

Evaluación de placas de *screening* de cefoxitina y cefotaxima para la detección de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*

R. LORENZ^{2,4*}, E. de los A. MÉNDEZ^{1,3}, C. AHUMADA¹, A. NAGEL^{1,2}, C. RAMOS^{1,2}, M. A. MENDOSA^{1,2}, M. E. NARDÍN^{1,2}, S. MORANO¹, A. MOLLERACH^{1,2}

¹Sección Microbiología, Laboratorio Central, Hospital "Dr. José María Cullen" Santa Fe; ²Carrera de Especialista en Bacteriología Clínica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe; ³Cátedra de Bacteriología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe; ⁴Clínica de Nefrología, Urología y Enfermedades Cardiovasculares. Avenida Freyre 2150 (3000) Santa Fe, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: roslorenz@hotmail.com

RESUMEN

La detección de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (SAMR) representa un serio problema para el laboratorio de microbiología de baja y mediana complejidad. En el presente trabajo se evalúa la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de placas de *screening* (AS) de cefoxitina (FOX) y cefotaxima (CTX) (8 y 16 µg/ml), con 4% de NaCl o sin agregado de sal, para la detección de SAMR. El AS oxacilina (OXA) y el test de aglutinación MRSA-Screen Latex para detección de PLP2a se utilizaron como métodos de referencia. El 100% de las cepas PLP2a positivas (94 cepas) fueron detectadas como SAMR por el AS FOX (8 µg/ml) y por el AS CTX (8 µg/ml, con 4% de NaCl). La ventaja del AS FOX (8 µg/ml) es que no requiere de NaCl y la del AS CTX (8 µg/ml, con 4% de NaCl), que CTX es un antimicrobiano fácilmente disponible en nuestro país.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente, cefoxitina, cefotaxima

ABSTRACT

Evaluation of cefoxitin and cefotaxime screening plates for the detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates represents a serious problem to low and media level microbiology labs. In this work cefoxitin (FOX) and cefotaxime (CTX) screen plates (AS) (8-16 µg/ml) with and without 4% of NaCl were evaluated to detect MRSA. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were determined. The AS oxacillin and the agglutination test MRSA-Screen Latex for the detection of PLP2a were used as reference methods for the evaluation of the different studied screening plates. The 100% (94 strains) PLP2a positive were detected as MRSA with FOX (8 µg/ml), and CTX (8 µg/ml with 4% NaCl) AS. The advantage of FOX AS (8 µg/ml) is that it does not need the addition of NaCl, and CTX AS (8 µg/ml with 4% NaCl) is that cefotaxime is an antimicrobial easily accessible in our country.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, cefoxitin, cefotaxime

Staphylococcus aureus meticilina-resistente (SAMR) ha emergido en las últimas décadas como patógeno nosocomial y, recientemente, a nivel comunitario.

El mecanismo más importante de resistencia a la meticilina es la expresión de una proteína ligadora de penicilina (PLP) denominada (PLP2a), la cual es codificada por el gen *mecA* y se caracteriza por presentar muy baja afinidad por los antibióticos β-lactámicos.

SAMR posee resistencia cruzada a oxacilina (OXA), y diversas investigaciones demostraron que este antimicrobiano podía ser utilizado en las pruebas de sensibilidad por ser más estable (5).

Varios factores influyen en la expresión del fenotipo resistente, los que deben ser considerados al realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, como el agar *screening* (AS) OXA y el antibiograma por difusión

con discos. Estas condiciones se refieren a la incorporación de cloruro de sodio (NaCl) al medio, al pH, a la densidad de los inóculos, a la temperatura de incubación, que puede ser de 30 o 35 °C (no superior a 35 °C), y al tiempo de incubación (24 h). Las cepas que son heterogéneas a 37 °C pueden aparecer homogéneamente resistentes a 30 °C o con el agregado de 4% de NaCl al medio (1, 3, 7, 14, 15).

Tradicionalmente, la detección fenotípica de SAMR se realizaba utilizando el método de difusión con disco de OXA (1 µg). En el 2004, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) —en la actualidad, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)— propuso la utilización del disco de cefoxitina (FOX) (30 µg) (2, 9). El uso de ambos discos aumenta la sensibilidad y especificidad en la detección de la resistencia mediada por el gen *mecA*.

