

Miguel Fajardo¹
Rocío Hidalgo¹
Jorge Gaitán²
Rosa Sánchez-Silos¹
Paloma Martín-Cordero¹

Sobre los métodos microbiológicos para la detección de la resistencia a oxacilina en *Staphylococcus coagulasa* negativos

¹Servicio de Microbiología. Hospital Infanta Cristina. Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz. Badajoz.

²Sección de Microbiología. Hospital N^o Sra del Prado. Talavera de la Reina, Toledo.

RESUMEN

Introducción. Los *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) forman parte de la microbiota humana y están implicados en infecciones de materiales protésicos, dispositivos intravasculares o bacteriemias relacionadas con el catéter. Presentan mayor resistencia que *Staphylococcus aureus* frente a las diferentes familias de antimicrobianos, y existe un aumento de la morbi-mortalidad de los pacientes cuando se instaura un tratamiento inadecuado.

Material y métodos. Analizar los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas comerciales: dos sistemas de microdilución automática en placa (MicroScan y Vitek2 Compact), aglutinación de la PBP2a con y sin inducción previa con disco de oxacilina de 1 µg, y detección del gen *mecA* mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, para realizar el diagnóstico de resistencia a meticilina en 170 aislados de SCN provenientes de hemocultivos.

Resultados. Se detectó la resistencia a meticilina en las 170 cepas mediante MicroScan, en 167 por Vitek 2 Compact, en 115 mediante PBP2a sin inducción con oxacilina de 1 µg y en 168 tras la inducción. Finalmente, se detectó la presencia del gen *mecA* en 167 cepas mediante amplificación de ácidos nucleicos.

Conclusiones. Es necesario realizar una inducción con oxacilina 1 µg antes de realizar la detección de PBP2a para evitar falsos negativos. Existe una gran variabilidad fenotípica en la expresión de la resistencia a meticilina en SCN.

Palabras clave: *Staphylococcus coagulasa* negativos, resistencia meticilina, métodos diagnósticos

About microbiological methods for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci

ABSTRACT

Introduction. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) take part of the human skin and mucous membranes, but they are also involving in infections with the increasing use of prosthetic, in-dwelling devices or intravascular catheter-related bacteraemia. They are more resistance than *Staphylococcus aureus* against a wide range of antimicrobial agents, and it have been observed an increase in morbidity and mortality of patients with incorrect treatment.

Material and methods. To analyze the results obtained by different commercial techniques: two automatic microdilution systems (MicroScan and Vitek2 Compact), PBP2a agglutination test, with and without 1 µg oxacillin disk induction, and detection of *mecA* gene by nucleic acids amplification techniques, for the diagnosis of methicillin resistance staphylococci in 170 strains of CoNS isolated from blood cultures.

Results. One hundred and seventy methicillin resistance staphylococci were detected by MicroScan, 167 strains by Vitek 2 Compact, 115 strains were PBP2a positive without oxacillin induction and 168 after oxacillin induction. Finally, 167 strains were *mecA* gene positive detected by nucleic acids amplification techniques.

Conclusions. It is necessary to do oxacillin induction before PBP2a test to avoid false negatives. There are a great variability in the phenotypic expression of methicillin resistance in CoNS.

Keywords: Coagulase-negative staphylococci, methicillin resistance, diagnostic methods

Correspondencia:
Miguel Fajardo Olivares
Hospital Infanta Cristina
Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz
Ctra de Portugal s/n - 06080 Badajoz
Tfno: 690081624
E-mail: fajardo.olivares@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*, junto con *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus*. Actualmente están descritas más de 40 especies y subespecies de origen tanto humano como animal (tabla 1). Los *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) forman parte de la microbiota de la piel y mucosas, y están considerados como uno de los mayores gérmenes oportunistas en pacientes con materiales protésicos, dispositivos intravasculares, y bacteriemias relacionadas con el catéter, sobre todo en pacientes diabéticos, niños prematuros y grandes inmaduros, inmunodeprimidos y en pacientes con tratamientos quimioterápicos¹⁻⁴.

