9): 1729-1734.

25. **Lindsay JA.** Identification of *S. epidermidis* and *S. hominis* from blood cultures by testing susceptibility to desferri-oxamine, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12(2): 127-131.

26. **Whitehead SS, Leavitt RW, Jensen MM.** *Staphylococcus* of turkeys. 6. Development of penicillin resistance in a interfering strain of *S. epidermidis*. *Avian Diseases* 1993; 37(2):536-541.

27. **Harstein AI, Valvano MA, Morthland V, Fuchs P, Potter S, Crosa J.** Antimicrobial susceptibility and plasmid profile analysis as identify test for multiple blood isolates of coagulase negative *Staphylococci*. *J Ciin Microbiol* 1987; 25: 589-593.

28. **Parisi JT, Hecht D.** Simplified method for the isolation, identification and characterization of *S.epidermidis* in epidemiological studies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 1986; 4:29-35.

29. **Wilson CR Totten A, Baldwin JN.** Rapid procedure for the detection of plasmids in *S. epidermidis*. *Appl Environ Microbiol* 1978; 36(2):368-374.

30. **Mickelsen PA, Plorde J, Gordon K, Hargiss S, McEwre C, Shoenknecht F, Condie E, Tenover R Tompkins S.** Inestability of Antibiotic resistance in a strain of *Staphylococcus epidermidis* isolated from an outbreak of prosthetic valve endocarditis. *J Infect Dis* 1985; 152(1):50-57.

31. **Tenover FC, Arbeit RD, Archer G, Byrne S, Goering R, Hancoek G et al.** Comparison of traditional and moleular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin hficrobiol* 1994; 32:407-415.

32. **Arbeit RD.** Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In:

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH (ed.). Manual of Clinical Microbiology: 6th ed. Washington D.C.: ASM, 1995; 190-208

33. **Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Tenover MC.** Antibiotic susceptibility testing by standardized disk diffusion method. Am J Clin Pathol 1966; 45:493-496.

34. **Mahalingam S, Cheon Y, Kan S, Yassin RM, Vadivelu J, Pang T.** Molecular Epidemiologic Analysis of Vibrio cholerae O1 Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J Clin Microbiol 1994; 32(12):2975-2979.

35. **Christensen G, Parisi JT, Bisno AL, Simpson WA, Beechey EH.** Characterization of Clinically significant coagulase negative Staphylococci. J Clin Microbiol 1983; 18:258-269.

36. **Salyers A, Whitt D.** Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach. ASM Press. Washington D.C. 1994.

© **2011 Asociación Colombiana de Infectología.**

Calle 118 No. 15-24 Oficina 503, Bogotá, D. C., Colombia
Teléfono 215 3714 y 215 3517



acin@etb.net.co