El AS OXA constituye el método fenotípico de referencia para determinar resistencia a meticilina en cepas de *S. aureus* (8, 10, 12, 13).

En el año 2002, el NCCLS aceptó la detección de la PLP2a como método alternativo para la evaluación de meticilina-resistencia en *S. aureus* (10).

La detección del gen *mecA* es considerada el *gold standard* (6, 9, 15, 24, 32); sin embargo, en nuestro país su realización rutinaria en laboratorios clínicos aún resulta poco práctica y de alto costo, y su estudio se restringe a grupos de investigación (11).

La detección de SAMR continúa siendo un problema para los laboratorios de mediana complejidad. A pesar de ser OXA la droga de elección; en nuestro país se hace difícil acceder a ella y tiene un costo relativamente elevado.

Debido a la importancia de la detección de estas cepas y a la dificultad de utilizar AS OXA, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del AS cefoxitina (FOX) y del AS cefotaxima (CTX) (8 y 16 µg/ml), con 4% de NaCl o sin la inclusión de la sal, usando el AS OXA y la prueba de aglutinación MRSA-Screen Latex para la detección de PLP2a como métodos de referencia.

Se analizaron 200 cepas consecutivas y no seleccionadas de *S. aureus* aisladas de muestras clínicas. El 47% de las cepas (94) eran SAMR; el 53% restante (106), SAMS. Para la detección de SAMR se utilizó la prueba MRSA-Screen Latex (Denka Seiken, Niigata, Japón).

Se prepararon AS con los siguientes antimicrobianos de potencia certificada: OXA (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo.), FOX (Merck Sharp & Dohme, Argentina) y CTX (Northia, Argentina).

- Agar Mueller Hinton con 6 µg/ml de OXA
- Agar Mueller Hinton con 8 µg/ml de FOX y 4% P/V NaCl
- Agar Mueller Hinton con 8 µg/ml de FOX
- Agar Mueller Hinton con 16 µg/ml de FOX y 4% P/V NaCl
- Agar Mueller Hinton con 16 µg/ml de FOX
- Agar Mueller Hinton con 8 µg/ml de CTX y 4% P/V NaCl
- Agar Mueller Hinton con 8 µg/ml de CTX
- Agar Mueller Hinton con 16 µg/ml de CTX y 4% P/V NaCl
- Agar Mueller Hinton con 16 µg/ml de CTX

Para la selección de las concentraciones de los AS estudiados, se tuvieron en cuenta los puntos de corte del NCCLS (9) para cada antimicrobiano: FOX (8-32 µg/ml) y CTX (8-64 µg/ml) para cepas sensibles y resistentes, respectivamente.

Se utilizó un inóculo estandarizado; para ello se realizó una suspensión de cada aislamiento a partir de cultivos de 24 h, acorde con un equivalente de turbidez del estándar 0,5 de Mc Farland.

La siembra se realizó con hisopo, el inóculo se dispersó en un área de 10-15 mm de diámetro. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h en atmósfera aeróbica.

La visualización de cualquier número de colonias se consideró positivo y la ausencia de crecimiento, negativo. Cepas de referencia: *S. aureus* ATCC 43300 (resistente a la meticilina) y *S. aureus* ATCC 29213 (débilmente productora de β -lactamasa, sensible a la meticilina).

Los resultados obtenidos en el AS FOX y el AS CTX se muestran en la Tabla 1. Los porcentajes de S y VPN de los distintos AS estudiados se muestran en la Tabla 2.

El 100% de las cepas de *S. aureus* PLP2a negativas (106) fueron identificadas como SAMS por todos los AS estudiados, no hubo resultados falsos positivos (errores mayores), la E y el VPP fueron del 100% para todos los AS ensayados.

El 100% de las cepas de *S. aureus* PLP2a positivas (94) fueron identificadas como SAMR por el AS FOX (8 µg/ml) y el AS CTX (8 µg/ml, con 4% de NaCl).

Tabla 1. Número de aislamientos de *S. aureus* que crecieron en los AS. El MRSA-Screen Latex y el AS OXA fueron los métodos de referencia.

