

N. Batista Díaz<sup>1</sup>  
I. Gutiérrez González<sup>1</sup>  
M. Lara Pérez<sup>1</sup>  
F. Laich<sup>2</sup>  
S. Méndez Álvarez<sup>2</sup>

# Evaluación del método de difusión en disco de 30 µg de cefoxitina en la detección de resistencia a meticilina en aislamientos seleccionados de *Staphylococcus aureus*

<sup>1</sup> Sección de Microbiología  
<sup>2</sup> Unidad de Investigación

Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria  
Santa Cruz de Tenerife

Los tests de oxacilina habituales pueden fallar en la detección de ciertos casos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad del método de difusión en disco de cefoxitina (30 µg) para detectar la resistencia a meticilina en aislados de *S. aureus* con características atípicas de resistencia.

Se estudiaron 53 aislados de *S. aureus*. La sensibilidad de los mismos se estudió mediante el sistema Vitek, y los tests de oxacilina y de cefoxitina mediante difusión en discos (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI] 2007); la resistencia a oxacilina se confirmó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple previamente descrita que permite la identificación de *S. aureus* y la detección simultánea de resistencia a meticilina. Los aislados *mecA* positivos que presentaban crecimiento en la zona de inhibición al exponerlos a oxacilina se consideraron heterorresistentes; los que eran *mecA* negativos pero con sensibilidad intermedia o resistencia a oxacilina se consideraron límite (*borderline*). Todos los aislados se ensayaron frente al disco de 30 µg de cefoxitina según normas CLSI (sensibilidad:  $\geq 22$  mm; resistencia:  $\leq 21$  mm). Las cepas de control para todos los ensayos incluyeron *S. aureus* resistente a meticilina ATCC 43300 y *S. aureus* sensible a meticilina ATCC 25923. Los aislados formaron cuatro grupos. Grupo I: 20 aislados multirresistentes, sensibles a oxacilina y *mecA* negativos; grupo II: 16 aislados con resistencia o sensibilidad intermedia a oxacilina y *mecA* negativos; grupo III: 11 aislados heterorresistentes y *mecA* positivos; grupo IV: seis aislados *mecA* positivos con perfiles atípicos de resistencia (penicilina y oxacilina; ciprofloxacino y eritromicina).

Treinta y cinco aislados *mecA* negativos incluidos en los grupos I y II mostraron zonas de inhibición  $\geq 22$  mm; un aislado del grupo II mostró un halo de 20 mm. Los 17 aislados *mecA* positivos de los grupos III y IV mostraron resistencia frente al disco de cefoxitina.

Podemos concluir que el método de difusión en disco de cefoxitina de 30 µg es eficiente para la detección de resistencia a meticilina y permite una clara definición de aquellos aislados de *S. aureus*, incluidos aquellos con características atípicas de resistencia.

**Palabras clave:**  
*Staphylococcus aureus*. Cefoxitina. Resistencia a meticilina.

*Rev Esp Quimioter* 2008;21(4):213-216

## Evaluation of the cefoxitin 30 µg disk diffusion method for detection of methicillin-resistance in selected *Staphylococcus aureus* isolates

Oxacillin tests may fail to detect some methicillin-resistant *S. aureus* populations. The objective of this study is to evaluate the discriminative capacity of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) disk diffusion method with a cefoxitin 30 µg disk on *S. aureus* isolates with unusual phenotypic characteristics of antimicrobial resistance.

We studied 53 clinical *S. aureus* isolates. The antimicrobial susceptibility of all isolates was routinely studied by the VITEK 2 System (bioMérieux). Methicillin resistance was also studied by CLSI oxacillin method and confirmed by a previously described multiplex polymerase chain reaction (PCR) method which permits *S. aureus* identification and simultaneous detection of methicillin resistance. *MecA* positive isolates presenting a diffuse growth within the zone of inhibition when exposed to oxacillin were considered heteroresistant; *mecA* negative, oxacillin intermediate or resistant isolates were considered borderline. All the isolates were tested with a cefoxitin 30 µg disk, according to the CLSI guidelines (susceptibility:  $\geq 22$  mm; resistance:  $\leq 21$  mm). Control strains for all assays included MRSA ATCC 43300 and MSSA ATCC 25923. The isolates formed four groups. Group I: 20 multiresistant, oxacillin susceptible and *mecA* negative isolates; group II: 16 resistant or with intermediate oxacillin susceptibility and *mecA* negative

Correspondencia:  
Magdalena Lara Pérez  
Hospital Universitario Ntra. Sra. de la Candelaria  
Ctra. del Rosario s/n  
38010 Santa Cruz de Tenerife  
Correo electrónico: laramagda@yahoo.es

isolates; group III: 11 heteroresistant and *mecA* positive isolates; group IV: six *mecA* positive isolates with atypical resistance profiles (penicillin and oxacillin, or ciprofloxacin and erythromycin resistance).

