

COMUNICACIÓN CORTA

**DETECCIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
RESISTENTE A METICILINA**

***DETECTION OF CLINICAL INSULATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS
RESISTANT TO METICILLIN***

Grether Barreras García ^a, Angela Mariana Zayas Tamayo ^b

^{a-b} Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) Cuba. grether.barreras@cnic.edu.cu

Recibido: 18/04/2019; **Aceptado:** 02/05/2019.

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas causan la muerte de millones de seres humanos en todas las regiones del planeta, y aunque se realizan grandes esfuerzos para la introducción de nuevos agentes quimioterapéuticos, las bacterias demuestran una notable capacidad para desarrollar resistencia a estos agentes antimicrobianos. El objetivo de este trabajo fue avalar el empleo del sistema semi-automatizado DIRAMIC 10 para la detección específica de SARM. El estudio se dividió en dos etapas: 1) Introducción de modificaciones en el sistemasemi-automatizado DIRAMIC 10, 2) Validación del sistema para la detección de SARM. Se analizaron 113 aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp procedentes de cuatro hospitales de la provincia de La Habana. El desempeño del sistema se comparó con el método de Kirby Bauer con los discos de oxacilina (1 µg) y de cefoxitina (30 µg). Se determinó la sensibilidad, especificidad, así como el índice de kappa. Alternativamente se utilizaron el método Oxacillin Agar Screening Plate y la aglutinación con partículas de látex PBP2a. A través de estos métodos se informaron 76 aislamientos de SARM, mientras que en el DIRAMIC se detectaron 75 utilizando el disco de oxacilina (sensibilidad del 98 %, especificidad del 100 % y un índice de kappa 0.896) y con el disco de cefoxitina solo ocho aislamientos (sensibilidad del 31.6 % y índice kappa casi nulo). Los resultados alcanzados del DIRAMIC 10 en este estudio, constituyen una evidencia de las

potencialidades para ser utilizado en el diagnóstico de infecciones por SARM. Esto refuerza o avala sus prestaciones y fundamentan la recomendación de extender su uso en la red nacional de laboratorios como una herramienta para contribuir al uso más adecuado de los antibióticos.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistente meticilina; DIRAMIC; susceptibilidad antimicrobiana.

ABSTRACT

Las enfermedades infecciosas causan la muerte de millones de seres humanos en todas las regiones del planeta, y aunque se realizan grandes esfuerzos para la introducción de nuevos agentes quimioterapéuticos, las bacterias demuestran una notable capacidad para desarrollar resistencia a estos agentes antimicrobianos. El objetivo de este trabajo fue avalar el empleo del sistema semi-automatizado DIRAMIC 10 para la detección específica de SARM. El estudio se dividió en dos etapas: 1) Introducción de modificaciones en el sistema semi-automatizado DIRAMIC 10, 2) Validación del sistema para la detección de SARM. Se analizaron 113 aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp procedentes de cuatro hospitales de la provincia de La Habana. El desempeño del sistema se comparó con el método de Kirby Bauer con los discos de oxacilina (1 µg) y de cefoxitina (30 µg). Se determinó la sensibilidad, especificidad, así como el índice de kappa. Alternativamente se utilizaron el método Oxacillin Agar Screening Plate y la aglutinación con partículas de látex PBP2a. A través de estos métodos se informaron 76 aislamientos de SARM, mientras que en el DIRAMIC se detectaron 75 utilizando el disco de oxacilina (sensibilidad del 98 %, especificidad del 100 % y un índice de kappa 0.896) y con el disco de cefoxitina solo ocho aislamientos (sensibilidad del 31.6 % y índice kappa casi nulo). Los resultados alcanzados del DIRAMIC 10 en este estudio, constituyen una evidencia de las potencialidades para ser utilizado en el diagnóstico de infecciones por SARM. Esto refuerza o avala sus prestaciones y fundamentan la recomendación de extender su uso en la red nacional de laboratorios como una herramienta para contribuir al uso más adecuado de los antibióticos.

Keywords: *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant; DIRAMIC; Antimicrobial susceptibility.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus resistentes a la meticilina (SARM) se sitúa entre las bacterias con mayor resistencia a los antimicrobianos a través de múltiples mecanismos intrínsecos o adquiridos. La detección temprana de infecciones de SARM en pacientes hospitalizados es de vital importancia para reducir la tasa de morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios¹.

En la práctica médica actual la imposición del tratamiento adecuado, resulta complicado pues es difícil predecir los patrones de resistencia de cada agente etiológico. Consecuentemente la terapia empírica se inicia generalmente con antimicrobianos de amplio espectro, alto costo y que provocan numerosos efectos adversos. Si el laboratorio de Microbiología no emite resultados oportunos, la terapia inicial se prolonga por más tiempo del necesario, incrementando los riesgos para el paciente, los costos hospitalarios y la resistencia antimicrobiana². Los métodos convencionales para la identificación y el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana, aunque resulta específico y sensible para este propósito son más demorado. En cambio, los sistemas automatizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y estudio de la susceptibilidad acortan el tiempo.

