

Gertrudis Horna¹
Lizeth Astocondor¹
Jan Jacobs²
Coralith García¹

Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

¹Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima Perú.

²Instituto de Medicina Tropical Príncipe Leopoldo II, Amberes, Bélgica

RESUMEN

Introducción. Cefoxitina es un potente inductor del gen *mecA*. Actualmente es recomendado como método de detección presuntiva para la identificación de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). El objetivo del estudio fue comparar la sensibilidad y especificidad de la difusión en disco de cefoxitina (30µg) con la prueba de crecimiento en agar suplementado con oxacilina frente a la detección del gen *mecA* por PCR.

Material y métodos. Trecientos treinta y una cepas de *S. aureus* aisladas de hemocultivos de pacientes de hospitales de Lima fueron utilizadas en el estudio. Se realizaron las siguientes pruebas a todas las cepas: crecimiento en agar suplementado con 4% de NaCl y 6 mg/L de oxacilina, difusión de cefoxitina (30 µg) y la PCR para amplificar el gen *mecA*.

Resultados. De los 331 aislamientos de *S. aureus* analizados, en 165 se detectó la presencia del gen *mecA*, lo que hace una frecuencia de detección de SARM de 50%. Al evaluar la prueba de difusión en disco de cefoxitina se observó una sensibilidad y especificidad, 96,3% y 90,9 %, respectivamente.

Conclusión. La prueba de difusión en disco de cefoxitina correlacionó con la detección del gen *mecA* por PCR. Por lo tanto, la prueba puede ser una alternativa a la PCR para la detección de SARM en aquellos lugares con limitados recursos.

Palabras clave: gen *mecA*, *Staphylococcus aureus* resistencia a meticilina, heteroresistente, cefoxitina

Phenotypic methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Background. Cefoxitin is a potent inducer of the *mecA* gene. It is currently as a screening recommended method for presumptive identification of isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The aim of the study was to compare the sensitivity and specificity of the cefoxitin disc diffusion (30µg) to oxacillin agar screening from detection of the *mecA* gene by PCR.

Methods. Three hundred thirty-one strains of *S. aureus* isolated from blood cultures of patients from hospitals in Lima were used in the study. The following tests were performed: oxacillin screening agar (plates were inoculated with 4% NaCl and 6 mg/L of oxacillin), cefoxitin disc diffusion test (30 µg) and PCR to amplify the *mecA* gene.

Results. The *mecA* gene was detected in 165 out of 331 *S. aureus* isolates. Thus, the frequency of detection of MRSA was 50%. The evaluation of the cefoxitin disc diffusion test showed a 96.3% and 90.9% of sensitivity and specificity, respectively.

Conclusion. Cefoxitin disc diffusion test correlated well with detection of the *mecA* gene by PCR. Therefore, this test can be an alternative to PCR for detection of MRSA in limited resources settings.

Key Words: *mecA* gene, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, heteroresistance, cefoxitin.

INTRODUCCIÓN

La infección por *Staphylococcus aureus* es un problema de salud pública. *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) es un patógeno ampliamente diseminado en el ambiente hospitalario y más recientemente en la comunidad. La resistencia a meticilina está producida por la adquisición del gen *mecA* que se encuentra localizado en el cassette cromosómico estafilocócico *mec* (*SCC-mec* por sus siglas en inglés), el cual permite la codificación

Correspondencia:
Gertrudis Horna
Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima Perú. Av.Honorio Delgado # 430 - Urb Ingenieria - SMP - Lima- Perú. Teléfono: 00511482 39 10 - anexo 20.
E-mail: sara.horna@upch.pe

de la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a)¹. Otros factores además del gen *mecA* están involucrados en modular la expresión de la resistencia a meticilina (como los genes *fem* y *aux*). Esta variación en la expresión del gen *mecA* explica la existencia de poblaciones homogéneas y heterogéneas del SARM. Las cepas de SARM hospitalarias frecuentemente presentan elevado nivel de resistencia a oxacilina y coresistencia a numerosos antibióticos, y son rápidamente detectados por métodos estandarizados de sensibilidad antimicrobiana. Por el contrario, las infecciones causadas por SARM adquiridos en la comunidad frecuentemente presentan un variable grado de resistencia a oxacilina, dependiendo de la expresión del gen *mecA*, y por tanto son más difíciles de detectar por los métodos de sensibilidad². Diferentes métodos fenotípicos están disponibles para detectar la resistencia a meticilina, crecimiento en agar suplementado con oxacilina, la difusión en disco de cefoxitina, y el test de aglutinación en látex para la detección de la PBP2a. Sin embargo, el método considerado como estándar es la detección molecular del gen *mecA* a través de técnicas de PCR³.

