

Original breve

Rocío Sáinz-Rodríguez
Inmaculada de Toro-
Peinado
Miriam Valverde-Troya
M^a Pilar Bermúdez Ruíz
Begoña Palop-Borrás

Evaluación de una prueba rápida para la detección de PBP2a en *Staphylococcus aureus*

Servicio de Microbiología. UGC Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva. Hospital Regional Universitario de Málaga

Article history

Received: 15 February 2019; Revision Requested: 21 March 2019; Revision Received: 17 April 2019; Accepted: 25 April 2019

RESUMEN

Introducción. En los últimos años se ha producido un incremento de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). En comparación con las producidas por *S. aureus* sensible a meticilina (SASM), las infecciones por SARM requieren estancias hospitalarias más prolongadas y presentan mayor mortalidad. La detección rápida de la resistencia a la meticilina por la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP2a) es crucial para evitar la diseminación nosocomial e instaurar una correcta terapia antimicrobiana. Nos proponemos evaluar el test inmunocromatográfico rápido para la detección de PBP2a directamente de colonias de *S. aureus*, PBP2a SA Culture Colony Test® (ICPBP2a).

Material y métodos. En 107 cepas de *S. aureus* se estudió la resistencia a meticilina mediante las siguientes pruebas: el sistema automatizado Vitek2® (bioMérieux), CHROMagar MRSA II® (BD Becton Dickinson), difusión con disco de cefoxitina, la ICPBP2a (Alere™) y como método de referencia, la detección molecular del gen *mecA*.

Resultados. La sensibilidad y especificidad para las pruebas de detección fueron para la difusión en agar con disco de cefoxitina 100% y 100% respectivamente, Vitek2® 100% y 100%, CHROMagar™ MRSA II 100% y 96%, y la ICPBP2a 98,25% y 100%.

Conclusión. La inmunocromatografía para la detección de PBP2a es una técnica rápida, fácil y económica. Resulta muy útil para el manejo de brotes hospitalarios.

Palabras clave: PBP2a, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, inmunocromatografía.

Evaluation of a rapid assay for detection of PBP2a *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Background. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a significant pathogen causing both health-care-associated and community-acquired infection. Rapid and accurate detection of this pathogen is crucial for the use of appropriate antimicrobial therapy and the control of nosocomial spread.

Methods. A total of 107 *S. aureus* strains were assayed for methicillin resistance: Vitek2® (bioMérieux), CHROMagar™ MRSA II (BD Becton Dickinson), disk diffusion in agar for cefoxitin 30 µg and immunochromatography PBP2a SA Culture Colony Test (Alere™). The results of conventional tests were compared with the "gold standard" PCR test for *mecA* gene.

Results. Sensitivity and specificity were: disk diffusion for cefoxitin 100% and 100% respectively, Vitek2® 100 and 100%, CHROMagar™ MRSA II 100 and 96%, and ICPBP2a detection 98,25% and 100%.

Conclusion. ICPBP2a Culture Colony Test (Alere™) is fast, efficient and economical technique for detection of penicillin binding protein 2a (PBP2a) from isolates. This assay is a useful tool for the management of hospital outbreaks.

Keywords: PBP2a, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, immunochromatography

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es un microorganismo que frecuentemente coloniza la piel del hombre sano, pero que también está involucrado en infecciones tanto de origen comu-

Correspondencia:
Begoña Palop-Borrás
Servicio de Microbiología
Hospital Regional Universitario de Málaga
Avda. Carlos Haya, s/n 29010 Málaga
E-mail: bpalop@hotmail.com

nitario como hospitalario. Es una de las principales causas de infecciones en la piel, tejidos blandos y huesos, además de bacteriemias y sepsis [1].

S. aureus adquiere la resistencia a meticilina y a otros β -lactámicos principalmente por el gen *mecA*, que codifica la producción de una proteína de unión a penicilina suplementaria, PBP2a o 2', que se expresa de manera homogénea o heterogénea, y menos frecuentemente por el gen *mecC* [2]. *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) es un patógeno nosocomial de gran importancia a nivel mundial y ha incrementado la frecuencia de infecciones adquiridas en la comunidad con una significativa morbi-mortalidad [1,3].

