

# Detección mediante el Sistema DIRAMIC de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y comparación con otros métodos utilizado en la práctica clínica

**Ángela Mariana Zayas-Tamayo, Grether Barreras-García y Estrella Álvarez-Varela.**

Dirección de Medio Ambiente, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Avenida 25 y 158, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba.. [angela.zayas@cnic.edu.cu](mailto:angela.zayas@cnic.edu.cu)

Recibido: 19 de septiembre de 2012.

Aceptado: 6 de diciembre de 2012.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, meticilina resistente, DIRAMIC, aislados clínicos.

Key words: methicillin-resistant, DIRAMIC, clinical isolated.

**RESUMEN.** La detección temprana de infecciones estafilocócicas resistentes a la meticilina en pacientes hospitalizados es de vital importancia para reducir la tasa de morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios. El objetivo del presente estudio fue evaluar el sistema automatizado DIRAMIC para la detección de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y la comparación con otros métodos de detección: el método de difusión con el disco de oxacilina (1 µg) se utilizó como método de referencia de acuerdo con las guías del Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI, siglas en inglés) el crecimiento en medio agar cromogénico selectivo (Oxacillin Resistent Screening Agar Base, ORSAB), aglutinación en látex para detectar la presencia de la proteína (PBP2a) y la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la cefoxitina por el método E-test. Se analizaron 113 cepas de *Staphylococcus spp* aisladas de muestras clínicas procedentes de cuatro hospitales de la provincia de La Habana, durante un periodo de un año. Para comparar los métodos de detección, se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo así como la eficiencia. De las cepas, 100 fueron identificadas como *Staphylococcus aureus*; según métodos bioquímicos. Se presentaron 76 cepas fenotipo SARM (76 %) y 24 fueron sensibles a meticilina (SASM) (24 %), mediante los métodos de crecimiento en medio agar cromogénico selectivo (ORSAB), difusión por disco y aglutinación en látex. El método E-test permitió detectar 69 cepas de SARM (69 %) y 31 (31 %) SASM. El Sistema DIRAMIC detectó 75 SARM (75 %) y 25 (25 %) SASM utilizando el disco de oxacilina (1 µg) con una sensibilidad del 98 % y especificidad del 100 % y con el disco de cefoxitina (30 µg) ocho cepas SARM (8 %) y 92 (92 %) SASM con una sensibilidad del 10 % y especificidad del 100 %, en comparación con el 100 % de sensibilidad, especificidad del método de doble difusión con disco de oxacilina y cefoxitina, ORSAB, PBP2a y 90 % de sensibilidad con E-test. El Sistema DIRAMIC demostró un alto nivel de sensibilidad y especificidad.

**ABSTRACT.** Early detection of staphylococcal infections resistant to methicillin in hospitalized patients is vital to reduce morbidity, mortality and hospital costs. The aim of this study was to evaluate the automated system for detecting DIRAMIC clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and compare to with other detection methods: the diffusion method with oxacillin disk (1 µg) was used as the reference method, according to the guidelines of the Institute for Clinical Laboratory Standards (CLSI, acronym in English), growth in selective chromogenic agar medium (Screening Agar Base Oxacillin resistant, ORSAB), latex agglutination to detect the presence of the protein (PBP2a) and the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of cefoxitin by the E-test method. There were analyzed 113 strains of *Staphylococcus spp* isolated from clinical specimens of four hospitals in Havana province, for a period of one year. In order to compare the detection methods, the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and efficiency were evaluated. Of the isolates, 100 were identified as *Staphylococcus aureus*, by as biochemical methods. 76 MRSA strains presented for the phenotype (76 %) and 24 were methicillin-sensitive (MSSA) (24 %) by using methods of growth in selective chromogenic agar medium, (ORSAB) disk diffusion and latex agglutination. The E-test method allowed the detection of 69 MRSA strains (69 %) and 31 (31 %) MSSA. The system detected 75 DIRAMIC MRSA (75 %) and 25 (25 %) by the MSSA

oxacillin disk (1 µg), with 98 % sensitivity and 100 % specificity and by the cefoxitin disk (30 µg), eight MRSA strains (8 %) and 92 (92 %) MSSA with a sensitivity 10 % and a specificity of 100 %, compared to 100 % sensitivity and specificity of the double diffusion method with oxacilline and cefoxitin, ORSAB, PBP2a and 90 % sensitivity with the E-Test. The DIRAMIC System demonstrated a high level of sensitivity and specificity.