A la dificultad para diferenciar entre colonización e infección por SCN en los aislamientos de muestras clínicas, se suma el hecho de que presentan un elevado porcentaje de resistencia frente a diferentes familias de antimicrobianos⁵. Los antibióticos del grupo de los betalactámicos son el tratamiento de elección en cepas sensibles a meticilina. Sin embargo, existe una gran variedad fenotípica en cuanto a la producción o no de resistencia por diferentes mecanismos, siendo su detección más problemática y menos fiable que para *Staphylococcus aureus*^{6,7}. Además, existe un aumento de la morbi-mortalidad de los pacientes con tratamientos inadecuados frente a estos microorganismos.

Por estos motivos, se hace necesario asegurar la fiabilidad del antibiograma para todas las familias de antibióticos, y en especial para los betalactámicos, frente a los diferentes fenotipos de SCN.

El objetivo del estudio fue comparar los resultados obtenidos mediante diferentes métodos comerciales para detectar la resistencia a meticilina en distintas cepas de SCN.

Tabla 1		Taxonomía de los <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos.	
Especies frecuentemente asociadas con enfermedad	Subespecies	Hábitat natural	
<i>S. epidermidis</i>		Humanos, mamíferos domésticos	
<i>S. haemolyticus</i>		Humanos, primates	
<i>S. lugdunensis</i>		Humanos	
<i>S. saprophyticus</i>		Humanos, mamíferos	
Especies raramente asociadas con enfermedad	Subespecies	Hábitat natural	
<i>S. auricularis</i>		Humanos, primates	
<i>S. capitis</i>	capitis	Humanos	
<i>S. capitis</i>	ureolyticus	Humanos, primates	
<i>S. caprae</i>		Humanos, caprinos	
<i>S. carnosus</i>		Cárnicas y pescados	
<i>S. cohnii</i>	cohnii	Humanos	
<i>S. cohnii</i>	urealyticum	Humanos, primates	
<i>S. hominis</i>		Humanos	
<i>S. pasteurii</i>		Humanos, mamíferos	
<i>S. petrasii</i>		Humano	
<i>S. pettenkoferi</i>		Humano	
<i>S. pulverii</i>		Humanos, pollo	
<i>S. saccharolyticus</i>		Humanos	
<i>S. schleiferi</i>	schleiferi	Infecciones humanas	
<i>S. schleiferi</i>	coagulans	Perros	
<i>S. simulans</i>		Humanos, mamíferos	
<i>S. warneri</i>		Humanos, primates, mamíferos domésticos	
<i>S. xylosum</i>		Humanos, mamíferos, aves	

Tabla tomada de: Rupp ME⁵ y Kloos WE⁸.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 170 cepas de diferentes especies de SCN provenientes de hemocultivos considerados clínicamente significativos. La identificación de especie y la sensibilidad a oxacilina se realizaron de forma estandarizada en el laboratorio mediante las pruebas bioquímicas y microdilución automática contenidas en los paneles PC 37 de MicroScan (Beckman Coulter). Este sistema es el que se emplea de forma sistemática en nuestro laboratorio.

Estas cepas se congelaron a -80°C para posteriormente estudiar la resistencia a betalactámicos mediante:

- Tarjeta de antibiograma GP para Vitek 2 Compact 15 (Bio-Merieux).
- Aglutinación en látex frente a la proteína PBP2a (Oxoid), sin y con inducción mediante disco de oxacilina de 1 µg en MH2 con 0.5 de McFarland.
- Medición del halo de sensibilidad mediante cefoxitina 30 µg en MH2 con 0.5 de McFarland.
- Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs del inglés) mediante el kit GenomEra™ MRSA/SA Blood Culture, y procesado en el sistema Abacus, Alere para la detección del gen *mecA*.

En los casos en que fue necesario, se testó la producción de beta-lactamasa mediante disco de nitrocefina (Remel, UK) con procesamiento y lecturas a los 5 y 60 minutos, según las indicaciones del fabricante.