Distintos estudios indican que, según las tasas de mortalidad, las cepas de SARM son más virulentas que las cepas de *S.aureus* susceptibles a la meticilina (SASM)[4].

Según los datos proporcionados por el ECDC en 2017, el número de aislamientos invasivos de SARM es variable para los distintos países europeos (entre el 1% y el 44,4%), y dentro de estos, España se ha mantenido con cifras importantes del 25,3% y que han ido en ligero aumento en estos últimos años (22,1% en 2014, 25,3 % en 2015, 25,8% en 2016) [5]. En nuestro medio es por tanto de crucial importancia el conocimiento de la susceptibilidad a meticilina para instaurar el tratamiento empírico correcto, teniendo en cuenta que el uso de la vancomicina, que sería la alternativa en caso de SARM[6], se asocia con una tasa de mortalidad más alta que los β -lactámicos en el tratamiento de la bacteriemia por SASM [7]. Además, permite que los pacientes reciban una terapia antimicrobiana dirigida más rápidamente con las implicaciones que conlleva en salud en infecciones graves como las bacteriemias por SARM [8,9].

Todos estos datos demuestran la importancia de la detección temprana de estas cepas de SARM para instaurar un correcto y rápido tratamiento.

Clásicamente, la sensibilidad a la meticilina se determina por las pruebas de susceptibilidad en disco o con métodos automatizados, pero todos ellos necesitan al menos 24-48 horas para su realización a partir del aislamiento en placa de *S.aureus* [2]. La incorporación de métodos moleculares ha permitido agilizar estos resultados, pero se trata de métodos caros y de mayor complejidad técnica. Los métodos inmunocromatográficos son una alternativa a los anteriores, ya que se trata de métodos rápidos y de fácil utilización en el laboratorio de Microbiología [10].

En el presente trabajo evaluamos la incorporación de PBP2a SA Culture Colony Test (Aleré ahora Abbott) para la detección de la meticilin-resistencia de *S.aureus* aislados en nuestro laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han incluido en el estudio 107 cepas de *S.aureus* aisladas a partir de muestras clínicas y de frotis nasales para estudios de vigilancia de pacientes atendidos en el Hospital Regional Universitario (HRU) de Málaga, en el periodo comprendido entre el 1 de agosto de 2015 al 31 de agosto de 2018.

De las 107 cepas de *S. aureus* se aislaron 93 (86,91%) de muestras clínicas: 78 de sangre (83,87%), 4 abscesos (4,30%), 1 biopsia (1,07%), 4 broncoaspirados (4,30%), y 6 exudados de herida (6,45%). Y las 14 restantes de frotis nasales para estudio de portadores (13,08%).

Las muestras se trabajaron según los protocolos normalizados del laboratorio que incluyen: Cultivo en medios no selectivos y específicos y estudios de identificación utilizando espectrometría de masas MALDI TOF (Bruker®), y la sensibilidad mediante el sistema comercial automatizado Vitek2® (bioMérieux). Los resultados de sensibilidad antimicrobiana se interpretaron siguiendo los criterios EUCAST 2015-2018.

Además, a todas ellas se les realizó siembra en medio cromogénico CHROMagar MRSA II (BD Becton Dickinson) con lectura a las 24 y 48 horas, estudio de resistencia fenotípico utilizando método de difusión con disco de cefoxitina, inmunocromatografía para la detección de PBP2a utilizando el test PBP2a SA Culture Colony y además estudio molecular de detección de gen *mecA*, para lo que se utilizaron 2 procedimientos: 52 cepas aisladas en muestras de sangre (años 2015-2017) se enviaron al Centro Nacional de Microbiología (CNM) para estudio de tipificación. Y a las 55 cepas restantes se les realizó en el Laboratorio de Microbiología del HRU de Málaga el estudio molecular para la detección del gen *mecA*.

Inmunocromatografía PBP2a SA. Se trata de un inmunoen ensayo cromatográfico cualitativo para la detección rápida de la proteína de fijación de la penicilina 2a (PBP2a) en colonias previamente identificadas, como ayuda para identificar *S.aureus* resistente a la meticilina (SARM). Se basa en la tecnología de membrana de nitrocelulosa donde se fijan los anticuerpos monoclonales recombinantes (rFabs) altamente sensibles y una proteína de control. Se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados se leen visualmente al cabo de 5 minutos.