En Cuba, el DIRAMIC 10 es un sistema que permite diagnosticar la infección urinaria por *Escherichia coli* directamente a partir de una muestra de orina y determinar la sensibilidad antimicrobiana en 4 horas, a su vez garantiza la disponibilidad de un procedimiento semiautomático más barato para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos³.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Introducción de modificaciones en el sistema DIRAMIC 10 para extender su uso al estudio de susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Staphylococcus spp*

El impacto clínico de la resistencia antimicrobiana exige del estudio de los mecanismos implicados con el fin de contribuir a una adecuación rápida y específica del tratamiento, así como para el seguimiento y el control epidemiológico de las enfermedades infecciosas. Así, por ejemplo, una terapia antimicrobiana inapropiada ante casos de bacteriemia por SARM se considera el un factor asociado a la mortalidad^{4,5}.

Considerando que las bacterias han desarrollado en el proceso evolutivo formas cada vez más eficaces para evadir la acción de los antibióticos, uno de los retos más importantes que encaran los laboratorios de Microbiología es la capacidad de detectar la resistencia a tiempo. Para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad in vitro con sistemas automáticos y semiautomáticos es necesaria la inclusión de un gran número de antibióticos y poder inferir adecuadamente los mecanismos de resistencia implicados⁶.

De este modo se propuso que para el estudio de la susceptibilidad de aislamientos de *Staphylococcus* spp a través del sistema DIRAMIC 10 debían incluirse en la tira los siguientes antimicrobianos: cefoxitina (30µg), oxacilina (1 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg), penicilina (1 unidad), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), sulfametoaxol/trimetropin (25 µg), kanamicina (30 µg), cefazolina (30 µg), nitrofurantoina (300 µg), considerando las normas internacionales y las recomendaciones derivadas de las encuestas a los expertos nacionales⁷.

Validación del sistema DIRAMIC 10 para la detección de SARM.

El sistema detectó correctamente a la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 como sensible a meticilina y a la cepa *S. aureus* USA 300 como SARM, tanto para la oxacilina como la cefoxitina. De igual forma, la interpretación de la prueba de susceptibilidad a partir de la lectura de los halos de inhibición obtenidos para la primera concordó con lo referido por el CLSI y coincidió con la interpretación a través del DIRAMIC 10. La correspondencia entre los resultados obtenidos por ambos métodos avaló las modificaciones introducidas al sistema y permitió pasar a su evaluación frente a aislamientos clínicos de *S. aureus*.

Se analizaron 113 aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp procedentes de cuatro hospitales de la provincia de La Habana. De ellos 13 se clasificaron como estafilococos coagulasa negativa y 100 se confirmaron como *S. aureus*. Entre estas última, 76 se identificaron como SARM tanto en el ensayo de susceptibilidad por el método de difusión con los discos de oxacilina como de cefoxitina y se corroboró al emplear el método del Oxacillin Agar Screening Plate y el método de aglutinación con partículas de látex PBP2a. La gran mayoría de ellos (84.07%) se recuperaron de pacientes que acudieron a consulta externa; solo el 15.92% procedió de pacientes hospitalizados.

La evaluación del sistema se ejecutó a través del estudio de los 100 aislamientos confirmados como *S. aureus*: 76 clasificados SARM y 24 restantes SASM. A través del sistema automatizado DIRAMIC 10 solo se detectaron ocho SARM utilizando el disco de cefoxitina. En cambio, con el disco de oxacilina los resultados se aproximaron más a lo obtenido al emplear los métodos fenotípicos de referencia: 75 SARM y 25 SASM. Es decir, frente solo un aislamiento se obtuvo un resultado discrepante (Figura 1).

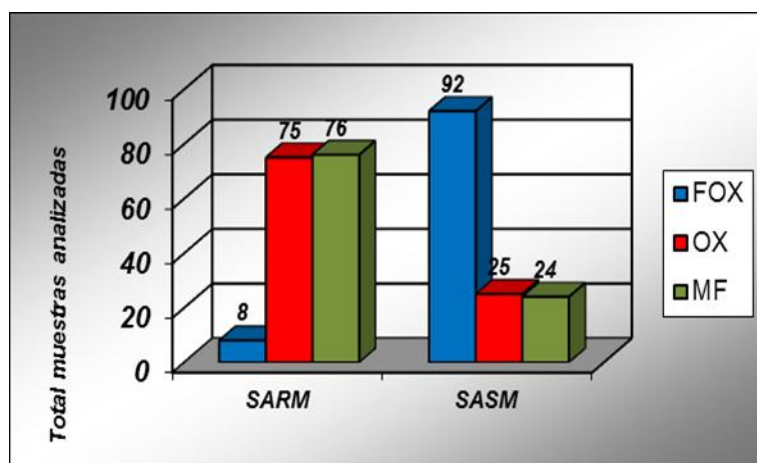


Figura 1. Detección de aislamientos de SARM y SASM empleando el sistema DIRAMIC vs resultados de la detección fenotípicas.