En este estudio, nosotros comparamos la sensibilidad y especificidad de tres métodos sugeridos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁴ para la detección de la resistencia a oxacilina en *S. aureus* (i) crecimiento en agar suplementado con oxacilina, (ii) el disco de cefoxitina, el cual se emplea como un sustituto de la oxacilina dado que el CLSI 2014 ha mencionado que la prueba de disco de oxacilina no es fiable (iii) determinación del gen *mecA*.

MATERIAL Y METODOS

Recolección de muestras. Un total de 331 aislamientos de *S. aureus* procedentes de hemocultivos de nueve hospitales de la ciudad de Lima fueron usados en este estudio. Los aislamientos fueron identificados como *S. aureus* usando las pruebas estándar como crecimiento en agar manitol salado, catalasa, coagulasa en lámina y tubo y tinción de Gram. La cepa de *S. aureus* ATCC 25923 y la cepa de *S. aureus* resistente a meticilina ATCC 43300 fueron empleadas para realizar el control de calidad en todos los ensayos de este estudio.

Crecimiento en agar suplementado con oxacilina. Se prepararon placas de agar Mueller Hinton con 4 % de cloruro de sodio y 6 mg/L de oxacilina. Las placas fueron inoculadas con 1 µL de una suspensión semejante a la escala 0,5 McFarland, la suspensión fue realizada a partir de un inóculo de 24 horas de crecimiento en placas de Trypticase Soja Agar. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 33°C a 35°C y observadas con luz transmitida para visualizar el crecimiento. Cualquier crecimiento a las 24 horas fue considerado como resistente a oxacilina.

Prueba de difusión en disco de cefoxitina. Se emplearon discos de cefoxitina

(30 µg). Una suspensión semejante a la escala 0,5 McFarland fue realizada a partir de un inóculo de 24 horas de crecimiento y fue sembrada por diseminación en una placa de agar Mueller Hinton. Las placas fueron incubadas a 37°C por 18 horas. Un aislamiento fue considerado resistente a meticilina si presentaba un halo de inhibición de cefoxitina ≤ 21 mm.

Determinación del gen *mecA*. Se detectó el gen *mecA*, empleando la metodología de PCR real time propuesta por Donker et al⁵.

RESULTADOS

De los 331 aislamientos de *S. aureus* analizados, en 165 se detectó la presencia del gen *mecA*, lo que hace una frecuencia de detección de SARM de 50%. La mayor sensibilidad se obtuvo con la prueba de crecimiento en agar suplementado con oxacilina (98,1%), sin embargo fue la que tuvo mayor tasa de falsos positivos (11,5%). Al evaluar la prueba de difusión en disco de cefoxitina se observó una sensibilidad y especificidad de 96,3 y 90,9%, respectivamente (tabla 1).

DISCUSION

De nuestros hallazgos podemos observar que la resistencia a meticilina fue del 50%, resultados que son similares a los obtenidos en estudios previos realizados en nuestro medio en el que se ha informado un 58% de resistencia a nivel de tres hospitales de Lima⁶. A nivel de países de nuestra región, como Colombia, Ecuador y Venezuela se ha observado que la prevalencia de SARM fue del 45, 28 y 62%, respectivamente⁷.

Al evaluamos los tres métodos para detectar cepas de SARM observamos que de estos el crecimiento en agar suplementado con oxacilina tiene una sensibilidad del 98,1% a diferencia del método de difusión en disco de cefoxitina, sin embargo su especificidad fue del 88,5%. Estudios previos han demostrado que el crecimiento en agar suplementado con oxacilina puede identificar aquellos aislamientos que son *mecA* positivos, sin embargo, ocasionalmente, aquellas cepas heteroresistentes no son detectadas debido a la expresión disminuida de resistencia. Así, en diversos estudios en los cuales se han incluido cepas cuya resistencia es heterogénea, estas no han sido detectadas. Además, se ha observado que las diluciones en agar y el método difusión en disco de oxacilina podrían ser afectados por varios componentes del agar Mueller Hinton, así como de la temperatura y duración del tiempo de incubación^{8,9}.

