

Comparación de métodos fenotípicos y moleculares para la detección de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*

Comparison of phenotypic and molecular methods to detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*

Gloria I. Morales-Parra MSc¹, Aracely García-Cuan MSc²

Introducción: la detección de resistencia a meticilina en aislados de *Staphylococcus aureus* por el laboratorio es difícil debido a la heterogeneidad en la expresión fenotípica en estas bacterias. **Objetivos:** comparar métodos fenotípicos y moleculares para la detección de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. **Materiales y métodos:** se evaluó la resistencia a la meticilina en 50 aislados de *Staphylococcus aureus* por los métodos de difusión en agar, microdilución en caldo y dilución en agar. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa para detectar el gen de resistencia *mecA* como estándar de referencia. Se determinó para cada método la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y eficiencia. **Resultados:** la resistencia a la meticilina se encontró en el 50% (25/50) de los aislados de *Staphylococcus aureus* por los métodos de difusión en agar, microdilución en caldo (cefotitina) y dilución en agar, y en el 52% (26/50) por microdilución en caldo (oxacilina). El 42,0% (21/50) de los aislados presentaron el gen *mecA*. Del total de aislados, 10 (20%) demostraron un fenotipo discrepante al obtenido molecularmente, siete falsamente resistentes y tres falsamente sensibles. La sensibilidad de los métodos fenotípicos varió entre 85,7% y 90,5%, la especificidad entre 75,9% y 79,3%, el valor predictivo positivo entre 72,0% y 76,0%, el valor predictivo negativo entre 88,5% y 92,0% y la eficiencia entre 80,4% y 84,0%. **Conclusiones:** los resultados demostraron que los métodos fenotípicos son confiables para la detección de resistencia a la meticilina de *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, resistencia a la meticilina, proteína *mecA*.

Introduction: Detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the laboratory is difficult due to heterogeneity in the phenotypic expression in these bacteria. **Objectives:** To compare phenotypic and molecular methods for detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Materials and methods:** Methicillin resistance in 50 *Staphylococcus aureus* isolates was assessed by agar diffusion methods, broth microdilution, and agar dilution. Polymerase chain reaction was used to detect the *mecA* resistance gene as reference standard. Sensitivity, specificity, predictive values and efficiency was determined for each method. **Results:** Methicillin resistance by phenotypic methods was found in 50% (25/50) of *Staphylococcus aureus* isolates by diffusion method, broth microdilution (cefotitin) and agar dilution, and in 52% (26/50) by broth microdilution (oxacillin). Of these isolates, 42.0% (21/50) carried the *mecA* gene. From all isolates, 10 (20%) showed a discrepant phenotype compared to the molecular results, of which seven were classified falsely resistant and three

¹Bacterióloga y laboratorista clínico. Especialista en Microbiología médica. MSc en Microbiología Molecular. Docente Universidad de Santander (UDESA) y Universidad Popular del Cesar (UPC) Valledupar, Valledupar, Colombia. Correspondencia: Calle 13C biz, Nro. 19D-70. Correo electrónico: gloriaudes7@hotmail.com

²Bacterióloga y laboratorista clínico. Especialista en Hematología y Banco de sangre. MSc en Biología Molecular y Biotecnología. Docente Universidad Libre de Barranquilla. Barranquilla, Colombia

Conflicto de intereses: las autoras declaran que no tienen conflicto de intereses
Medicina & Laboratorio 2015; 21: 363-374

Módulo 19 (Investigación), número 35. Editora Médica Colombiana S.A. 2015[®]

Recibido el 09 de julio de 2015; aceptado el 15 de agosto de 2015

falsely sensitive. The phenotypic methods showed a sensitivity ranging between 85.7% and 90.5%, specificity between 75.9% and 79.3%, positive predictive value between 72.0% and 76.0%, negative predictive value between 88.5% and 92.0% and efficiency between 80.4% and 84.0%. **Conclusions:** Results demonstrated that phenotypic methods are reliable for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, *mecA* protein.

Morales-Parra GI, García-Cuan A. Comparación de métodos fenotípicos y moleculares para la detección de resistencia a metilina en *Staphylococcus aureus*. *Medicina & Laboratorio* 2015; 21: 363-374.

Staphylococcus aureus es una bacteria tipo coco Gram positiva, patógena importante para los humanos, que causa diversas infecciones de la piel y los tejidos blandos, neumonía, bacteriemia, entre otras [1]. Esta bacteria es una de las causas más comunes de infección en la comunidad y el ambiente hospitalario debido a los diversos factores de virulencia que posee y a su facilidad para adquirir elementos exógenos por transferencia horizontal, que le confiere una alta adaptación al medio y resistencia a los antimicrobianos [2].

El impacto de *Staphylococcus aureus* sobre la salud humana radica en la resistencia que puede presentar a múltiples antibióticos, sobre todo a la metilina. Esta situación ha llevado, a través de los años, al incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad a pesar del gran número de antibióticos disponibles comercialmente. La diseminación de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA; del inglés, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) por todos los hospitales del mundo representa uno de los mayores retos terapéuticos en la actualidad para la medicina [3] y un gran desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable de su atención en las unidades donde se llegan a presentar infecciones por este patógeno, siendo estas de gran importancia clínica y epidemiológica debido al aumento en los días de hospitalización así como los costos de atención que generan [4].