Thirty-five *mecA* negative isolates included in groups I and II showed inhibition zones  $\geq 22$  mm; one isolate from group II showed 20 mm. The 17 *mecA* positive isolates from groups III and IV showed resistance to cefoxitin disk.

The 30 µg cefoxitin disk diffusion method is proposed as an efficient method for the detection of methicillin resistance and permits a clear determination set *S. aureus* isolates, even those with atypical antimicrobial characteristics.

**Key words:**

*Staphylococcus aureus*. Cefoxitin. Methicillin-resistance.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de la resistencia a meticilina en aislados de *S. aureus* ha supuesto un desafío para los laboratorios de Microbiología: a la necesidad del control en la diseminación de estos aislamientos se ha unido en numerosas ocasiones la dificultad de determinar con seguridad si un determinado aislado era realmente poseedor del gen *mecA*, determinante de la resistencia a todos los betalactámicos, lo que obligaba a utilizar unas condiciones especiales al realizar el estudio de sensibilidad a oxacilina y/o al empleo de medios alternativos de diagnóstico<sup>1</sup>; en los últimos años se han desarrollado y estudiado algunos de estos métodos de detección más o menos sofisticados o costosos<sup>2</sup>. La detección del gen *mecA* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es hoy el método de referencia, aunque no de aplicación sistemática.

En el año 2001, Mougéot et al.<sup>3</sup> propusieron el uso de un disco de 30 µg de cefoxitina, utilizando el método de difusión, para determinar la resistencia a meticilina. Desde entonces, diversos estudios han ensayado el empleo del disco de cefoxitina con dicho fin, hallando todos ellos que se trata de una opción sencilla y económica<sup>2,4-8</sup>.

El objetivo de nuestro estudio es determinar la utilidad del uso del disco de 30 µg de cefoxitina en el estudio de la resistencia a meticilina en aislamientos clínicos de *S. aureus*, previamente seleccionados según determinados caracteres fenotípicos de resistencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Aislamientos bacterianos

Estudiamos 53 aislados clínicos de *S. aureus* obtenidos en el Hospital Universitario N. S.<sup>a</sup> de la Candelaria de Santa Cruz de Tenerife. Los aislados se mantuvieron almacenados

a -80 °C hasta su estudio y sólo se estudió un aislado por paciente. *S. aureus* se identificó mediante prueba de la catalasa, tinción de Gram, fermentación en medio Chapman (MSA2; bioMérieux), por el test de coagulación en tubo (Coagulase plasme rabbit with EDTA; BD BBL™), y la producción de term nucleasa en placa (DNASA AGAR; bioMérieux). Se incluyeron como cepas de control de *S. aureus*: ATCC 25923 (sensible a meticilina) y ATCC 43300 (heterorresistente).

### Análisis del gen *mecA*. Reacción en cadena de la polimerasa múltiple

Se aplicó un protocolo de PCR que permite la detección del gen *mecA* y la identificación simultánea de los aislados de *S. aureus* a nivel de especie. Tras la PCR, los fragmentos amplificados fueron analizados mediante electroforesis de agarosa (1%)<sup>9</sup>.

### Métodos de estudio de la sensibilidad

#### Test de difusión en discos de oxacilina y cefoxitina

El test de difusión en disco (DD) se llevó a cabo preparando un inóculo ajustado al 0,5 de McFarland y extendiéndolo sobre placa de agar Muller Hinton (bioMérieux). Se utilizaron discos de oxacilina de 1 µg y discos de cefoxitina de 30 µg (BD BBL™ Sensi-Disc). Se aplicaron las normas CLSI 2007<sup>10</sup>.

#### Vitek 2

Los tests de sensibilidad con el sistema Vitek 2 (bioMérieux) se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante, empleando las tarjetas AST-P523 y AST-P536 (rango de concentración mínima inhibitoria [CMI] de oxacilina: 0,25-4 µg/ml). Para la lectura de resultados se aplicaron los puntos de corte propuestos para oxacilina en *S. aureus* por CLSI 2007.

### Clasificación de los aislados de *Staphylococcus aureus*

Los aislamientos se clasificaron en 4 grupos, según las lecturas obtenidas mediante el sistema Vitek 2 y en el test DD de oxacilina, tras aplicar los criterios que establecen las normas CLSI 2007, y en función además de la presencia o ausencia del gen *mecA*.

#### Grupo I

Formado por 20 aislamientos que mostraron un perfil de multirresistencia y sensibilidad a oxacilina tras su estudio en el sistema Vitek 2, eran sensibles a oxacilina en el test DD, y eran *mecA* negativos.