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) son los patógenos que se aíslan con mayor frecuencia en los laboratorios de microbiología a partir de muestras clínicas.<sup>1</sup> En América Latina, es la causa principal de infecciones nosocomiales y está aumentando el predominio de estos en infecciones adquiridas en la comunidad.<sup>2,3</sup>

Los SARM son resistentes a todos los antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos), por presentar el gen *mecA* que codifica para la producción de una proteína de unión a penicilina 2a (PBP 2a), que presenta baja afinidad por estos antibióticos; presentan además resistencia a otros grupos de antibióticos como los macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfas y quinolonas, considerándose como patógeno multiresistente.<sup>4,5</sup> Las cepas de SARM causan una amplia variedad de infecciones que oscilan en gravedad desde abscesos cutáneos hasta fascitis necrosante y neumonía necrosante con riesgo de muerte. La gravedad de la enfermedad, por lo general, está directamente relacionada con la producción de factores de virulencia específicos.<sup>6</sup> El tratamiento exitoso de estas infecciones es el diagnóstico temprano y preciso. En los hospitales, el diagnóstico se basa en una combinación de información epidemiológica, síntomas clínicos y una caracterización de las cepas de SARM que causa la infección.<sup>7</sup> En muchos países se han publicado pautas que resumen los protocolos y procedimientos recomendados para la identificación de SARM. El Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI del inglés Clinical Laboratory Standards Institute) en los EE. UU ha desarrollado una variedad de mejores prácticas que cubren todos los aspectos de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.<sup>8</sup> Actualmente, el CLSI recomienda el uso del disco de cefoxitina para las pruebas de susceptibilidad, debido a que detecta mejor la resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA*. La oxacilina sigue siendo una segunda opción, pero en diversas publicaciones se ha demostrado que cefoxitina es más confiable que la oxacilina.<sup>9,10</sup> Muchos laboratorios de microbiología utilizan sistemas automatizados para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos en *Staphylococcus aureus*. La mayoría de estos sistemas utilizan la oxacilina como único antibiótico para la detección de SARM. Solo los sistemas Vitek 2 (BioMérieux) y Phoenix (BD) han incluido cefoxitina con este propósito. Para el estudio de la sensibilidad a oxacilina en *S. aureus* en general, los sistemas que contienen este antibiótico ofrecen buenos niveles de sensibilidad y especificidad, sin embargo, en cepas con una expresión heterogénea de la resistencia (*mecA* positivas) la capacidad de estos sistemas puede verse disminuida. Por tanto, se debería contemplar la necesidad de confirmar la resistencia o sensibilidad obtenida por estos sistemas en determinadas circunstancias como por ejemplo, ante aislamientos importantes (obtenidos de hemocultivos, líquidos estériles), sospecha de fallo terapéutico o cuando se aíslan cepas con resistencias asociadas a otros grupos de antibióticos.<sup>11</sup> Desde el año 1995, se utiliza en Cuba el sistema automatizado DIRAMIC cuya evaluación demostró que es confiable para la detección de las infecciones urinarias y obtención de antibiogramas, por lo que se procedió a su uso en la rutina del laboratorio.<sup>12,13</sup> Tomando en cuenta el volumen considerable de muestras que se procesan en los laboratorios de los hospitales y la elevada frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus*, se llevó a cabo la presente investigación con el objetivo de evaluar la sensibilidad del sistema automatizado DIRAMIC en la detección de aislados

clínicos SARM utilizando cefoxitina (30 µg) y oxacilina (1 µg) y comparar este con otros métodos de detección tales como: el crecimiento en medio agar cromogénico (ORSAB), aglutinación en látex para detectar la presencia de la proteína PBP2a, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la cefoxitina por el método E-test y el de difusión del disco de oxacilina (1 µg) y de cefoxitina (30 µg) como método de referencia de acuerdo con las guías CLSI (2010).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Microorganismos ensayados**

Se analizaron 113 cepas aisladas de secreciones de heridas quirúrgicas, hemocultivos, lesiones de piel y líquido cefalorraquídeo (LCR) durante un periodo de un año en cuatro hospitales de la provincia de La Habana. La conservación de las cepas se llevó a cabo por el método de criopreservación a  $-70^{\circ}\text{C}$ , en medio Caldo de Mueller-Hinton (Unipath-Oxoid, UK) con 30 % de glicerol. Se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* meticilina resistente USA 300 como control negativo y positivo respectivamente.