La resistencia a metilina en *Staphylococcus aureus* ha incrementado a nivel mundial. En algunos hospitales de Japón y China (Hong-Kong) se han reportado tasas de aislados resistentes a la metilina que superan el 70,0% y en algunos de países de América Latina (Argentina, Brasil y Chile) y en los Estados Unidos entre el 30% y el 40% [5]. El Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC; del inglés, *European Center for Diseases Control and Prevention*) documentó prevalencias de resistencia a la metilina hasta en el 41,2% de los aislados de *Staphylococcus aureus* implicados en infecciones asociadas al cuidado de la salud en toda Europa [6] mientras que en Asia, en países como Corea del Sur, Vietnam y Taiwán, esta prevalencia supera el 60% de los aislados [7]. Un estudio multicéntrico realizado en América Latina por Reyes y colaboradores, evidenció prevalencias de resistencia a la metilina en Perú del 62%, Colombia del 45%, Ecuador del 28% y Venezuela del 26%, respectivamente [8].

La situación de la resistencia a metilina en *Staphylococcus aureus* a nivel nacional y local no difiere mucho del panorama mundial. El laboratorio de microbiología del Grupo Para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá (GREBO), para el año 2013, en varios hospitales de tercer nivel de Bogotá, Manizales, Villavicencio, Ibagué, Tunja, Neiva y Valledupar, documentó una prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en las Unidades de Cuidados Intensivos de adultos y pediátrica del 23,4% y 32,5%, y para el área de hospitalización de adultos y pediátricas de 34,8% y 42,3%, respectivamente [9]. Estudios realizados en un hospital de la ciudad de Valledupar, Colombia, por Morales y colaboradores, entre 2007 y 2008, y en el primer semestre del 2009, documentaron prevalencias de resistencia a la metilina en esta bacteria del 17% y el 61%, respectivamente [10,11].

La detección de la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus aureus* utilizando métodos fenotípicos habituales es complicada debido a la heterogeneidad de la expresión de resistencia fenotípica, debida a que a pesar de que una población bacteriana posee el gen *mecA*, la mayoría de las bacterias son sensibles a la meticilina *in vitro* y sólo una pequeña proporción (entre 1 por cada 10^4 a 10^8) manifiestan la resistencia, dificultando la detección del verdadero perfil de susceptibilidad en el laboratorio [12]. La mayoría de los aislamientos clínicos presentan este patrón de heteroresistencia bajo las condiciones rutinarias de cultivo, teniendo en cuenta los puntos de corte establecidos de sensibilidad a los antibióticos; por tal razón, variables como la concentración del inóculo, la osmolaridad del medio del cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación, que influyen en la expresión del fenotipo resistente, se deben considerar al realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana [13].

La resistencia a la meticilina es producida por la adquisición del gen *mecA*, localizado en el cassette cromosómico estafilocócico *mec*, el cual codifica para la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a del inglés *penicillin binding protein 2a*) que tiene una baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos, a excepción del ceftobiprol y la ceftarolina, y, por lo tanto, permite que se mantenga la actividad de la transpeptidasa para la síntesis de la pared bacteriana y la supervivencia de la bacteria [14,15]. Este problema se agrava aún más, ya que el gen *mecA*, además de conferir resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, contiene genes de resistencia adicionales como consecuencia de la integración de plásmidos y transposones que codifican para la resistencia a la eritromicina, la espectinomicina, la tetraciclina, la kanamicina y otros antibióticos no β -lactámicos [15], lo que da lugar a cepas multiresistentes que limitan las opciones terapéuticas. Además de la producción de proteínas PBP2a (codificadas por el gen *mecA*), la resistencia a la meticilina puede ser conferida en menor proporción por otros mecanismos como la hiperproducción de betalactamasas, la modificación o la hiperproducción de las proteínas de unión a la penicilina o la hiperproducción de enzimas meticilinasas [16].

Teniendo en cuenta el enorme potencial patógeno de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, la resistencia relativamente alta documentada para este antibiótico y las limitaciones que se han descrito para la detección por métodos fenotípicos, el objetivo de este trabajo fue comparar la capacidad de algunos métodos fenotípicos para detectar la resistencia a la meticilina en aislados de *Staphylococcus aureus* utilizando la identificación molecular (presencia o ausencia del gen *mecA*) como método de referencia.

Materiales y métodos

Tipo y población de estudio

Se realizó un estudio transversal descriptivo y de alcance analítico. La población de estudio corresponde a aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* obtenidos de muestras de pacientes hospitalizados en el Hospital Rosario Pumarejo de López de la ciudad de Valledupar, Colombia, o que solicitaron los servicios de consulta externa o urgencias para cultivo microbiológico de cualquier secreción o sitio anatómico, durante abril y julio de 2013. Se incluyeron todos los cultivos confirmados por laboratorio como *Staphylococcus aureus*, y se excluyeron aquellos que estuvieran erróneamente clasificados como *Staphylococcus aureus* o que presentaban contaminación evidente con otro microorganismo.