Tabla 1		Sensibilidad y especificidad de los métodos de diagnóstico para la detección de SARM		
Método diagnóstico	Detectadas como SARM	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	
Cefoxitina disco difusión (30 µg)	159	96,3	90,9	
Crecimiento en agar suplementado con oxacilina (6 mg/L)	162	98,1	88,5	
PCR para detección del gen <i>mecA</i>	165	100	100	

Número total de aislamientos de *S. aureus*

Respecto a la sensibilidad y especificidad de la prueba de difusión en disco de ceftiofina observamos que fue del 96,3 y 90,9%, respectivamente. Anand et al. obtuvieron un 100% de sensibilidad y especificidad para esta prueba en 50 cepas analizadas mientras que los resultados del crecimiento en agar suplementado con oxacilina fueron igual de precisos. Asimismo se observó que los resultados de la difusión en disco de ceftiofina se encontraron en concordancia con la detección del gen *mecA* por PCR, tal como fue observado en nuestro estudio. Además, se ha observado que la prueba con el disco de ceftiofina es más fiable que el disco de oxacilina para la detección del SARM⁸.

Las cefamicinas (ceftiofina) son antibióticos β -lactámicos que tienen una elevada afinidad por la PBP4 de *S. aureus*; y experimentos previos han mostrado una relación entre PBP2, PBP4, y la resistencia a meticilina^{2,10}. Caulwelier et al. proponen que la ceftiofina sería un mejor inductor de la expresión del gen *mecA*, lo cual podría explicar por qué poblaciones heterogéneas del SARM que variablemente expresan el gen *mecA* se detectan mejor por difusión en disco con ceftiofina que con oxacilina, el cual es un inductor débil de la producción de la PBP2a².

En conclusión, la difusión en disco de ceftiofina es muy adecuada para la detección del SARM y la prueba puede ser una alternativa a la PCR para la detección del SARM en contextos de restricción de recursos. La prueba difusión en disco de oxacilina podría fallar para detectar poblaciones heterogéneas de SARM, un problema que es eliminado por el uso de ceftiofina, el cual como se ha mencionado es un buen inductor de la producción de la PBP2a en aislamientos de *S. aureus* que portan el gen *mecA*. Por otro lado en nuestro estudio a pesar de incluir un número importante de cepas de *S. aureus* desconocemos la diversidad genética de estas lo cual nos permitiría conocer la presencia de poblaciones heteroresistentes.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue auspiciado por el Proyecto Colaborativo Belga FA3-Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima Perú.

BIBLIOGRAFIA

1. Broekema NM, Van TT, Monson TA, Marshall SA, Warshauer DM. Comparison of ceftiofina and oxacillin disk diffusion methods for detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. *J Clin Microbiol* 2009; 47:217-9.
2. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with ceftiofina (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:389-92.
3. de Sousa Júnior FC, Néri G da Silva G, Silva AK, de Araújo BP, de Paiva Dourado Guerra MJ, Britto Costa Fernandes MJ, et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in a university hospital located in the northeast of Brazil. *Braz J Microbiol* 2010;41:316-20.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth Informational Supplement. Wayne, Pa : CLSI, 2014.
5. Donker GA, Deurenberg RH, Driessen C, Sebastian S, Nys S, Stobberingh EE. The population structure of *Staphylococcus aureus* among general practice patients from The Netherlands. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:137-43.
6. Tamariz J, Agapito J, Horna G, Tapia E, Vicente W, Silva M, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. *Rev Med Hered* 2010;21:4-10.
7. Mejia C, Zurita J, Guzmán-Blanco M; Grupo Latinoamericano de Trabajo sobre Resistencia en Gram-Positivos. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Rev Chil Infectol* 2010; 27(Suppl 2): 51-8.
8. Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. Comparison of ceftiofina disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27:27-9.
9. Fernandes CJ, Fernandes LA, Collignon P; Australian Group on Antimicrobial Resistance. Ceftiofina resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2005 ; 55:506-10.
10. Memmi G, Filipe SR, Pinho MG, Fu Z, Cheung A. *Staphylococcus aureus* PBP4 is essential for beta-lactam resistance in community-acquired methicillin-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3955-66.