### **Clasificación de las cepas**

Las cepas de *Staphylococcus spp* recibidas fueron identificadas con un número e introducidas en una base de datos. Los aislados fueron sembrados en medio enriquecido con agar sangre de carnero, se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  en aerobiosis durante 24-48 h, para confirmar la pureza del cultivo. La identificación se realizó tomando como base la morfología de la colonia, tinción de Gram, prueba de la catalasa, prueba de la coagulasa y el sistema de identificación rápida API (BioMérieux).<sup>14</sup>

### **Ensayos de susceptibilidad**

El estudio de la sensibilidad de las cepas se realizó mediante el método de difusión en discos siguiendo las recomendaciones del CLSI, 2010. Se preparó un inóculo con una turbidez 0,5 en la escala McFarland, mediante resuspensión directa de colonias a partir de un cultivo puro de 24 h en agar sangre, se inocularon en placas de agar de Mueller-Hinton de forma homogénea por toda la superficie, se dejaron secar durante 15 min y posteriormente, se colocaron discos de cefoxitina (30 µg) y oxacilina (1 µg), las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h en condiciones aeróbicas y los halos de inhibición fueron interpretados según criterios establecidos por el CLSI, 2010.

### **Crecimiento en medio agar cromogénico selectivo (ORSAB)**

Para detectar de manera selectiva las colonias de SARM, las cepas positivas a las pruebas bioquímicas fueron sembradas en medio ORSAB (Oxoid®) e incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Las colonias aisladas se tiñeron de color azul intenso, debido al componente azul de anilina (indicador de pH) que reacciona a los ácidos producidos por la fermentación del manitol por parte de las cepas SARM.

### **Detección de la proteína PBP2a mediante el ensayo de aglutinación en látex**

La proteína PBP2a (proteína de unión a penicilina 2a) está presente en las cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina. Mediante PBP2a Test Kit (Oxoid®) puede ser detectada esta proteína por la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales contra PBP2a. Para considerarse esta prueba positiva debe observarse aglutinación en tres minutos con el reactivo látex y no con el control, a las muestras a las cuales se les realizó previa extracción de la proteína.

### Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (E Test)

La CMI de cefoxitina, se determinó mediante el método E-Test® (AB Biodisk, Solna, Suecia). Se probó un intervalo de concentraciones entre 256 y 0,016 µg/mL, en agar Müller-Hinton y con un inóculo estandarizado en forma similar que en el método de difusión del disco. Se definió la CMI como la mínima concentración del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y se interpretó de acuerdo con los criterios del CLSI, 2010.<sup>15</sup>

### Ensayos de susceptibilidad con el DIRAMIC

Las cepas de *S. aureus* fueron sembradas en caldo Müller-Hinton DIRAMIC Kit Diagnóstico (DKD). Esta suspensión bacteriana fue ajustada hasta alcanzar 0,5 en la escala McFarland e inoculada en cada tira de antibiograma (compuesta por 24 pocillos). Cada pocillo contenía, un disco con el agente antimicrobiano a evaluar al que se adicionaron 200 µL de la suspensión de inóculo. Cada tira contó con un control positivo (200 µL del medio de cultivo con el microorganismo sin antimicrobiano) y un control negativo (200 µL del medio de cultivo solo). La medición se realizó en las primeras cuatro horas después de realizado el montaje. El Sistema DIRAMIC tiene establecidos de forma cuantitativa los criterios de corte de sensibilidad, intermedio y resistencia.

### Análisis estadístico

En el procesamiento de los resultados se utilizó el paquete de programas STATISTICA (versión 6,2). Para comparar los métodos de detección de resistencia, se determinó la sensibilidad (SEN), especificidad (ESP), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y la eficiencia (EFC) de cada uno de los métodos utilizados (Tabla 1), empleando el ensayos de susceptibilidad con discos de cefoxitina (30 µg) y oxacilina (1 µg), el crecimiento en el medio agar cromogénico (ORSAB), la detección de la proteína PBP2a mediante el ensayo de aglutinación en látex y el método E-Test® para cefoxitina como métodos de referencia.

**Tabla 1.** Parámetros evaluativos determinados para la comparación de los ensayos.

| Parámetros                      | Ecuación                  |
|---------------------------------|---------------------------|
| Sensibilidad                    | $SEN = (a/a+c). 100$      |
| Especificidad                   | $ESP = (d/b+d) .100$      |
| Valor predictivo de positividad | $VPP = (a/a+b . 100$      |
| Valor predictivo de negatividad | $VPN= (d/c+d). 100$       |
| Eficiencia                      | $EFC= (a+d/a+b+c+d). 100$ |

a Verdaderos positivos. b Falsos positivos. c Falsos negativos. d Verdaderos negativos.