Métodos fenotípicos evaluados

La resistencia fenotípica a la meticilina de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* se evaluó con los métodos: a) microdilución en caldo mediante el sistema automatizado MicroScan® (Siemens AG, Múnich,

Alemania), utilizando los antibióticos oxacilina y ceftioxitina, b) difusión en agar de Kirby Bauer utilizando el antibiótico ceftioxitina y c) dilución en agar con oxacilina, siguiendo los protocolos establecidos para cada uno de ellos, según los lineamientos estipulados por el Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico (CLSI; del inglés, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) en el 2013 [17].

Determinación de resistencia a la metilina por métodos fenotípicos

Para la detección fenotípica de la resistencia a la metilina por los métodos fenotípicos se tuvieron en cuenta los siguientes protocolos y variables según los lineamientos del CLSI 2013 [17]:

→ Método de difusión en agar de Kirby Bauer: se utilizó el agar Mueller Hinton y el disco de ceftioxitin (30 µg/mL), con temperaturas de incubación entre 33 °C y 35 °C y un tiempo de lectura de los halos de inhibición de 16 a 24 horas. Dado que el antibiótico ceftioxitin es un buen predictor de la presencia del gen *mecA*, un halo menor o igual a 21 mm se interpretó como *mecA* positivo y un halo mayor que 21 mm como *mecA* negativos. No se utilizó el antibiótico oxacilina, ya que el CLSI abolió los puntos de corte para este antibiótico en este método.

→ Método de microdilución en caldo: se utilizó el caldo Mueller Hinton ajustado con cationes A concentraciones de 20-25 mg de Ca⁺⁺ y 10-12,5 mg de Mg⁺⁺. Se evaluaron los antibióticos oxacilina (1 µg/mL) y ceftioxitin (30 µg/mL) a temperaturas de incubación entre 33 °C y 35 °C y tiempo de incubación entre 16 y 20 horas. Una concentración inhibitoria mínima (CIM) mayor de 4 µg/mL se interpreta como *mecA* positivo y menor o igual a 4 µg/mL indican sensibilidad a la metilina y la no presencia del gen *mecA*.

→ Método de dilución en agar: se utilizó agar Mueller Hinton suplementado con 4% de NaCl y 6 µg/mL de oxacilina. La siembra o inoculación se realizó en forma de estría previa suspensión del inóculo en solución salina a una escala de 0,5 de McFarland. Las temperaturas de incubación estuvieron entre 33°C y 35°C y el tiempo de incubación fue de 24 horas. El crecimiento de una o más colonias se consideró indicativo de la resistencia a oxacilina.

Determinación de resistencia a la metilina por métodos moleculares

La extracción del ADN bacteriano de los aislados de *Staphylococcus aureus* se realizó utilizando un procedimiento de lisis enzimática utilizando solución tampón TE, SDS (dodecilsulfato sódico), proteinasa K, NaCl, CTAB/NaCl. Posteriormente se utilizó cloroformo/alcohol isoamílico e isopropanol para precipitar el ácido nucleico. El ADN fue lavado dos veces con etanol al 70% para remover los restos de CTAB. Luego de la extracción del ADN se evaluó su integridad y pureza mediante lectura en espectrofotómetro UV (Nanodrop/Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos). La concentración de ácidos nucleicos se determinó midiendo a 260 nm y comparando con un blanco. Se empleó el cociente A260/A280 para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes de ADN puro oscilaron entre 1,8 y 2,0.

La detección del gen *mecA* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa sencilla, utilizando los cebadores: *mecA*-Plus: 5'TGGCTATCGTGTCACAATCG3' y *mecA*-mini: 5'CTGGAACCTTGTGAGCAGAG3' que corresponden a una región altamente conservada del gen *mecA* de 310 pb, descrito por Vannuffel y colaboradores [18]. Como control interno positivo para verificar el género y la especie se utilizó el gen *nucA* que codifica para una termonucleasa extracelular presente en todos los *Staphylo-*

coccus aureus, utilizando las secuencias de los cebadores: NUC1: 5'GCGATTGATGGTGATACGGTT3' y NUC2: 5'AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC3', correspondiente a un fragmento de 279 pb descrito previamente por Brakstad y colaboradores [19]. Como control negativo de la reacción se utilizó agua en lugar del ADN molde, el cual fue usado también como control ambiental. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Para realizar la amplificación de los ADN de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* se utilizó una mezcla de reacción para un volumen total de 25 µL compuesta por 2,5 µL de solución tampón (10x), 3,0 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 2,5 µL de los cebadores *mecA* y *nucA* (concentraciones finales de 1,5 pmol y 1,0 pmol, respectivamente), 0,5 µL de los desoxinucleótidos trifosfato (0,4 mM) y 0,5 de la Taq polimerasa (5 U; Promega Corporation, Wisconsin, Estados Unidos). Las reacciones se corrieron bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto, a 56 °C por 1 minuto y a 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) y teñidos con bromuro de etidio para su posterior visualización con luz UV en un documentador de geles Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos).

Como control de calidad para la detección fenotípica y genotípica de la resistencia a la meticilina se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y ATCC 29213 (negativas para *mecA*) como control negativo para los métodos de difusión en disco y microdilución en caldo y dilución en agar, respectivamente, y la cepa ATCC 43300 (positiva para *mecA*) como control positivo para todos los métodos.