Métodos moleculares. Del total de 78 cepas recuperadas a partir de hemocultivos, se enviaron 52 al CNM de Majadahonda (Madrid) donde se les realizó, entre otras técnicas, una tipificación del casete cromosómico estafilocócico mec (SCCmec) mediante una PCR múltiple que generó un patrón de amplificación específico para cada tipo estructural de SCCmec [11].

Las 55 cepas restantes se trabajaron en el Laboratorio de Microbiología del HRU de Málaga donde se les realizó en primer lugar una extracción automatizada de ADN con el sistema Magcore® y una posterior PCR a tiempo real SmartCycler (Cepheid®) utilizando el kit RealCycler SAMAPV (Progenie Molecular®) que detecta el gen *mecA*, la toxina leucocidina de Pantone-Valentine (PVL) y el ADN (gen NUC) de *S. aureus*.

RESULTADOS

Del total de 107 cepas de *S. aureus*, se identificaron por métodos moleculares 57 (53,27%) SARM y 50 (46,73%) SASM.

Tabla 1		Aislados discordantes					
nº de aislado	Tipo de muestra	Vitek2 OXA	Disco Cefoxitina	CHROMagar MRSA II	IC PBP2a	mecA	PLV
31	Absceso	S ≤ 0,25	S	+	-	-	-
34	Absceso	S ≤ 0,25	S	+	-	-	-

S = sensible

Tabla 2		Sensibilidad y especificidad de las pruebas.	
Prueba	Sensibilidad	Especificidad	
Disco Cefoxitina	57/57	50/50	
	100%	100%	
Vitek2	57/57	50/50	
	100%	100%	
CHROMagar MRSA II	57/57	48/50	
	100%	96%	
ICPBP2a	56/57	50/50	
	98,25%	100%	

Entre los 57 aislamientos de SARM, se detectó el gen codificante de la PVL en el 5,26% (2 abscesos, 1 biopsia).

Los resultados obtenidos en el sistema Vitek2® tuvieron una concordancia del 100% con el método de referencia. Las 57 cepas de SARM mostraban concentraciones de oxacilina ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ y el test de cefoxitina positivo. La prueba de difusión con disco de cefoxitina presentó un halo de inhibición ≤ 21 mm en las 57 cepas de SARM.

En el medio cromogénico CHROMagar MRSA II crecieron 59 cepas (2 de ellas SARM) y no crecieron 48/50 SARM. 2 cepas identificadas como SARM crecieron en el medio cromogénico (tabla 1).

ICPBP2a fue positiva en 56/57 SARM y negativa en 50/50 SARM. Una de las pruebas realizadas resultó indeterminada. Del total de 106 pruebas consideradas como válidas coincidieron con los resultados obtenidos en el sistema Vitek2® y la prueba de difusión con disco de cefoxitina en el 100% de los casos (tabla 2).

DISCUSIÓN

En los últimos años y con el fin de controlar la diseminación de SARM en los hospitales fundamentalmente, se han implantado distintas técnicas rápidas, como la ICPBP2a. El test inmunocromatográfico es de fácil realización y al no necesitar ningún equipamiento específico es accesible a todos los tipos de laboratorios. Además, los resultados son fácilmente evidenciables, de hecho, todos los resultados fueron válidos con

la excepción de uno de los aislamientos de SARM que resultó indeterminado. Este hecho podría deberse a que según el fabricante (Alere Technical Services), los resultados no válidos generalmente se deben a cantidades excesivas de PBP2a que se unen al conjugado y evitan que aparezca la línea de control [12]. Otros autores [13] describen falsos positivos en pruebas realizadas a partir de hemocultivos con partículas de carbón.

En situaciones de brotes hospitalarios en los que es necesaria una respuesta rápida para evitar la diseminación de este patógeno, es de gran relevancia poder disponer de una técnica capaz de identificar estas cepas de una forma rápida y sencilla, generando un gran beneficio en términos socio-sanitarios ya que facilita aislamientos precoces y tratamientos eficaces. Las pruebas moleculares son óptimas para este fin, pero requieren equipo, instalaciones adecuadas, personal capacitado para su realización y recursos económicos que no están disponibles en todos los hospitales.