Método	Nº total de aislamientos	
	Positivo	Negativo
MRSA-Screen Latex PLP2a	94	106
AS OXA 6 mg/ml + 4% NaCl	94	106
AS FOX 8 mg/ml	94	106
AS FOX 16 mg/ml	84	116
AS FOX 8 mg/ml + 4% NaCl	92	108
AS FOX 16 mg/ml + 4% NaCl	78	122
AS CTX 8 mg/ml	88	112
AS CTX 16 mg/ml	77	123
AS CTX 8 mg/ml + 4% NaCl	94	106
AS CTX 16 mg/ml + 4% NaCl	92	108

Tabla 2. Porcentaje de sensibilidad y valor predictivo negativo obtenidos con las distintas placas de screening.

Agar screening	% Sensibilidad	%VPN
OXA 6 mg/ml + 4% NaCl	100	100
FOX 8 mg/ml	100	100
FOX 8 mg/ml + 4% NaCl	98	98
FOX 16 mg/ml	89	91
FOX 16 mg/ml + 4% NaCl	83	87
CTX 8 mg/ml	94	95
CTX 8 mg/ml + 4% NaCl	100	100
CTX 16 mg/ml	82	86
CTX 16 mg/ml + 4% NaCl	98	98

Se pudo observar una S, una E, un VPP y un VPN del 100% con el AS FOX (8 µg/ml) y el AS CTX (8 µg/ml, con 4% de NaCl). La ventaja de la utilización del AS FOX es que no requiere NaCl, lo cual facilita su preparación; y la ventaja del AS CTX radica en que es un antimicrobiano fácilmente disponible en nuestro país.

Este trabajo intentó proponer un nuevo método fenotípico de referencia para la detección de SAMR en el laboratorio de microbiología, considerando que la OXA es costosa y de difícil acceso en nuestro medio.

Los excelentes resultados obtenidos con el AS FOX (8 µg/ml) y el AS CTX (8 µg/ml, con 4% de NaCl) ameritan continuar el estudio con un mayor número de aislamientos para establecer un nuevo método de *screening* de referencia, accesible a los laboratorios de nuestro país.

Agradecimiento: a la Profesora Elena Carreras y a todo su equipo por la valiosa colaboración en el análisis de datos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Annear DI. The effect of temperature on resistance of *Staphylococcus aureus* to methicillin and some other antibiotics. *Med J Aust* 1968; 1: 444-6.
2. Boutiva-Ben Boubaker I, Ben Abes R, Ben Abdallah H, Mamlouk K, Mahjoubi S, Kamnoun A *et al*. Evaluation of a cefoxitin disc diffusion test for the routine detection of methicillin-resistance. *J Clin Microbiol* 2004; 10: 762-5.
3. Chambers HF, Hackbarth CJ. Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1982-8.
4. Chung M, De Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, and the Multilaboratory Project Collaborators. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 2000; 6: 189-98.
5. De Lencastre H, Figueiredo AM, Urban C, Rahal J, Tomasz A. Multiple mechanisms of methicillin-resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 632-9.
6. Geha G, Uhl J, Gustaferro C, Persing D. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1768-72.
7. Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin-resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29: 85-92.
8. Jorgensen J, Ferraro M. Antimicrobial susceptibility testing: special needs for fastidious organisms and difficult to detect resistant mechanisms. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 799-808.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 14th informational supplement, 2004; M100-S14. Wayne, Pa, USA.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 12th informational supplement, 2002; M100-S12. Wayne, Pa, USA.
11. Sola C, Gribaudo G, Córdoba MRSA Collaborative Study Group, Vindel A, Patrino L, Bocco JL. Identification of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone in Córdoba, Argentina, involved in nosocomial infections. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1427-35.
12. Soloaga R, Corso A, Galletti P, Faccone D, Galas M, Grupo Colaborador MRSA. Detección de meticilino-resistencia en *S. aureus*: comparación de métodos convencionales y aglutinación con *MRSA-Screen Latex*. *Rev Argent Microbiol* 2004; 36: 36-40.
13. Soloaga R, Procopio A, Aguilar J, Dutruel A, Labat R, Domínguez M *et al*. Comparación de diferentes métodos para la detección de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Rev Argent Microbiol* 2002; 34: 52-6.
14. Thornsberry C, Caruthers JQ, Baker CN. Effect of temperature on the in vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* to penicillinase - resistant penicillins. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; 4: 263-9.
15. Tomasz A, Nachman S, Leaf H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin - resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 124-9.