Las muestras utilizadas para la determinación de la resistencia a meticilina mediante los métodos fenotípicos y moleculares mencionados se procesaron de forma independiente, sin conocimiento previo de los resultados obtenidos con cada método.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Microsoft Excel 2007 (v12.0; Microsoft, Washington, Estados Unidos). Para comparar los métodos fenotípicos de resistencia a la meticilina con el método de referencia, la reacción en cadena de la polimerasa, se crearon tablas de contingencia de 2x2 y los resultados fenotípicamente positivos (resistentes a la meticilina) y negativos (sensibles a la meticilina) se clasificaron como verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos tomando como referencia la presencia o ausencia del gen *mecA*. A partir de estos valores se realizó el cálculo de la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de cada uno de los métodos fenotípicos utilizados.

A partir de las tablas de 2x2 se calculó el parámetro de eficiencia diagnóstica, correspondiente al porcentaje del total de resultados correctamente clasificados como resistentes o sensibles con el uso de cada una de las pruebas, mediante la suma de los verdaderos positivos (VP) y los verdaderos negativos (VN) dividida la suma de los verdaderos positivos (VP), los falsos positivos (FP), los falsos negativos (FN) y los verdaderos negativos (VN), multiplicado por cien, así:

$$\text{Eficiencia} = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN} \times 100$$

Para determinar la concordancia entre la resistencia fenotípica y la genotípica a la meticilina en los aislados *Staphylococcus aureus*, cada método fenotípico fue comparado con el estándar de referencia (análisis genotípico) mediante el cálculo de la proporción, la desviación estándar y los valores del puntaje típico o

estándar calculado (Z_c) de cada método. Finalmente, se calculó la efectividad de los métodos fenotípicos de difusión en agar y microdilución en caldo, los más utilizados de rutina en los laboratorios de microbiología, para determinar la susceptibilidad a la meticilina en *Staphylococcus aureus*, mediante el análisis estadístico de la asociación entre el método evaluado (variable predictiva) y el resultado de sensibilidad/resistencia a la meticilina (variable de desenlace).

Todos los resultados se extrapolaron a una prueba de hipótesis para la diferencia de proporciones con un nivel de significancia del 5% y un límite de confianza de la zona de aceptación hasta -1,96.

Consideraciones éticas

El comité de ética de la Universidad de Santander de Valledupar aprobó la investigación calificándola apropiada y de bajo riesgo. El trabajo se realizó siguiendo las normas nacionales e internacionales que regulan la investigación con muestras de origen humano, siguiendo los parámetros del decreto 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. La confidencialidad de los resultados prevaleció todo el tiempo y las muestras de ADN fueron congeladas para futuras investigaciones.

Resultados

Se obtuvieron 50 aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* de pacientes hospitalizados o que solicitaron los servicios por consulta externa o urgencias en el Hospital Rosario Pumarejo de López de Valledupar, Colombia, durante el período de abril a julio de 2013, cuya identificación de género y especie fue confirmada mediante la amplificación del gen *nucA* por reacción en cadena de la polimerasa sencilla.

Resistencia a la meticilina por métodos fenotípicos

Los resultados del análisis fenotípico de la resistencia a meticilina mostraron un fenotipo de resistencia en el 50% (25/50) de los aislados con los métodos de difusión en agar por Kirby Bauer y microdilución en caldo con cefoxitina y dilución en agar con oxacilina, y en el 52% (26/50) con el método de microdilución en caldo con oxacilina.

Resistencia a la meticilina por métodos genotípicos

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó para determinar la presencia o ausencia del gen *mecA* en los 50 aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, encontrando que 21 (42,0%) de ellos eran portadores del gen independiente de su fenotipo de susceptibilidad *in vitro*. Por su parte, el gen *mecA* estuvo presente en el 76,0% (19/25) de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina que fueron determinados por el método de difusión en agar por Kirby Bauer con cefoxitina, el 73,1% (19/26) por la microdilución en caldo con oxacilina y el 72,0% (18/25) por la microdilución en caldo con cefoxitina y la dilución en agar con oxacilina.

Del total de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, 10 mostraron un resultado discrepante entre por lo menos uno de los métodos fenotípicos utilizados y la reacción en cadena de la polimerasa, siete (aislados 22, 24, 25, 33, 46, 48 y 49) fueron fenotípicamente resistentes a la meticilina pero no presentaron el gen *mecA* y tres (aislados 12, 15 y 47) presentaron el gen *mecA* pero fueron fenotípicamente sensibles a la meticilina (véase [tabla 1](#)).

Tabla 1. Aislados que mostraron disparidad entre los resultados de los métodos fenotípicos y genotípicos

Aislado	Difusión agar de Kirby Bauer (cefoxitina)	Microdilución caldo (cefoxitina)	Microdilución caldo (oxacilina)	Dilución en agar (oxacilina)	Reacción en cadena de la polimerasa (gen mecA)
Aislados resistentes fenotípicamente pero no genotípicamente (falsos positivos)					
22	Resistente	Resistente	Resistente	Positivo (resistente)	Negativo
24	Resistente	Resistente	Resistente	Positivo (resistente)	Negativo
25	Resistente	Resistente	Resistente	Positivo (resistente)	Negativo
33	Resistente	Resistente	Resistente	Positivo (resistente)	Negativo
46	Resistente	Resistente	Resistente	Positivo (resistente)	Negativo
48	Resistente	Resistente	Resistente	Positivo (resistente)	Negativo
49	Sensible*	Resistente	Resistente	Positivo (resistente)	Negativo
Aislados sensibles fenotípicamente pero no genotípicamente (falsos negativos)					
12	Sensible	Sensible	Sensible	Negativo (sensible)	Positivo
15	Resistente*	Sensible	Resistente*	Negativo (sensible)	Positivo
47	Sensible	Sensible	Sensible	Negativo (sensible)	Positivo