La utilización de cefoxitina en lugar de oxacilina como antibiótico de elección tiene la ventaja de ser mejor inductor de la expresión del gen *mecA*, y detecta mejor las poblaciones SARM de bajo nivel de resistencia, clasificadas erróneamente como SARM [2].

El sistema automático Vitek2® presenta excelentes resultados y la ventaja de mayor rapidez frente al medio cromogénico CHROMagar MRSA II y la difusión en disco de cefoxitina, ya que se obtienen los resultados a partir de las 7 horas [14].

CHROMagar MRSA II demuestra ser útil como técnica de screening en la búsqueda de portadores nasales de SARM, con lectura de las placas a las 24 y 48 horas, aunque la sensibilidad aumenta poco tras la reincubación [15] pero a costa de la pérdida de eficacia. Algunos autores y con muestras de hemocultivos acortan este tiempo y obtienen idénticos resultados a las 12 y a las 24 horas, 96 % de sensibilidad y 100% especificidad [16]. Las 2 muestras discordantes crecían en el medio cromogénico pero, sin embargo el resto de pruebas eran negativas. Algunos autores [17] describen que la sensibilidad de estos medios disminuye cuando se trata de cepas heterorresistentes y la especificidad en cepas con CMI borderline.

La principal debilidad que presenta esta prueba inmunocromatográfica es que sólo está validada para su realización sobre colonias aisladas de *S.aureus* a partir de medios sólidos, lo que retrasa la información 24 horas. Dupieux et al [9] la utilizaron con estafilococos coagulasa negativos demostrando la necesidad de inducción con cefoxitina para obtener buenos

resultados. Existen estudios que realizan la prueba a partir de muestra directa de hemocultivos positivos obteniendo buenos resultados [18]. Otros también los obtienen realizando la identificación por espectrometría de masas (MALDI TOF, Bruker) a partir de microcolonias a las pocas horas del subcultivo de los hemocultivos positivos y la detección de PBP 2a cuando se trata de *S.aureus* [19] produciendo resultados en unas cuantas horas de gran repercusión en el manejo del paciente.