**Grupo II**

Constituido por 16 aislamientos que presentaron un resultado de sensibilidad intermedia o resistencia a oxacilina en el sistema Vitek 2 y en el test DD, y eran además *mecA* negativos.

**Grupo III**

Formado por 11 aislamientos heterorresistentes frente a oxacilina. Nueve de los aislamientos se mostraron resistentes a oxacilina en el sistema Vitek 2; los dos restantes fueron sensibles. En el test DD de oxacilina todos presentaron velos en el interior del halo de inhibición, y además eran portadores del gen *mecA*.

**Grupo IV**

Comprende 6 aislamientos con perfiles atípicos de resistencia: cinco aislamientos que fueron solamente resistentes a penicilina y oxacilina, y un aislamiento que sólo se mostró resistente a ciprofloxacino y eritromicina. Todos fueron resistentes en el test DD de oxacilina y *mecA* positivos.

lados), de los grupos I y II, presentaron CMI de oxacilina de 0,5-1 µg/ml.

Por otra parte, en los grupos I, II y III, todos los aislados fueron resistentes al menos a tres antimicrobianos (no betalactámicos) pertenecientes a distintas familias.

**Resultados de sensibilidad en el test de difusión en disco de 30 µg de cefoxitina**

En todos los casos los halos de inhibición obtenidos en el test de difusión en disco de cefoxitina fueron de fácil lectura, puesto que los bordes eran nítidos y no se observaron fenómenos de heterorresistencia ni de crecimiento difuso.

Tal como se muestra en la tabla 1, hubo una correlación muy buena entre la presencia o ausencia del gen *mecA* y la resistencia o sensibilidad, respectivamente, frente a cefoxitina en los aislados estudiados. Solamente hallamos un aislado en el grupo II que carecía del gen *mecA*, fue resistente a penicilina y oxacilina tras su estudio en Vitek 2, mostró un halo intermedio (11 mm) en el test DD de oxacilina y mostró un halo de 20 mm en el test DD de cefoxitina, lo que determinaría su clasificación como resistente según las normas CLSI 2007.

**RESULTADOS****Características de resistencia a oxacilina y otros antimicrobianos no betalactámicos**

Tal y como se recoge en la tabla 1, la práctica totalidad de los aislados *mecA* positivos (grupos III y IV) presentaron una CMI de oxacilina  $\geq 4$  µg/ml, mientras que la mayor parte de los aislados *mecA* negativos (26 de un total de 36 ais-

**DISCUSIÓN**

La resistencia a meticilina (RM) en *S. aureus* se asocia con la producción de una proteína alterada, PBP2a, codificada por el complejo génico *mecA*. En los últimos años se han propuesto numerosos métodos de detección de dicha alteración<sup>1,2</sup>. Todos ellos pretenden detectar la resistencia a meticilina de cualquier aislado de *S. aureus* incluyendo aquellos que muestran un fenotipo heterogéneo de resistencia, los que tienen

Tabla 1

Características de resistencia a cefoxitina, oxacilina y otros antimicrobianos en aislados seleccionados de *Staphylococcus aureus*

mecA	Grupos	Características	n	Cefoxitina (30 µg)		Oxacilina µg				Resistencias a antibióticos no betalactámicos			
				Sensible	Resistente	0,25	0,5	1-2	$\geq 4$	FQ <sup>a</sup>	AG <sup>b</sup>	ER <sup>c</sup>	CD <sup>d</sup>
Negativo	I	Multirresistencia y sensibilidad a oxacilina	20	20	0	5	15	0	0	14	11	17	13
	II	Sensibilidad intermedia o resistencia a oxacilina	16	15	1 <sup>e</sup>	5	10	1	0	6	3	8	6
Positivo	III	Heterorresistencia a oxacilina	11	0	11	0	1	0	10	9	8	4	4
	IV	Perfil atípico de resistencia	6	0	6	1	0	0	5	1	1	1	0

Fq: fluorquinolonas; AG: aminoglucósidos; ER: eritromicina; CD: clindamicina; <sup>a</sup> Aislado resistente a penicilina y oxacilina (Vitek 2), test de difusión en disco de oxacilina: 11 mm (crecimiento en el interior del halo de inhibición).

una resistencia a oxacilina de bajo nivel, así como diferenciar los verdaderos *S. aureus* RM de los *borderline*. La técnica que ha mostrado resultados de sensibilidad mayores del 90% es la de aglutinación de látex que detecta la PBP2a, y aunque es un método rápido, supone un coste apreciable<sup>1,2</sup>.