*Resultados sin discrepancia respecto a la presencia/ausencia del gen mecA
Puntos de corte para interpretar resultados de resistencia en los métodos evaluados (CLSI 2013):
Cefoxitina en el método de difusión en agar: halo ≤ 21 mm
Cefoxitina en el método de microdilución en caldo: $> 4 \mu\text{g/mL}$
Oxacilina en el método de microdilución en caldo: $> 4 \mu\text{g/mL}$
Oxacilina en el método de dilución en agar: crecimiento de 1 o más colonias

Sensibilidad, especificidad, valores predictivos, positivos y negativos, y eficiencia de los métodos fenotípicos

Los resultados de las tablas de contingencia (2x2) de cada método fenotípico respecto al estándar de referencia demostraron que estos métodos son altamente sensibles (85,7% a 90,5%) y poseen un alto valor predictivo negativo (88,5% a 92,0%), mientras presentan una moderada especificidad (75,9% a 79,3%) y valor predictivo positivo (72,0% a 76,0%). También se observó que los métodos fenotípicos evaluados presentan una eficiencia moderada (80,4% a 84,0%) (véase [tabla 2](#)).

Tabla 2. Valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos, positivos y negativos, y la eficiencia para cada método fenotípico

Método	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)	Eficiencia diagnóstica (%)
Difusión en agar por Kirby Bauer (cefoxitina)	90,5	79,3	76,0	92,0	84,0
Microdilución en caldo (cefoxitina)	85,7	76,7	72,0	88,5	80,4
Microdilución en caldo (oxacilina)	90,5	75,9	73,1	91,7	82,0
Dilución en agar (oxacilina)	85,7	76,7	72,0	88,5	80,4

Los valores del puntaje típico o estándar calculado (Z_c) de la comparación estadística de los métodos fenotípicos con la portación o no del gen mecA (método genotípico) se tabularon en la [tabla 3](#), donde se observa que en ninguno de los casos hubo una significancia estadística y, por tanto, no hay diferencias entre los métodos de análisis fenotípicos y el genotípico.

Tabla 3. Concordancia entre la resistencia fenotípica y genotípica a la meticilina en *Staphylococcus aureus*

Método	Resistencia fenotípica a la meticilina		Resistencia genotípica (portación del gen <i>mecA</i>)		Puntaje típico o estándar calculado (Zc)
	N.º	%	N.º	%	
Difusión agar por Kirby Bauer (cefoxitina)	25	50	19	76	-1,85
Microdilución en caldo (cefoxitina)	25	52	18	72	-1,51
Microdilución en caldo (oxacilina)	26	50	19	73	-1,47
Dilución en agar (oxacilina)	25	50	18	72	-1,51

Efectividad de los métodos de microdilución en caldo y difusión en agar

El análisis de efectividad de los métodos de microdilución en caldo y difusión en agar permitió evidenciar que ambos métodos fenotípicos son seguros y confiables para determinar la resistencia a la meticilina en los aislados de *Staphylococcus aureus* ($p = 0,05$), pero no en los cultivos con fenotipos sensibles ($p=0,40$) (véase tabla 4).

Tabla 4. Análisis estadístico métodos de difusión en agar por Kirby Bauer y microdilución en caldo

Método Parámetro	Sensible		Resistente	
	Difusión en agar por Kirby Bauer (cefoxitina)	Microdilución en caldo (cefoxitina)	Difusión en agar de Kirby Bauer (cefoxitina)	Microdilución en caldo (cefoxitina)
Media	0,5	0,49	0,5	0,51
Desviación estándar	0,5	0,4999	0,5	0,4999
Valor p	0,40		0,05	

Discusión

Durante los últimos 30 años la prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina ha aumentado notablemente en todo el mundo. El fenotipo de resistencia a la meticilina de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* obtenidos en esta investigación, utilizando los métodos de difusión en agar por Kirby Bauer, microdilución en caldo y dilución en agar, con los antibióticos cefoxitina y oxacilina, fue relativamente alto (50% al 52%). Estos hallazgos son similares a las prevalencias de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina reportadas por otros autores en trabajos realizados en algunas ciudades de Colombia: Villavicencio (49,6%) [20], Pereira (45%) [21] y Valledupar (61,0%) [11] y en otros países como la India (Pune)(56% al 64%) [22], Malta (32% al 42%), Portugal (46% al 49%) y Rumania (50% al 62%) [23]. Otras investigaciones han referenciado en Colombia prevalencias bajas de resistencia a la meticilina en esta bacteria, con valores del 6,7% en personal del cuidado de la salud de la ciudad de Medellín [24] y del 7,6% en niños hospitalizados en Bucaramanga [25] y en hospitales del país en general del 8,6% [5]. De igual manera, en algunos países europeos como Holanda, Suecia y Dinamarca se documentan frecuencias de 0,9%, 1,0% y 2,5%, respectivamente [23].