Leyenda: FOX: DIRAMIC - Cefotina, OX: DIRAMIC - Oxacilina, MF: Resultados por métodos fenotípicos (KB, ORSA y aglutinación por látex)

De acuerdo con estos resultados se obtuvo una sensibilidad del 98 % y especificidad 100% para la detección de SARM con el Sistema DIRAMIC 10 empleando el disco de oxacilina, al comparar con el método de KB. El grado de coorcondancia según el índice k obtenido fue superior a 0,80 indicativo de un grado de concordancia muy fuerte (Tabla 1). En cambio, la evaluación con el disco de cefoxitina demostró solo un 31.6 % de sensibilidad y un índice de kappa cerca de 0 lo que indicó un grado de coorcondancia nulo (Tabla 2).

Tabla 1. Comparación entre los resultados obtenidos para la detección de SARM a través del DIRAMIC 10 y el método de difusión en agar empleando el disco de oxacilina.

DIRAMIC 10	Difusión disco OX		Total	Sensibilidad	Especificidad	k
	Positivos	Negativos				
Positivos	75	0	75	98%	100%	0.896
Negativos	1	24	25			
Total	76	24	100			

Tabla 2. Comparación entre los resultados obtenidos para la detección de SARM a través del DIRAMIC 10 y el método de difusión en agar empleando el disco de cefoxitina.

DIRAMIC 10	Difusión disco FOX		Total	Sensibilidad	Especificidad	k
	Positivos	Negativos				
Positivos	8	0	8	31.6%	100%	0.05
Negativos	68	24	92			
Total	76	24	100			

FOX: cefoxitina, k: índice de kappa

La utilidad del disco de la oxacilina para la detección de SARM se documenta para otros sistemas automatizados como el Phoenix y el Vitek 2, que como el DIRAMIC 10 utilizan un indicador redox para detectar el crecimiento del microorganismo en presencia del antibiótico, pero difieren de este en que son una versión reducida de la técnica de microdilución en caldo. Así mismo, trabajando en el perfeccionamiento de estos sistemas, otros autores también han evaluado paralelamente la utilización de discos cefoxitina y oxacilina y han demostrado un aumento de la sensibilidad al utilizar cefoxitina^{8,9}. Sin embargo, es evidente que los resultados de la evaluación

del DIRAMIC 10 empleando el disco de cefoxitina no avalan en este estudio la factibilidad de su uso para la detección de aislamientos de SARM. Este es un hallazgo contradictorio y difícil de justificar en los momentos actuales en los que el empleo de la cefoxitina constituye la recomendación internacional para la identificación de este tipo de cepas. Una posible explicación a este comportamiento frente a la cefoxitina podría estar relacionada con la concentración de la droga en el disco (30 µg), según experiencias previas con otros antibióticos utilizados en el sistema ya que está condicionado que el DIRAMIC 10 es un sistema cuyo principio de funcionamiento es similar al del KB, pero en el que se hace una disolución de la droga sin llegar a variar su concentración.

Por otra parte, el estudio preliminar de estimación del costo del empleo del DIRAMIC 10 para la detección de SARM con respecto al método convencional de KB fue factible ya que para la realización del KB es evidente que el costo por concepto de materiales e insumos es superior que para el DIRAMIC 10. A esto se impone añadir que la adquisición de los mismos está sujeta a la ejecución de los planes anuales de presupuesto del sistema de salud, por lo que no siempre se dispone de ellos de manera oportuna y en buen estado de preservación. Por otro lado, el tiempo de incubación en esta prueba es también superior (24 h) lo que conlleva a un consumo energético mayor.

Los resultados alcanzados del DIRAMIC 10 en este estudio, no obstante, a las llamadas a la necesidad de perfeccionamiento, constituyen una evidencia de las potencialidades para ser utilizado en el diagnóstico de infecciones por SARM. Esto refuerza o avala sus prestaciones y fundamentan la recomendación de extender su uso en la red nacional de laboratorios como una herramienta para contribuir al uso más adecuado de los antibióticos¹⁰.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McClure JA, Zhang K. Complete genome sequence of a community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hypervirulent strain, USA300-C2406, isolated from a patient with a lethal case of necrotizing pneumonia. *Genome Announc.* 2017;5(22):1-3.
2. Quiñones Pérez Dianelys. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Rev Cubana Med Trop.* 2017;69(3).
3. Espino M, Álvarez E, Zayas A y Contreras R A. Detección de cepas productoras de β -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.
4. Gasch O, Camoez M, Domínguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, et al. Predictive factors for early mortality among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 28]; 68(6):[1423-30 pp.]. Available from: <http://jac.oxfordjournals.org/content/68/6/1423.abstract>.
5. Camou T, Zunino P, Hortal M. Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev. Méd. Urug.* 2017; (33):4.
6. Toraño G, Monzote A. Methicillin-resistant *S. aureus* in Cuba. *The APUA-Newsletter.* 2013;3(3):20-1
7. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Suscetibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
8. 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.
9. Serra Valdés Miguel Ángel. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Rev haban cienc méd.* 2017;16(3).
10. Fariña N. Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. *Mem. Inst. Inves. Cien.* 2016 14(1): 04-05.