RESULTADOS

De las 170 cepas estudiadas, 123 (72%) fueron *Staphylococcus epidermidis*, 39 (23%) *Staphylococcus hominis*, 3 *Staphylococcus simulans*, 2 *Staphylococcus intermedius*, y un *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus saprophyticus* y

Tabla 2	Número (%) de SCN identificados como resistentes a meticilina según el método empleado.					
	Nº de cepas	MicroScan	PBP2a	PBP2a	Vitek GP	Detección gen <i>mecA</i>
		Sin oxacilina 1 µg		Con oxacilina 1 µg		
170	170 (100%)	115 (68%)	170 (100%)	168 (98%)	167 (98%)	

Tabla 3	Nº de cepas y porcentajes por especie de SCN sin aglutinación a la PBP2a antes y después de la inducción mediante oxacilina 1 µg.		
Especie de SCN	Nº de cepas	Nº de cepas PBP2a negativas sin inducción	Nº de cepas PBP2a negativas tras inducción
<i>S. epidermidis</i>	123	20 (36%)	1
<i>S. hominis</i>	39	29 (23%)	0
<i>S. simulans</i>	3	1 (2%)	0
<i>S. intermedius</i>	2	2 (3%)	0
<i>S. schleiferi</i>	1	1 (2%)	1
<i>S. saprophyticus</i>	1	1 (2%)	0
<i>S. cohnii</i>	1	1 (2%)	1

Staphylococcus cohnii. En la tabla 2 se observa el número de cepas, y sus porcentajes, identificadas como resistentes a meticilina por diferentes métodos comerciales. 53 de las 170 cepas no aglutinaban a la PBP2a sin inducción previa con oxacilina 1 µg. Tras la inducción seguían sin aglutinar dos cepas: un *S. epidermidis* y un *S. schleiferi* que además eran oxacilina resistente, cefoxitina sensible, y *mecA* y PBP2a negativas. Otra cepa, un *S. cohnii* era oxacilina y cefoxitina resistente, *mecA* y PBP2a negativa (tabla 3). La resistencia a oxacilina y cefoxitina sólo mostró discrepancia en las dos cepas anteriormente señaladas.

DISCUSIÓN

Los sistemas comerciales automatizados que se emplean en los laboratorios de microbiología clínica identifican las principales especies productoras de infecciones en humanos, estando limitados a la hora de identificar a nivel de especie y subespecie otros SCN. Para lograr una mayor identificación a nivel de especie, hoy día se emplean NAATs y espectrometría de masa. La identificación definitiva se realiza mediante tarjetas de ácidos nucleicos que incluyen DNA recombinante^{8,9} o por estudios de polimorfismo de ARN¹⁰, si bien estas últimas no se suelen emplear en los laboratorios de diagnóstico clínico.

S. epidermidis es el microorganismo más frecuentemente aislado en bacteriemias relacionadas con catéteres y otros materiales protésicos. *Staphylococcus lugdunensis* está considerado como el SCN más virulento, produciendo infecciones de gravedad similar a *S. aureus*. *Staphylococcus haemolyticus* suele tener una CMI elevada o resistente frente a glicopéptidos, lo que dificulta aún más instaurar tratamientos antibió-

ticos adecuados. *S. saprophyticus* causa infecciones no complicadas del tracto urinario por su capacidad de adhesión al epitelio vesical. Otros SCN se encuentran más raramente asociados a la producción de infecciones en humanos⁵.

En nuestro estudio, la segunda especie aislada con mayor frecuencia fue *S. hominis*. Aunque no sea uno de los SCN considerado como patógeno habitual, cada vez es más frecuente encontrarlo en muestras clínicas, como ocurre en el estudio de Mendoza et al.¹¹, que relacionan este microorganismo con la producción de bacteriemias relacionadas con el catéter, endocarditis y endoftalmítis, sobre todo en pacientes pediátricos e inmunodeprimidos.

Las infecciones por SCN están relacionadas con algunas características fisiopatológicas particulares: a) Están presentes en toda la superficie cutánea del cuerpo en cantidades variables, desde 10 a 10³ UFC/cm² en áreas más secas como son las extremidades, hasta 10³ a 10⁶ UFC/cm² en fosa nasal anterior, axilas, ingles o región perineal¹²; b) Los avances tecnológicos y la mayor supervivencia de pacientes graves hacen que se produzcan numerosas disrupciones de la barrera cutáneo mucosa, debido a la implantación de marcapasos, válvulas cardíacas, prótesis traumatológicas, catéteres, sondas, tratamientos quimioterápicos, etc, que aprovechan los microorganismos que colonizan esas regiones anatómicas; c) La habilidad de adherirse a biomateriales y producir biofilm, que impide el buen funcionamiento de los antimicrobianos y favorece la aparición de émbolos sépticos; d) La presencia de otros factores de virulencia como maduración extracelular del DNA, peptidoglicanos, ácidos poliglucosídicos y toxina delta, que modulan el sistema inmunológico del huésped, o de exoenzimas modificadoras de

ácidos grasos, lipasas, proteasas y elastasas, que producen destrucción de los tejidos del huésped, y los denominados "antibióticos", sustancias que interfieren en la normal colonización cutánea de la flora saprofítica⁵.