Las pruebas moleculares mediante reacción en cadena de la polimerasa para determinar la presencia o ausencia del gen *mecA* revelaron discrepancia en los resultados de siete aislados fenotípicamente resistentes a la meticilina que no tenían el gen *mecA*. Esto, probablemente debido a que la reacción en cadena de la polimerasa, a pesar de ser el método estándar de oro para detectar el tipo de resistencia más frecuente en *Staphylococcus aureus*, la mediada por el gen *mecA*, no incluye ni detecta todos los mecanismos de resistencia a la meticilina

que pueden encontrarse en estos patógenos y a que los métodos fenotípicos presentan limitaciones para detectar *in vitro* los clones heteroresistentes en una población de *Staphylococcus aureus*. Es probable que los aislados obtenidos en este trabajo presenten un nivel de resistencia *borderline* (límite) a oxacilina (4 µg/mL a 8 µg/mL) y no produzcan la proteína de unión a penicilina 2a; sin embargo, la producción de penicilasas no fue determinada en este trabajo. Es sabido que este tipo de resistencia es causada por la modificación de los genes que codifican para las proteínas de unión a penicilina nativas, la sobreexpresión de las proteínas de unión a penicilina nativas o a la hiperproducción de la β-lactamasa estafilocócica [26].

Aunado a lo anterior, recientemente se descubrió el gen *mecC*, el cual confiere resistencia a la metilina, pero no es detectado cuando se utilizan los cebadores para detectar el gen *mecA* en la reacción en cadena de la polimerasa, al codificar una PBP2a diferente a la codificada por el *mecA* (63% de similitud). Por lo tanto, es importante considerar la incorporación de cebadores del gen *mec* universales capaces de amplificar tanto *mecA* como *mecC* o la adición de cebadores específicos de *mecC* para la detección de resistencia a metilina en aislados de *Staphylococcus aureus*. Lo anterior representa un problema diagnóstico potencial que se debe tener en cuenta en los casos donde se observa disparidad entre los resultados de resistencia a la metilina obtenidos por los métodos fenotípicos y los moleculares en los aislados de *Staphylococcus aureus* [27].

Dos aislados (12 y 47) que presentaron el gen *mecA* fueron fenotípicamente sensibles a la metilina por todos los métodos analizados. Es probable que esta disparidad se deba a la sensibilidad moderadamente baja que presentaron los métodos examinados, ya que se conoce que entre más sensible sea una prueba diagnóstica menor es la probabilidad de obtener falsos negativos [28]; además, puede ser debida a aislados de *Staphylococcus aureus* que portan el gen *mecA* y aun así no expresan el mecanismo de resistencia por los métodos fenotípicos, tal como sucedió en este trabajo con los aislados mencionados. Por lo tanto, desde el punto de vista epidemiológico, los aislados de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina por los métodos genotípicos, que no presentan resistencia fenotípicamente (falsos negativos), deben ser considerados sensibles a la metilina (MSSA; del inglés, *methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*) [29]; no obstante, desde el punto de vista clínico y terapéutico esto representa un grave problema de salud, teniendo en cuenta las importantes consecuencias para los pacientes que portan estas bacterias debido a la no implementación de un tratamiento oportuno y adecuado para la erradicación y control de la infección. La discrepancia de estos resultados corrobora la necesidad de desarrollar un método para la detección de la resistencia a la metilina con un alto grado de sensibilidad para evitar los falsos negativos.

La presencia de aislados con disparidad entre los resultados fenotípicos y moleculares demuestra que la detección de la resistencia mediante métodos fenotípicos y la amplificación del gen *mecA* no deben ser utilizados como métodos separados para la detección de la resistencia a la metilina, ya que pueden haber otros mecanismos de resistencia involucrados. En cuanto a los métodos fenotípicos, es recomendable que para la detección de la resistencia a la metilina se usen en paralelo los antibióticos cefoxitina y oxacilina, ya que la prueba con oxacilina puede detectar la resistencia a la metilina mediada por varios mecanismos incluyendo el gen *mecA* y con la cefoxitina se puede predecir la resistencia a la metilina mediada por el gen *mecA*, teniendo en cuenta que actúa como inductor de la expresión de dicho gen [30-33].

Los porcentajes de sensibilidad al antibiótico cefoxitina, encontrados en esta investigación, son similares a los de otros autores, quienes reportaron valores hasta del 100% de sensibilidad [26,29,34-39]. Todos ellos concluyeron que la prueba de difusión por disco con cefoxitina es excelente para predecir la presencia de *mecA* en *Staphylococcus aureus*, ya que presenta un alto grado de sensibilidad y especificidad en comparación con la reacción en cadena de la polimerasa y es muy preciso para la detección de resistencia a la metilina. Esto, respalda los resultados obtenidos en esta investigación, ya que el método que presentó

una mayor sensibilidad, especificidad y eficiencia para detectar la resistencia a la metilina fue el de difusión en agar con el antibiótico cefoxitina.