### RESULTADOS

En el periodo de estudio se analizaron 113 cepas de *Staphylococcus* spp. Según la tinción de Gram, catalasa, coagulasa y API, fueron identificadas 100 cepas como *Staphylococcus aureus* y 13 como *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Resultados de la identificación de *Staphylococcus* spp.

| Métodos          | Total de cepas<br>N=113 |           |
|------------------|-------------------------|-----------|
|                  | <i>S. aureus</i>        | SCN       |
| Bioquímica y API | 100 (88 %)              | 13 (12 %) |

Los ensayos de susceptibilidad por el método de difusión con discos que contenían oxacilina (1 µg) y cefoxitina (30 µg) detectaron 76 (76 %) SARM y 24 (24 %) *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina (SASM) respectivamente. Idénticos resultados se obtuvieron con los métodos de ORSAB y el ensayo de aglutinación en látex. En comparación con el método E-Test utilizando la Cefoxitina, se detectaron 69 (69 %) SARM y 31 (31 %) SASM. Por este método, se encontraron siete aislados con resultados discrepantes que fueron negativos por E-Test y positivos por los métodos antes mencionados (Tabla 3).

**Tabla 3.** Comparación entre los diferentes métodos empleados para la detección de SARM.

| Método                                | <i>Staphylococcus aureus</i><br>(n = 100) |          |
|---------------------------------------|-------------------------------------------|----------|
|                                       | SARM (%)                                  | SASM (%) |
| Difusión con disco oxacilina (1 µg)   | 76 (76)                                   | 24 (24)  |
| Difusión con disco cefoxitina (30 µg) | 76 (76)                                   | 24 (24)  |
| ORSAB                                 | 76 (76)                                   | 24 (24)  |
| PBP2a                                 | 76 (76)                                   | 24 (24)  |
| E-TEST                                | 69(69)                                    | 31 (31)  |

Con el sistema automatizado DIRAMIC se detectaron ocho (8 %) SARM y 92 (92 %) SASM utilizando el disco de cefoxitina (30 µg) y con el de oxacilina (1 µg) fueron detectados 75 (75 %) SARM y 25 (25 %) SASM. En la comparación de los métodos de difusión con discos utilizando oxacilina (1 µg) y cefoxitina (30 µg), ORSAB y el ensayo de aglutinación en látex, se observaron 68 aislados de *S. aureus* con resultados discrepantes, los cuales fueron positivos por los métodos antes mencionados y negativos con el DIRAMIC, cuando fue utilizado el disco de cefoxitina. Las discrepancias en los resultados obtenidos con el DIRAMIC en relación con el resto de los métodos utilizados en el estudio, fue solo en un aislado cuando fue utilizado el disco de oxacilina; no se observó ningún caso que diera positivo por el Sistema DIRAMIC y negativo por los métodos de comparación en el presente estudio. En comparación con el E-Test se obtuvieron resultados discrepantes, ya que 61 aislados de *S.aureus* fueron positivos por

este método y negativos por DIRAMIC cuando se utilizó el disco de cefoxitina; en el caso en que se utilizó el disco de oxacilina solamente en seis aislados se obtuvieron resultados discrepantes entre los dos métodos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resultados del sistema DIRAMIC en la detección de SARM.

| DISCOS ATB         | SARM (%) | SASM (%) |
|--------------------|----------|----------|
| Cefoxitina (30 ug) | 8 (10)   | 92 (92)  |
| Oxacilina (1 ug)   | 75 (75)  | 25 (25)  |

La sensibilidad de los métodos de difusión con discos utilizando oxacilina (1 µg) y cefoxitina (30 µg), ORSAB y el ensayo de aglutinación en látex fue de un 100 %; en el caso del método de E-Test fue de 90 %. La sensibilidad obtenida para el Sistema DIRAMIC con el disco de cefoxitina fue del 10 %, mientras que con el disco de oxacilina fue de un 98 %.

La especificidad y el valor predictivo positivo fueron de un 100 % en todos los métodos probados. El valor predictivo negativo y la eficiencia fueron de un 81 y 93 % respectivamente con el método E-test. Con el DIRAMIC se obtuvieron mejores resultados para el valor predictivo negativo y la eficiencia cuando se utilizó el disco de oxacilina que cuando se utilizó el de cefoxitina (Tabla.5).