Por otro lado, las resistencias adquiridas frente a diferentes familias de antimicrobianos son más frecuentes que en *S. aureus* y otros cocos grampositivos, lo que limita ampliamente la capacidad para instaurar un tratamiento adecuado. Así, en dos estudios realizados en Estados Unidos^{13,14} y Reino Unido¹⁵, se describen tasas de resistencias del 73-88% frente a meticilina, 70-73 % frente a eritromicina, 35-52% frente a clindamicina o 35-48% frente a cotrimoxazol¹⁶. Cifras que coinciden con las encontradas en nuestro entorno: 69% frente a ciprofloxacino o 18% frente a linezolid (datos de estas cepas no publicadas en este trabajo).

La expresión fenotípica de la resistencia a beta-lactámicos testada mediante oxacilina es mucho más heterogénea en los SCN que la observada en *S. aureus*. El punto de corte para una cepa sensible determinado mediante microdilución tanto por EUCAST como por CLSI es $\leq 0,25$ mg/L, salvo para *S. lugdunensis* que es la misma que para *S. aureus* (CMI₉₀ ≤ 2 mg/L). Para evitar falsas cepas sensibles a oxacilina, el CLSI recomienda la utilización de cefoxitina, mejor inductor de la producción de PBP2a. Aún así, los discos de cefoxitina siendo muy sensibles pueden no ser específicos^{17,18}, por lo que el método que se considera de referencia para evitar esta heterogeneidad es identificar la presencia del gen *mecA* mediante NAATs²⁰.

En nuestro estudio, 55 cepas, el 32% del total, no aglutinaron a la PBP2a sin inducción previa mediante disco de oxacilina de 1 μ g. Estas pueden ser cepas con una resistencia heterogénea a la meticilina, con presencia del gen *mecA*, y por lo tanto PBP2a, pero en una pequeña proporción de la colonia, que sólo se detectarían una vez que se seleccionen tras la inducción con el disco de oxacilina¹⁷.

Dos cepas (*S. epidermidis* y *S. schleiferi*) mostraron discrepancias entre oxacilina (resistentes) y cefoxitina (sensibles). Estas cepas, al igual que las denominadas borderline oxacillin-resistant *S. aureus* (BORSA), se caracterizan por presentar una CMI una dilución por encima del punto de corte de resistencia a meticilina. Se pueden dividir en dos categorías en función de si presentan o no el gen *mecA*. Si lo presentan, son cepas muy heterorresistentes que deben ser informadas como resistentes a meticilina. Si no lo presentan, puede deberse a una hiperproducción de beta-lactamasa o a una modificación de las PBPs 1, 2, 4. En nuestro caso, al ser la lectura del disco de nitrocefina positiva, se trata de una hiperproducción de beta-lactamasa. Ambas cepas, que debieron ser informadas como sensibles a meticilina, lo fueron como resistentes, limitándose innecesariamente la capacidad terapéutica del médico.

Un *S. cohnii* presentó resistencia a oxacilina y cefoxitina con ausencia del gen *mecA* y PBP2a. La prueba con disco de nitrocefina fue negativa. Esta situación, aunque poco frecuente, ya la describieron Alexandre-Gorritz et al. en 2014, quienes afirmaron que el gen *mecA* no es el único responsable de la resistencia a meticilina, sino que pueden existir factores cromosómicos, como

los genes implicados en la síntesis de proteínas femXAB, que intervienen en la expresión de la resistencia a meticilina²⁰.

Finalmente, el sistema Vitek informó un *S. epidermidis* y un *S. schleiferi* subespecie *coagulans* con CMI₉₀ para cefoxitina de 2 mg/L como sensible a meticilina en lugar de resistentes. Este sistema utiliza cefoxitina en lugar de oxacilina y presenta una sensibilidad del 98% y especificidad del 100% para *S. epidermidis*, mientras que para *S. hominis* la sensibilidad disminuye hasta el 66%²¹. Mediante NAATs no se detectó la presencia del gen *mecA*. Estas cepas productoras de beta-lactamasa, serían cepas homogéneas, como las descritas por Tomasz et al.²², con una CMI borderline entre sensible y resistente (en nuestro caso de 2 mg/L) que presentarían $< 10^9$ células con CMI₉₀ > 50 mg/L que les conferirían resistencia a meticilina mediante la hiperproducción de PBP1, 2 y 4 modificadas.