Además, la concordancia de los resultados de la prueba de difusión en disco de cefoxitina con la reacción en cadena de la polimerasa realizada para evidenciar el gen *mecA*, demuestra que la utilización de este antibiótico, en lugar de la oxacilina, tiene la ventaja de ser mejor inductor de la expresión del gen *mecA*, y más sensible con las poblaciones de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina con nivel bajo de resistencia, las cuales generalmente son clasificadas erróneamente como *Staphylococcus aureus* sensibles a metilina y la prueba puede ser una alternativa a la reacción en cadena de la polimerasa para su detección en configuración de la restricción de recursos [17,40].

La baja especificidad de los métodos fenotípicos evaluados en esta investigación coinciden con la obtención de siete aislados falsamente resistentes (cepas con fenotipo resistente y *mecA* negativas), pues como es bien sabido entre más específica sea una prueba, menor probabilidad de obtener falsos positivos. La prueba de hipótesis para diferencia de proporciones realizada para comparar los métodos fenotípicos y a éstos con el estándar de oro (determinación de la presencia o ausencia del gen *mecA*) demostró que los métodos fenotípicos son buenos y confiables, y presentan un bajo riesgo de error para detectar la resistencia a la metilina en los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

A pesar de lo anterior, la moderada sensibilidad, especificidad y eficiencia de cada método indica su limitada capacidad para diferenciar *Staphylococcus aureus* con resistencia a la metilina mediada por otros mecanismos diferentes a los relacionados con el gen *mecA*. En este sentido, los resultados de este trabajo apoyan la necesidad de categorizar a los *Staphylococcus aureus* aislados según su resistencia a la metilina mediante el uso de varios métodos, que brinden la información completa del perfil de susceptibilidad de los aislados. Esto, para orientar el manejo terapéutico más acertado y el uso más racional de los antibióticos que permita optimizar los recursos, haciendo más accesibles los medicamentos a los pacientes infectados por cepas resistentes a metilina o *borderline* y evitar la administración de antibióticos de amplio espectro en los pacientes infectados con *Staphylococcus aureus* sensibles a metilina y que pueden llevar a la aparición de aislados resistentes en nuevos pacientes.

La aplicabilidad de los métodos de diagnóstico fenotípicos y la determinación de las limitaciones y bondades de los mismos permitirá la implementación de controles de calidad en cada prueba que disminuyan, en un alto porcentaje, los errores técnicos que interfieren en la detección temprana y eficaz de la resistencia a la metilina. De esta manera, se podría contribuir a la contención de este patógeno multiresistente y de las consecuencias negativas que tiene para los pacientes infectados y las instituciones prestadoras de salud; además, al establecimiento de estrategias eficaces para el control de las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a metilina y al uso apropiado de la terapia antimicrobiana. Entre las limitaciones de este estudio se encuentra la no inclusión de todos los genes que, aunque en menor proporción, pueden producir *in vitro* resistencia a la metilina no mediada por el gen *mecA*, como son las mutaciones en los genes que codifican para las proteínas de unión a penicilina que puedan conducir a la resistencia o el gen *mecC*, descubierto recientemente.

Conclusiones

La determinación del gen *mecA* es considerada la prueba estándar de referencia para la detección de resistencia a la metilina en *Staphylococcus aureus*; sin embargo, la utilización de esta metodología no se

realiza de forma rutinaria en los laboratorios y centros hospitalarios por los costos que demanda. Cabe resaltar que ningún método fenotípico o molecular incluye ni detecta todos los mecanismos de resistencia a la meticilina que pueden encontrarse en estos patógenos. En este trabajo ninguno de los métodos fenotípicos analizados mostró un 100% de sensibilidad y especificidad, y el 18% de los aislados evidenció disparidad entre el análisis fenotípico y el genotípico (presencia o ausencia del gen *mecA*). Por tal razón, es imprescindible realizar un riguroso control de calidad y seguir los protocolos estándares para minimizar los errores en la detección de la resistencia a meticilina en los aislados de *Staphylococcus aureus*.