La inmunocromatografía Alere® para detección rápida de PBP2a resulta ser por tanto una prueba de fácil implementación a nivel técnico [20], rápida, segura y económica que puede utilizarse en los laboratorios de Microbiología para confirmar la resistencia a metilina mediada por el gen *mecA*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Infecciones intrahospitalarias del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III) por la tipificación de las cepas enviadas y al Dr. Federico Román Alonso, responsable del mismo por la revisión de las mismas.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tong S Y C, Davis J S, Eichenberger E, Holland T L, Vance G, Fowler V G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin Microbiol Rev 2015; 28(3): 603-661. DOI: 10.1128/CMR.00134-14.
2. Morosini MI, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. Enf Infec Microbiol Clin 2012; 30(6): 325-332. DOI: 10.1016/j.eimc.2011.09.009.
3. Han Z, Lautenbach E, Fishman N, Nachamkin I. Evaluation of mannitol salt agar, CHROMagar Staph aureus and CHROMagar MRSA for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal swab specimens. J Med Microbiol 2007; 58: 43-46. DOI: 10.1099/jmm.0.46777-0.
4. Melzer M, Eykyn S J, Gransden W R, Chinn S. Is Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* More Virulent than Methicillin-Susceptible *S. aureus*? A Comparative Cohort Study of British Patients with Nosocomial Infection and Bacteremia. Clin Infect Dis 2003; 37(11): 1453-1460. DOI: 10.1086/379321.
5. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2017>
6. Rao S N, Wang S K, Gonzalez-Zamora J, Hanson A P, Polisetty R S, and Singhm K. Improving time to optimal *Staphylococcus aureus* treatment using a penicillin-binding protein 2a assay. J Med Microbiol 2016; 65: 1452-1455. DOI: 10.1099/jmm.0.000365.
7. Kim SH, Kim KH, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, Oh MD et al. Outcome of vancomycin treatment in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 192-7. DOI: 10.1128/AAC.00700-07.
8. Nicolsen N C, LeCroy N, Lecroy N, Alby K, Martin K E, Laux J, et al. Clinical outcomes with rapid detection of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from routine blood cultures. J Clin Microbiol 2013; 51: 4126-4129. DOI: 10.1128/JCM.01667-13.
9. Dupieux C, Trouillet-Assant S, Tasse J, Freydière A M, Raulin O, Roure-Sobas Ch, Salord H, et al. Evaluation of a commercial immunochromatographic assay for rapid routine identification of PBP2a-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Diagn Microbiol Infect Dis 2016; 86: 262-264. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.012.
10. Arnold A R, Burnham C A D, Ford B A, Lawhon S D, McAllister S K, Lonsway D, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid detection of Penicillin-Binding Protein 2a in human and animal *Staphylococcus intermedius* group, *Staphylococcus lugdunensis*, and *Staphylococcus schleiferi* clinical isolates. J Clin Microbiol 2016; 54 (3):745-748. DOI: 10.1128/JCM.02869-15.
11. Oliveira Dc, A Tomasz and H. de Lencastre. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother 2002; 46:2155-2161. PMID: 12069968.
12. Trienski T L, Barrett H L, Pasquale T R, DiPersio J R and File T M. Evaluation and use of a rapid *Staphylococcus aureus* assay by an antimicrobial stewardship program. Am J Health Syst Pharm 2013; 70 (21):1908-1912. DOI: 10.2146/ajhp130118.
13. Heraud S, Freydière A M, Doleans-Jordheim A, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, et al. Direct Identification of *Staphylococcus aureus* and Determination of Methicillin Susceptibility From Positive Blood-Culture Bottles in a Bact/ALERT System Using Binax Now *S. aureus* and PBP2a Tests. Ann Lab Med 2015; 35:454-457. DOI: 10.3343/alm.2015.35.4.454.
14. Acosta-Pérez G, Rodríguez-Ábrego G, Longoria-Revilla E, Castro-Mussot M E. Evaluación de cuatro métodos para la detección de *Staphylococcus aureus* metilino-resistente de muestras clínicas en un hospital regional. Salud Publica Mex 2012; 54:1-6. PMID: 22286822.
15. Wendt C, Havill N L, Chapin K C, Boyce J M, Dickenson R, Eigner U, Schutt S and Fahr A M. Evaluation of a New Selective Medium, BD BBL CHROMagar MRSA II, for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Different Specimens. J Clin Microbiol 2010; 48(6): 2223-2227. DOI: 10.1128/JCM.02374-09.
16. Chihara S, Hayden M K, Minogue-Corbett E, and Singh K. Shortened Time to Identify *Staphylococcus* Species from Blood Cultures

- and Methicillin Resistance Testing Using CHROMAgar. *Int J Microbiol* 2009; 65: 626–631. DOI: 10.1155/2009/636502
17. Datta P, Gulati N, Singla N, Rani Vasdeva H, Bala K, Chander J, et al. Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns. *J Med Microbiol* 2011; 60:1613-1616. DOI: 10.1099/jmm.0.032219-0.
 18. Kong H, Tong L, Zhang W, Fu Y, Li X. Combined use of the Binax-NOW *Staphylococcus aureus* test with the Clearview PBP2a assay for the early detection of methicillin-resistant *S. aureus* from positive blood culture. *Diag Microbiol Infect Dis* 2014; 78:226–228. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.018.
 19. Delport J A, Mohorovic I, Burn S, McCormick J K, Schaus D, Lannigan R and Michael John M. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia using combined three-hour short-incubation matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight MS identification and Alere Culture Colony PBP2a detection test. *J Med Microbiol* 2016; 65: 626-631. DOI: 10.1099/jmm.0.000285.
 20. Tasse J, Dupieux C, Caillon J, Lanotte P, Lamy B, Aissa N et al. Rapid bench identification of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A multicenter comparative evaluation of Alere PBP2a Culture Colony Test (Alere) Versus Slidex MRSA detection (bioMérieux). *Diag Microbiol Infect Dis* 2016; 85:419-421. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.008.