**Tabla 5.** Resultados de la evaluación del desempeño de los parámetros utilizados para la detección de SARM.

| Métodos                               | SEN | ESP | VPP (%) | VPN | EFC |
|---------------------------------------|-----|-----|---------|-----|-----|
| Difusión con disco oxacilina (1 µg)   | 100 | 100 | 100     | 100 | 100 |
| Difusión con disco cefoxitina (30 µg) | 100 | 100 | 100     | 100 | 100 |
| ORSAB                                 | 100 | 100 | 100     | 100 | 100 |
| PBP2a                                 | 100 | 100 | 100     | 100 | 100 |
| E-Test                                | 90  | 100 | 100     | 81  | 93  |
| FOX por DIRAMIC                       | 10  | 100 | 100     | 57  | 59  |
| OXA por DIRAMIC                       | 98  | 100 | 100     | 96  | 99  |

SEN Sensibilidad. ESP Especificidad. VPP Valor predictivo positivo. VPN Valor predictivo negativo. EFC Eficiencia.

## DISCUSIÓN

El presente estudio demostró la capacidad del sistema automatizado DIRAMIC para detectar la resistencia mediada por el gen *mecA* en *S. aureus* con el disco de oxacilina (1 µg) el cual está incluido en el juego de discos que corresponde a las pruebas de susceptibilidad para este género. La sensibilidad para la detección de SARM fue 98 % cuando se utilizó oxacilina, mientras que para el caso del disco de cefoxitina se obtuvo solo el 10 %.<sup>16</sup> Estos resultados difieren cuando se compara con el estudio realizado, en el cual analizaron 620 aislados de *Staphylococcus aureus* para la detección de SARM y fueron evaluados en paralelo dos sistemas automatizados diferentes, el Phoenix y el Vitek 2, utilizando discos de cefoxitina y oxacilina.<sup>17</sup> El resultado obtenido con el primero fue el aumento de la sensibilidad de un 97,8 % a un 99,8 %, cuando fueron combinadas la oxacilina y cefoxitina. En el sistema Vitek 2 el incremento fue del 98,2 % al 99,1 %.<sup>11,18</sup> Estos sistemas automatizados presentan el mismo principio de

funcionamiento que el DIRAMIC, es decir, que utilizan un indicador redox que detecta el crecimiento del microorganismo en presencia de un antibiótico, la diferencia está en que los sistemas Phoenix y Vitek 2 son una versión miniaturizada modificada de la técnica de doble dilución de microdilución en caldo y el DIRAMIC es la modificación de la técnica de difusión con discos, en la que un número determinado de discos de agentes antimicrobianos están organizados en una tira para la determinación del antibiograma a partir de colonias aisladas de muestras positivas.<sup>12,19</sup> Los resultados alcanzados con el Sistema DIRAMIC demuestran que el disco de oxacilina (1 ug) puede detectar cepas SARM con una sensibilidad del 98 % comparable con los métodos que recomienda la CLSI, 2010 cuando se utilizan discos de oxacilina (1 µg), el crecimiento en ORSAB y de la detección de PBP2a con 100 % de sensibilidad sin diferencias significativas comparados con otros estudios realizados por Alan y col. en los que informan una sensibilidad del disco de oxacilina del 99,14 %; mientras que la sensibilidad, los valores predictivo positivo y negativo, así como la eficiencia de los métodos ORSAB y del PBP2a fue del 100 % al igual que en el presente estudio; con excepción de la sensibilidad del disco de cefoxitina que en este estudio fue de un 10 %, 80 veces menor comparado con el método E-Test cuando se utilizó el disco de cefoxitina (90 %). El Sistema DIRAMIC en relación con otros que se ofertan en el mercado resultó competitivo para la detección de los *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina utilizando el disco de oxacilina. Desde su concepción, la tecnología DIRAMIC incluyó soluciones de gran racionalidad y originalidad, entre las que se destaca la introducción del concepto de lector óptico no convencional a microflujo continuo, que abarata y simplifica notablemente el sistema convirtiéndolo en una atractiva opción para países con recursos limitados. Tiene como ventajas sobre otros sistemas, que utiliza discos de agentes antimicrobianos que pueden incorporarse a voluntad, permitiendo conformar los juegos de diagnóstico atendiendo a las necesidades del cliente, con un alto nivel de flexibilidad, lo que lo hace competitivo con respecto a los juegos de diagnóstico existentes, en particular, las galerías para la determinación del antibiograma que habitualmente utilizan un conjunto rígido de agentes antimicrobianos especialmente diseñados para países específicos.<sup>13,20</sup>

El estudio comparativo realizado entre el Sistema DIRAMIC y otros métodos, demuestra que este sistema presenta un alto nivel de detección el cual resulta similar al de sus homólogos, para inferir, a partir de los fenotipos obtenidos, los mecanismos de resistencia presentes en la bacteria que sea estudiada.