Bibliografía

1. **Bustos-Martínez JA H-PA, Gutiérrez-Cárdenas M.** *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed* 2006; 17: 287-305.
2. **Rivas Rangel AG, González Castilla E, De Lira Torres MA, Flores Santos A, Fragoso Morales LE.** Pacientes de sexo masculino ¿Mayor susceptibilidad a infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina? *Enf Inf Microbiol* 2014; 34: 50-53.
3. **Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM.** Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 2014; 61 28-40.
4. **Olaechea PM, Insausti J, Blanco A, Luque P.** Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. *Med Intensiva* 2010; 34: 256-267.
5. **Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al.** Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32 Suppl 2: S114-132.
6. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Estocolmo: ECDC; 2013.
7. **Song JH, Hsueh PR, Chung DR, Ko KS, Kang CI, Peck KR, et al.** Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1061-1069.
8. **Reyes J, Rincon S, Diaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, et al.** Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1861-1867.
9. **Grupo Para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá.** 2014. Análisis de la vigilancia de la resistencia bacteriana año 2013. Componente pediátrico y adulto. http://www.grebo.org/documentos/Boletin_Grebo_2014.pdf, accessed ago 2015.
10. **Morales GI, Yaneth MC, Arango C, Hinojosa B.** Patrones de resistencia en *Staphylococcus* spp aislados en un centro hospitalario de la ciudad de Valledupar. *Rev Col Microb Trop* 2010; 1: 1-10.
11. **Morales GI, Yaneth MC, Milena Chávez K.** Caracterización de la resistencia in vitro a diferentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus* spp. en una institución hospitalaria de la ciudad de Valledupar entre enero y julio de 2009. *Rev Cienc Salud* 2012; 10: 169-177.
12. **Brown DF.** Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48 Suppl 1: 65-70.
13. **Wilson S M, Otth L C, Medina S G, Otth R L, Fernández J H, Arce M, et al.** Genotipos de *Staphylococcus aureus* con fenotipo meticilino resistente, aislados de pacientes del Hospital Base de Valdivia. *Rev Méd Chile* 2007; 135: 596-601.
14. **Castellano González MJ, Perozo-Mena AJ.** Mecanismos de resistencia a antibióticos β-lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera* 2010; 38: 18-35.
15. **Hanssen AM, Ericson Sollid JU.** SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 46: 8-20.
16. **Armas Fernández A, Suárez Trueba B, Crespo Toledo N, Suárez Casal A.** Resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina en aislamientos nosocomiales en un hospital provincial. *Gac Méd Espirit* 2015; 17: 80-91.
17. **Clinical Laboratory Standardization Institute (CLSI).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23 2013; 33: 1-199.
18. **Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmeé M, Wauters G, et al.** Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2864-2867.
19. **Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA.** Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1654-1660.
20. **Pérez N, Pavas N, Isabel Rodríguez E.** Resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos en un hospital de la orinoquia colombiana. *Infectio* 2010; 14: 167-173.

21. **García Montoya OJ, Montoya Restrepo JM.** Prevalencia de *Staphylococcus aureus* en los hemocultivos tomados en la Unidad de Cuidado Intensivo de adultos del Hospital Universitario San Jorge de Pereira. Tesis para optar al título de Especialista en Medicina Crítica y Cuidado Intensivo. Pereira, Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira; 2012.
22. **Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K.** Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 27-29.
23. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Estocolmo: ECDC; 2015.
24. **Londoño JF, Ortiz GM, Gaviria AM.** Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina en personal de la unidad de terapia intensiva de la Clínica Universitaria Bolivariana, Medellín 2004. *Infectio* 2006; 10: 160-166.
25. **Sosa Ávila LM, Machuca Pérez MA, Sosa Ávila CA, González Rugeles CI.** Infecciones por *Staphylococcus aureus* metilicina resistente en niños en Bucaramanga Colombia. *Rev Univ Ind Santander Salud* 2010; 42: 248-255.
26. **Castellano-González MJ, Perozo-Mena AJ, Vivas-Vega R.** Detección fenotípica y molecular de resistencia a metilicina en *S. aureus*. *Kasmera* 2008; 36: 28-38.
27. **Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA.** The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2014; 22: 42-47.
28. **Burgos D ME, Manterola D C.** Cómo interpretar un artículo sobre pruebas diagnósticas. *Rev Chil Cir* 2010; 62: 301-308.
29. **Acosta-Pérez G, Rodríguez-Ábrego G, Longoria-Revilla E, Castro-Mussot ME.** Evaluación de cuatro métodos para la detección de *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente de muestras clínicas en un hospital regional. *Salud Pública Méx* 2012; 54: 1-6.
30. **Adaleti R, Nakipoglu Y, Karahan ZC, Tasdemir C, Kaya F.** Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dev Ctries* 2008; 2: 46-50.
31. **Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, et al.** Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 379-382.
32. **Batista Díaz N, Gutiérrez González I, Lara Pérez M, Laich F, Méndez Álvarez S.** Evaluación del método de difusión en disco de 30 µg de cefoxitina en la detección de resistencia a metilicina en aislamientos seleccionados de *Staphylococcus aureus* *Rev Esp Quimioter* 2008; 21: 213-216.
33. **de Sousa Junior FC, Neri Gda S, Silva AK, de Araujo BP, de Paiva Dourado Guerra MJ, de 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: 316-320.
34. **Soloaga R, Corso A, Gagetti P, Faccione D, Galas M, Grupo Colaborador MRSA.** Detección de metilicina-resistencia en *Staphylococcus aureus*: Comparación de métodos convencionales y aglutinación con *mrsa*-Screen latex. *Rev Argent Microbiol* 2004; 36: 36-40.
35. **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.
36. **Mimica MJ, Berezin EN, Carvalho RL, Mimica IM, Mimica LM, Safadi MA, et al.** Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? *Braz J Infect Dis* 2007; 11: 415-417.
37. **Pramodhini S, Thenmozhivalli PR, Selvi R, Dillirani V, Vasumathi A, Agatha D.** Comparison of Various Phenotypic Methods and *mecA* Based PCR for the Detection of MRSA. *J Clin Diagn Res* 2011; 5: 1359-1362.
38. **Roisin S, Nonhoff C, Denis O, Struelens MJ.** Evaluation of new Vitek 2 card and disk diffusion method for determining susceptibility of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2525-2528.
39. **Sousa Júnior FCd, Néri GdS, Silva AK, Araújo BPRCd, Guerra MjdpD, Fernandes MjdbC, 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: 316-320.
40. **Kali A, Stephen S, Umadevi S.** Laboratory evaluation of phenotypic detection methods of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed J* 2014; 37: 411-414.