

11. Técnicas para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el laboratorio de microbiología clínica

C*. Salvador García, C. Acevedo Alcaraz, A. Bennani

*Servicios de Análisis Clínicos y Microbiología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia.

11.1. Introducción

S. aureus es uno de los patógenos aislado más frecuentemente en el laboratorio de microbiología a partir de muestras clínicas y es la principal especie patógena de su género. *S. aureus* causa infecciones tanto de origen comunitario como nosocomial. Actualmente, su interés se debe a su elevada frecuencia de aislamiento y cepas resistentes a meticilina (SAMR), una de las causas principales de brotes de infección nosocomial.

Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina aparecieron de forma casi inmediata tras la introducción de la misma en el campo terapéutico. Los primeros brotes de infección nosocomial por estas cepas fueron descritos a principios de los años sesenta en distintos hospitales europeos. A partir de entonces, su prevalencia ha ido creciendo, causando un verdadero problema epidemiológico en los hospitales.

Los SAMR tienen resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos pero además, en general, presentan resistencias a otros grupos de antibióticos a través de diferentes mecanismos de acción. Estos antibióticos son: cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos e, incluso, quinolonas.

Las técnicas de detección de estos SAMR deben tener una alta sensibilidad y especificidad y ser de detección rápida. Actualmente, existen medios cromogénicos selectivos para detectar SAMR en un solo paso.

11.2. Características generales de *S. aureus*

Los *S. aureus* fueron observados por primera vez por Koch y Pasteur. Hacia 1880 Ogston fue quien los denominó con los siguientes términos derivados del griego *staphyle* = racimo y *kokkos* = granos. En 1884, Rosenbach relacionó estas bacterias con infecciones en heridas y osteomielitis.

Los estafilococos pertenecen a la familia Micrococcaceae. El género *Staphylococcus* consta de más de 25 especies y varias subespecies. Las tres especies de mayor interés clínico son: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *S. aureus*.

Son cocos gram-positivos. Su pared está compuesta por péptidoglicano asociado a ácidos teicoicos mediante el aminoácido L-lisina. Se agrupan en forma de racimos como su nombre indica. Son anaerobios facultativos y producen catalasa.

La principal característica que diferencia a *S. aureus* de los demás estafilococos es la producción de la enzima coagulasa (coagula el plasma citratado). *S. aureus* resiste al calor y a la desecación y puede crecer en condiciones de salinidad (7,5% de ClNa). Muestran β -hemólisis en medios con sangre. Su característica bioquímica más importante es la fermentación de varios azúcares, entre ellos, el manitol para producir ácido láctico.

SAMR presentan, como mínimo, tres mecanismos de resistencia a los β -lactámicos: producción de β -lactamasa, fenómeno de tolerancia y resistencia por proteínas fijadoras de penicilina (PBP), conocida como resistencia intrínseca a meticilina.

Las penicilinas resistentes a penicilasa (oxacilina, meticilina, cloxacilina, etc.) y las cefalosporinas, poseen una estructura molecular que las protege frente a la acción de la β -lactamasa. Sin embargo, el género *Staphylococcus* ha desarrollado mecanismos de resistencia a estos antimicrobianos por la síntesis de una nueva PBP (PBP2a) de 78 kDa con baja afinidad por la meticilina y por el resto de β -lactámicos y con actividad transpeptidasa. En presencia de estos antibióticos, todas las PBP de *S. aureus* están inhibidas a excepción de la PBP2a, que sería responsable de seguir adelante con la síntesis de la pared celular bacteriana. El determinante genético de esta proteína es de naturaleza cromosómica (gen *mec*). Este gen contiene *loci* distintos, el *mecA*, que codificaría la PBP2a, y el *mecR* o gen regulador. Las cepas SAMR con resistencia intrínseca a la meticilina poseerían los marcadores *mecA* y PBP2a.

11.3. Manifestaciones clínicas

Desde el punto de vista clínico, las infecciones por SAMR no difieren de las producidas por *S. aureus* meticilín sensible y, por tanto, las cepas resistentes a meticilina tienen la misma capacidad patogénica para colonizar y causar infección que la cepas sensibles a ésta. En general, son infecciones con gran supuración y necrosis tisular que tienden a la formación de abscesos.

S. aureus coloniza la piel y las mucosas de muchas personas. Desde allí puede causar infecciones leves, tales como forúnculo, paroniquia, infecciones de heridas, etc. También, puede causar infecciones más graves como pénfigo *neonatorum* (o impétigo ampollar, según la edad), endocarditis, meningitis... El síndrome de la piel escaldada, el síndrome del shock tóxico y las intoxicaciones alimentarias se producen principalmente por la acción de las toxinas de este microorganismo.