## CONCLUSIONES

El Sistema DIRAMIC detecta en 4 h *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina utilizando el disco de oxacilina, lo que demuestra su utilidad como herramienta rápida y factible para determinar este fenotipo de resistencia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moya MA, Gómez MR, Molina DM, Mauri RO, González SJM, Alfonso SR. Emergencia de microorganismos multirresistentes en unidades de cuidados intensivos pediátricos y neonatales. Sexta Jornada Internacional de Infectología Pediátrica. 2006 Cuba; 959-7158-55-8.
2. Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. J Infect. 2009, 59 Suppl 1: S4-16.
3. Rodríguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Álvarez C, Bavestrello L, et al: Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. Int J Infect Dis. 2010, 14: e560-6.

4. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, *et al.* Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. N Engl J Med. 2003; 348:1342-7.
5. Tenover FC, Moellering RC, Jr. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2007; 44: 1208-15.
6. Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh, GF, Perdreau-Remington, F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2006; 193: 1495-503.
7. Zurita J, Mejía C y Guzmán-Blanco M. Diagnóstico y pruebas de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en América Latina. Rev Chil Infect. 2010; 27 (Supl 2): 70-80.
8. CLSI: 2010 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20, Wayne, PA.
9. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol. 2002; 40: 2766-71.
10. Mougeot C, Guillaumat-Tailliet J, Libert JM. *Staphylococcus aureus*: new detection of intrinsic resistance using the diffusion method. Pathol Biol. 2001; 49: 199-204.
11. Alan D Junkins, Shawn R. Lockhart, Kristopher P. Heilmann, Cassie L. Dohrn, Diana L. Von Stein, Patricia L. Winokur, Gary V. Doern, and Sandra S. Richter. BD Phoenix and Vitek 2 Detection of mecA-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* with Cefoxitin. J. Clin. microbiol. 2009; 47: 2879-2882.
12. García S, Acevedo Alcaraz C, Bennani A. Técnicas para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el laboratorio de microbiología clínica. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas, 2005. [Consultado 25 de mayo de 2012] Disponible: <http://www.aefa.es>.
13. Espino HM, Álvarez V E, Zayas T A, Contreras AR. Detección de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido por el sistema DIRAMIC: Comparación con los métodos doble difusión con discos y E-test. Rev Chil Infect. 2010; 27(6): 544-550
14. Llop A, Valdéz Dapena M, Zuazo JL. Microbiología y Parasitología. Tomo I Editorial Cuba, Ciencias Médicas, 2001.
15. Skov R, Smyth R, Larsen RA. Phenotypic Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* by Disk Diffusion Testing and Etest on Mueller-Hinton Agar J Clin Microbiol. 2006; 44: 4395-4399.
16. Nicole M. Broekema, Tam T. Van, Timothy A. Monson, *et al.* Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of mecA-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* in a Large-Scale Study. J Clin Microbiol. 2009; 47(1):217-219.
17. Fernández Clarence J, Fernández Lorna A. Collignon and Peter. Cefoxitin resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005; 55: 506–510.
18. Sandrine R, Claire N, Olivier D, and Marc J. Struelens Evaluation of New Vitek 2 Card and Disk Diffusion Method for Determining Susceptibility of

- Staphylococcus aureus* to Oxacillin. Journal of Clinical Microbiology. 2008, 2525-2528.
19. Fagundo SR, Cerro SM A, Jáuregui PJ. Evaluación de instrumento automatizado Phoenix en la identificación y antibiograma de bacterias de origen clínico. Bioquímica. 2007; 32(002):39-48.
  20. Travieso Ruiz F, Roura Carmona G, Romay Penabad C, Contreras Alarcón R. Evaluation of the DIRAMIC system for detection of urinary tract infections and for *Escherichia coli* identification. Rev Latinoam Microbiol. 2004;46(3-4):67-71.