Como conclusiones, podemos destacar la necesidad de realizar en todas las cepas de SCN una inducción con oxacilina antes de detectar la presencia de PBP2a, para evitar resultados de falsos negativos. Y debido a la variedad fenotípica de resistencias a meticilina, que podemos encontrar en estos microorganismos, existe un pequeño porcentaje de SCN catalogados como resistentes a meticilina cuando en realidad son sensibles.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10(4):781-91.
2. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in U.S. hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nation wide surveillance study. Clin Infect Dis 2004; 39:309-17.
3. John MA, Pletcher C, Hussain Z. In vitro activity of quinupristin/dalfopristin, linezolid, telithromycin and comparator antimicrobial agents against 13 species of coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother 2002; 50:933-8
4. Nijjar CK, Smith MH, Eltringham IJ. Adjunctive *mecA* PCR routine detection of methicillin susceptibility in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2014; 52(5):1678-81.
5. Rupp ME, Fey PD. *Staphylococcus epidermidis* and other Coagulase-Negative Staphylococci. In Bennett, Dolin and Blaser (Eds). Principle and Practice of Infectious Diseases. 8th edition, Elsevier, Philadelphia PA, 2015. P2272-2282
6. McDonald CL, Maher WE, FassRJ. Revised interpretation of oxacillin MICs for *Staphylococcus epidermidis* base on *mecA* detection. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:982-4.
7. Tenover FC, Jones RN, Swenson JM, Zimmer B, McAllister S, Jorgensen JH. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. J Clin Microbiol 1999; 37:4051-8.
8. Becker K, Von Elif C. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, et al, eds.

- Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington DC: ASM Press; 2011:308-30.
9. Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA space polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59:945-52.
 10. Maes N, De Gheldre Y, De Ryck R. Rapid and accurated identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2477-81.
 11. Mendoza Olazarán S, Martín Otero R, Villareal Treviño L, et al. Antibiotic susceptibility of biofilm cells and molecular characteristic os *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *PLOS One* 2015; 14:1-13.
 12. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significances of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:117-40.
 13. Streit JM, Jones RN, Sader HS. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America 2001). *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:111-8.
 14. Jones RN, Ross JE, Castanheira M, Mendes RE. United States resistance surveillance results for linezolid (LEADER Program for 2007). *Diag Microbiol Infect Dis* 2008; 62:416-26.
 15. Hope R, Livermore DM, Brick G. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-6. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(suppl 2):ii65-ii74.
 16. Fajardo Olivares M, Hidalgo Orozco R, Rodríguez Garrido S, Rodríguez Vidigal FF, Vera Tomé A, Robles Marcos M. Activity of vancomycin, ciprofloxacin, daptomycin, and linezolid against coagulase-negative staphylococci bacteremia. *Rev Esp Quimioter* 2011; 24(2):74-8.
 17. Swenson JM, Tenover FC, Cefoxitin disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 47:1902-5.
 18. Hung KH, Yan JJ, Lu YC, Chen HM, Wu JJ. Evaluation of discrepancies between oxacillin and cefoxitin susceptibility in coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30:785-88.
 19. Batista N, Gutierrez I, Lara M, Laich F, Mendez S. evaluation of the cefoxitin 30 microg disk diffusion method for detection of methicillin -resistance in selected *Staphylococcus aureus* isolates. *Rev Esp Quimioter* 2008; 21:213-6.
 20. Aleixandre-Górriz I, Domínguez-Márquez MV, Martínez-Macias O, Colomina J, Guerrero A. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* portadores del gen *mecA* sensibles a cefoxitina: OS-SARM. *Rev Esp Quimioter* 2014; 27(3):215-6.
 21. Johnson KN, Andreacchio K, Edelstein PH. Detection of methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci by Vitek 2 system. *J Clin Microbiol* 2014; 52:3196-9.
 22. Tomasz A, Drugeon HB, Lencastre HM, Jabes D, McDougall L, Bille J. New mechanism of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2^a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1869-74.