11.4. Determinantes de patogenicidad

Los determinantes patogénicos de *S. aureus* se pueden clasificar en tres grupos (Tabla I):

DETERMINANTES DE PATOGENOCIDAD	PROPIEDADES
1. <i>Componentes de la pared celular</i>	
Peptidoglicano	Activación del complemento
Ácidos teicoicos y proteína A	Antifagocitarias
Cápsula mucoide (<i>slime</i>)	Adherencia
2. <i>Enzimas</i>	
Coagulasa	Formación absceso
Estafiloquinasas	Destrucción del coágulo
Hialuronidasa	Invasión hística
β-lactamasas	Inactivación de β-lactámicos
Lipasas	Colonización
3. <i>Toxinas</i>	
Hemolisinas	Rotura de membrana celular
Leucocidinas	Alteración de la permeabilidad celular
Toxina exfoliativa	Epidermolisis
Toxina TSST	<i>Shock</i> tóxico
Enterotoxina	Intoxicación alimentaria

11.5. Métodos para la detección de resistencia a la meticilina

S. aureus crece en los medios convencionales de cultivo (agar sangre y agar chocolate) tras 18-24 horas de incubación como unas colonias redondeadas de color blanco-amarillento y con β-hemólisis en medios con sangre. Son cocos gram-positivos catalasa y coagulasa positivos. El método de referencia es el antibiograma, según las normas NCCLS, en agar Mueller-Hinton (difusión disco-placa) con una suspensión de colonias equivalente a 0,5 de McFarland. Se incuba a 33-35 °C durante 16-18 horas, y 24 horas para oxacilina, meticilina, nafcilina y vancomicina. Se considera que *S. aureus* es sensible a la oxacilina cuando el halo de inhibición es mayor de 13 mm para un disco de oxacilina de 1 µg. El estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) mediante prueba de E-test con tira de oxacilina es una alternativa válida en los casos de duda, con una eficacia diagnóstica similar a la del método de referencia de dilución en agar hipersalino, a concentración crítica de 6 µg/ml de oxacilina. Estos métodos convencionales de detección de SAMR no son suficientemente sensibles.

Diferentes estudios muestran que, para confirmar los SAMR, es preferible detectar directamente el gen codificador de la resistencia a meticilina (*mecA*) o bien su producto de expresión (proteína PBP2a). Precisamente, es la detección del gen *mecA* por métodos de amplificación mediante PCR, un método relativamente rápido y eficaz, pero no disponible en la mayoría de laboratorios clínicos. Este método poseería la ventaja de no estar sujeto a las condiciones del crecimiento de la cepa, pudiendo aplicarse a gran número de aislados y podría ser aconsejable en casos de duda con valores de CMI cercanos al límite. También se pueden utilizar para la detección de SAMR métodos de hibridación in situ. Son métodos caros cuyos resultados se obtienen en 90 minutos.

Existe una prueba rápida de aglutinación de partículas de látex que permite la detección de SAMR poniendo de manifiesto la PBP2a. Las partículas de látex sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra PBP2a reaccionan después de una extracción específica de la PBP2a presente en los SAMR dando una aglutinación visible a simple vista. Es un test simple, barato y rápido (15 minutos).

Hay un test en el mercado que usa un fluoróforo sensible al oxígeno. Se basa en el uso de un indicador fluorescente sensible ante la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. Sin

embargo, si hay crecimiento de microorganismos, éstos consumen el oxígeno presente en el caldo y la fluorescencia no se detecta. Si se incorpora oxacilina en el caldo se puede distinguir entre *S. aureus* sensible a la meticilina y resistente a la meticilina. Si hay crecimiento hay un SAMR y consume el oxígeno presente evitando así la observación de fluorescencia. Necesita cuatro horas para completarse.

La detección de SAMR en muestras clínicas mediante medios de cultivo convencionales como el agar sangre es complicado. La mayoría de las veces las muestras proceden de sitios no estériles y en estos medios crecen distintos microorganismos siendo necesarios test confirmatorios para diferenciar *S. aureus* de otros estafilococos.

Recientemente, han salido al mercado nuevos medios de cultivo cromogénicos para la detección rápida y sencilla de SAMR. Estos medios simplifican el cribado de pacientes mediante la detección directa de SAMR en una placa en 18-24 horas sin necesidad de ninguna prueba adicional. De este modo se consigue una detección, control y aislamiento del paciente más rápido. Además, estos medios proporcionan una lectura sencilla, pues simplemente consiste en ver el color de la colonia. Entre estos medios se encuentra:

CHROMagar *S. aureus* es un medio en el que tras la adición de oxacilina (4 µg/ml) al medio cromogénico se inhibe el crecimiento de todos los estafilococos meticilin-sensibles. Las colonias aparecen de color rosa-rojo. Los estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina aparecen como colonias de color rosa pálido o crema, distinguiéndose de los SAMR. Según estudios realizados su sensibilidad tras 24 horas de incubación es del 95,4%.