El método de referencia para la detección de RM es el estudio del gen *mecA*, que hoy se halla limitado a los laboratorios de microbiología de referencia, y no es aplicable a la práctica diaria.

La cefoxitina es una cefamicina que actúa como un inductor más fuerte que la oxacilina sobre la producción de PBP2 en aislados de *S. aureus* que poseen el gen *mecA*; por lo tanto parece más eficaz que la oxacilina en la detección de la resistencia a meticilina mediante el test DD, al menos en aquellas poblaciones de *S. aureus* que son heterorresistentes<sup>5</sup>.

Fue en el año 2001 cuando Mougeot et al.<sup>3</sup> propusieron por primera vez la utilización del test DD de cefoxitina como una alternativa sencilla para el estudio de la RM. Diversos estudios realizados desde entonces con aislamientos de *S. aureus* han mostrado su utilidad; sin embargo, sólo algunos mencionan el hecho de haber estudiado aislados de *S. aureus* especialmente seleccionados por las características de resistencia que plantean los principales problemas de detección de la RM<sup>2,4,8</sup>.

En la actualidad, muchos laboratorios utilizan varios métodos de detección de la RM. En nuestro laboratorio utilizamos el sistema Vitek 2 para el estudio sistemático de la sensibilidad en estafilococos, siendo éste uno de los métodos comerciales automatizados que ofrecen una mayor sensibilidad en la detección de la RM<sup>7</sup>. Rutinariamente comprobamos la RM de aquellos aislamientos de *S. aureus* que son sensibles a oxacilina pero multirresistentes, y cuando los aislamientos presentan perfiles de resistencia poco frecuentes, ya que estos perfiles han sido asociados con la resistencia a meticilina en los aislamientos de *S. aureus* procedentes de la comunidad<sup>11</sup>.

Por otra parte, diversos estudios realizados en los últimos años han ensayado otras propuestas distintas a la CLSI para la realización e interpretación de la lectura del test DD de cefoxitina. En algunos casos emplean el medio agar IsoSensitest o se ensaya un crecimiento semiconfluente para el test DD; consecuentemente, los puntos de corte para la lectura del test de sensibilidad difieren de los señalados por CLSI 2007<sup>4,8</sup>. En dichos estudios se obtuvieron resultados de sensibilidad de 96-100%, y de especificidad de 99-100%<sup>2,4,8</sup>.

El protocolo aplicado en nuestro estudio aplica el método propuesto por CLSI 2007, utilizando agar Muller Hinton, a una temperatura de 35 ± 2° C y 16-18 h de incubación, siendo el punto de corte para la sensibilidad ≥ 22mm. De esta forma hemos logrado detectar la resistencia a la meticilina con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98% en aislados con perfiles de resistencia poco habituales y resistencia heterogénea

a meticilina. Sólo hallamos un aislado (en el grupo II) que se mostró resistente a cefoxitina a pesar de no poseer el gen *mecA*; este tipo de discrepancia podría explicarse por la presencia de algún otro mecanismo como la alteración de proteínas fijadoras de penicilinas (*penicillin-binding proteins*, PBP) que podrían estar causadas por mutaciones<sup>7</sup>.

Concluimos por tanto que el método del test DD de cefoxitina aplicando las normas CLSI 2007 es sensible y poco costoso para la detección de la resistencia a meticilina en el trabajo habitual en el laboratorio de microbiología clínica, incluso en aislados de *S. aureus* con fenotipos poco usuales de resistencia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Swenson JM, Hindler JF, Jorgensen JH. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. En: Murray PR, Baron JB, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White O, editores. Manual of Clinical Microbiology 8.ª ed. Washington DC: ASM Press, 2003:1178-95.
2. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-Screen latex agglutination test. J Clin Microbiol 2002;40:2766-71.
3. Mougeot C, Guillaumat-Tailliet J, Libert JM. *Staphylococcus aureus*: nouvelle détection de la résistance intrinsèque par la méthode de diffusion. Pathol Biol 2001;49:199-204.
4. Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Møller N, Olson-Liljequist B et al. Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2003;52:204-7.
5. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004;23:389-92.
6. Swenson JM, Tenover FC, Cefoxitin Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol 2005;43:3818-23.
7. Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, Thompson A, Jevitt L, Zhu W, et al. Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;58:33-9.
8. Witte W, Pasemann B, Cuny C. Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2007;13:408-12.
9. Pérez-Roth E, Claverie-Martin F, Villar J, Méndez-Álvarez S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. J Clin Microbiol 2001;39:4037-41.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; seventeenth informational supplement. Document M100-S17. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
11. Broseta A, Chaves F, Rojo P, Otero JR. Emergencia de un clon de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario en la población pediátrica del sur de Madrid. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006;24:31-5.