ORSAB es un medio modificado de MSA (manitol-salt-agar), se le adiciona oxacilina y polimixina B siendo así más selectivo (inhibe el crecimiento de microorganismos). Se ha adicionado azul de anilina como indicador de pH, de este modo las colonias manitol positivas (colonias de *S. aureus*, ya que esta bacteria tiene la capacidad de fermentar el manitol) se ven de color azul.

MRSA ID permite una identificación directa de colonias de SAMR basada en la coloración verde espontánea de las colonias productoras de α -glucosidasa (pendiente de patente). La cantidad de cefoxitina añadida es de 4 mg/litro. Los MRSA crecen mejor en presencia de cefoxitina que de oxacilina, lo cual puede ser porque la cefoxitina aumenta la inducción de la PBP2a. El medio es altamente selectivo, evita el crecimiento de otras bacterias y levaduras. Tras 48 horas de incubación las colonias de estafilococos coagulasa negativos pueden aparecer con coloración verde pálido, pero se distinguen bien de los SAMR porque estos presentan una coloración verde intensa. Este medio de cultivo es un medio efectivo, según estudios realizados, incluso cuando el inóculo es pequeño. La especificidad tras 24 horas de incubación es del 99,5% y su sensibilidad del 80%, aumentando hasta el 89% tras 48 horas de incubación (según estudios realizados).

11.6. Tratamiento

La mayoría de las cepas de *S. aureus* son resistentes a las penicilinas penicilinasas sensibles. Esta resistencia se produce por la acción de las β -lactamasas sobre el anillo β -lactámico del antibiótico.

Las penicilinas penicilinasas resistentes y cefalosporinas son una buena elección para el tratamiento de *S. aureus* sensibles a oxacilina. El porcentaje de SAMR oscila entre el cinco y el 50%. La resistencia a la meticilina se produce por la menor afinidad de los antimicrobianos β -lactámicos por las proteínas fijadoras de penicilina. Estas cepas suelen ser resistentes también a otros antibióticos.

Los antibióticos que habitualmente se mantienen activos frente a cepas de SAMR son los glucopéptidos, cotrimoxazol, rifampicina y linezolid. Se debe tener presente que, cuando se detecta una cepa resistente a oxacilina, ningún otro β -lactámico será eficaz para el tratamiento de este microorganismo con independencia de que la cepa muestre sensibilidad in vitro, es decir, en los estudios de laboratorio.

11.7. Prevención

La prevención de la aparición de brotes nosocomiales por SAMR se basa en medidas que incluyen tanto sistemas de vigilancia epidemiológica como el cribado de portadores en el personal sanitario y las medidas de aislamiento y control en caso necesario.

Las cepas de SAMR se introducen en el medio hospitalario a través de pacientes, visitantes o trabajadores sanitarios. El reservorio fundamental lo constituyen los pacientes ingresados que están infectados o colonizados, extendiéndose a otros pacientes principalmente por medio de las manos del personal sanitario (transmisión cruzada). A medida que progresa un brote epidémico, aumenta el número de portadores nasales de SAMR que constituyen, a menudo, la propia fuente de infección. Ciertos pacientes, portadores nasales de SAMR, se pueden descolonizar con la aplicación de una pomada tópica de mupirocina en ambas fosas nasales durante cinco días. Su uso indiscriminado ha ocasionado la aparición de resistencias a este antibiótico en numerosos hospitales.

BIBLIOGRAFÍA

1. García-Rodríguez JA y Picazo JJ. Staphylococcus. Microbiología Médica General.
2. Perea EJ. Staphylococcus. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ediciones Doyma.
3. Merlino J, Leroi M, Bradbury R, Veal D, Harbour C. New Chromogenic Identification and Detection of Staphylococcus aureus and Methicilin-Resistant S. aureus. J Clin Microbiol, Junio 2000; 38 (6): 2378-80.
4. Soares MJ, Soares C, Constança Mendes A, Guimaraes ML, Cabeda JM, Amorim JM. Assessment of three rapid methods for the detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol, Agosto 2004; 22(7): 390-1.
5. Perry JD, Davies A, Butterworth LA, Hopley ALJ, Nicholson A, Kate F. Development and Evaluation of a Chromogenic Agar Medium for Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol, Octubre 2004; 42(10): 4519-23.
6. Camarena JJ, Sánchez R. Infección por Staphylococcus aureus resistente a la meticilina. Revisión Control de Calidad SEIMC. url: <http://www.seimc.org>.
7. Domínguez MA, Pujol M. Cambios en la epidemiología de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina. Recomendaciones para el control de su diseminación. Revisión Control de Calidad SEIMC. url:
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. Enero 2005.