

Detección fenotípica y molecular de resistencia a meticilina en *S. aureus*

Phenotypic and Molecular Detection of Methicillin Resistance in S. aureus

**Castellano-González, Maribel J.¹;
Perozo-Mena, Armindo J.² y Vivas-Vega, Rosana³**

¹Cátedra de Bacteriología General. Escuela de Bioanálisis. LUZ.

²Cátedra de Práctica Profesional de Bacteriología. Escuela de Bioanálisis. LUZ. Centro de Referencia Bacteriológica-SAHUM.

³Laboratorio de las Cátedras de Bacteriología General y Clínica. Escuela de Bioanálisis. LUZ. E-mail: maribelcast@interlink.net.ve

Resumen

La detección de resistencia a meticilina es complicada debido a la heterogeneidad de su expresión fenotípica; dificultando su detección en el laboratorio, lo que ha conducido al desarrollo de varias técnicas para incrementar su expresión *in vitro*. A fin de evaluar cuatro técnicas para la detección de resistencia a meticilina: método de difusión del disco con oxacilina (OX, 1 µg) y cefoxitin (FOX, 30 µg); screening test, concentración inhibitoria mínima (CIM) y detección de PBP2a, utilizando la presencia del gen *mecA* como método de referencia, se procesaron 286 cepas de *S. aureus*. Se determinó la sensibilidad (SEN), especificidad (ESP), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y eficiencia (EFC) de cada uno de los métodos. Se obtuvo un total de 50 cepas resistentes a oxacilina, PBP2a positivos (*mecA* positivos). La sensibilidad del disco de OX fue de 99.14% y la de FOX fue de 100%. La SEN, VPP, VPN y EFC de los otros métodos fue de 100%. Todas, a excepción del método de difusión del disco de OX (ESP de 99.14), resultaron 100% específicos.

Palabras clave: *S. aureus*, resistencia a meticilina, métodos fenotípicos, métodos moleculares.

Abstract

Detecting methicillin resistance is complicated due to the heterogeneity of its phenotypic expression, making its detection difficult in the laboratory; this has led to the development of several techniques to increase its expression *in vitro*. Four techniques for detecting methicillin resistance were evaluated: the disk diffusion method with oxacillin (OX, 1 µg) and cephoxitin (FOX, 30 µg); the screening test, minimum inhibitory concentration (MIC) and detection of PBP2a, using the presence of *mecA* gen as a reference method; 286 strains of *S. aureus*, were processed. The sensibility (SEN), specificity (SPE), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and efficiency (EFC) of each method were determined. A total of 50 oxacillin resistant, PBP2a positive (*mecA* positive) strains were obtained. Sensibility of the OX disk was 99.14%; and of the FOX disk was 100%. The SEN, PPV, NVP and EFC of the other methods were 100%. All the tests, except the OX disk diffusion method (99.14% of ESP), were 100% specific.

Key words: *S. aureus*, methicillin resistance, phenotypic methods, molecular methods.

Introducción

La aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (SAMR), fue descrita inicialmente en 1960, poco tiempo después de la introducción de este antibiótico en la práctica clínica (1). En esa época se utilizaba metilina para evaluar y tratar infecciones por *S. aureus*. Ahora, la metilina ya no es un agente de elección en el manejo clínico, ni para evaluar la susceptibilidad de *S. aureus*. En su lugar, se utiliza la oxacilina (más estable), por lo que el término correcto sería *S. aureus* resistente a oxacilina (SAOR); sin embargo, debido a su rol histórico, el acrónimo SAMR es aún usado por la mayoría para describir estos aislamientos (2).

Dicha resistencia es conferida por una proteína de unión a penicilina (PBP) adicional conocida como PBP2a o PBP2', la cual no está presente en las cepas susceptibles a metilina. La PBP2a es codificada por el gen *mecA*, el cual forma parte de un complejo móvil (*mec*) que reside dentro de una isla genómica, un elemento genético denominado Cassette Cromosómico Estafilocócico (SCC) en *S. aureus* (3).

Hasta la fecha, se han descrito diferentes variedades de SCC*mec* en *S. aureus* (4), los cuales varían dependiendo de su tamaño (21 a 67 kb), modificaciones en la región reguladora *mecA* (complejo *mec*), el tipo de recombinasas cromosómicas que posea el cassette (genes *ccr*) y los determinantes de resistencia que adquiera debido a la integración de plásmidos y/o transposones (5-7).

La detección de resistencia a metilina es complicada debido a la heterogeneidad de su expresión fenotípica; es decir, a pesar que todas las células de una población posean el gen, sólo 1 en 10⁴ a 1 en 10⁸ la manifiestan, dificultando su detección en el laboratorio (8), lo que ha conducido al desarrollo de varias técnicas para incrementar la expresión *in vitro* de dicha resistencia (9) y reducir el tiempo diagnóstico, mediante la búsqueda de metodologías sensibles y específicas (10, 11).

Las pruebas recomendadas por el CLSI (Instituto para la Estandarización de Laboratorios Clínicos, según sus siglas en inglés) (12), incluyen: el método del disco de oxacilina (OX, 1 µg) en agar Mueller Hinton (MH) incubado a 35°C, y la prueba de descarte en agar oxacilina (MH conteniendo 6 µg/mL de OX y 4% de NaCl).

Entre los métodos más recientes para la detección de resistencia a OX se encuentran: E-test® (AB Biodisk, Solna, Suecia) para la determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM), el sistema automatizado VITEK 2® (bioMérieux, La Balme les Grottes, Francia) y las pruebas de aglutinación de partículas de látex para la detección de PBP2a (13). Adicionalmente, se ha demostrado que el cefoxitin (cefamicina) *in vitro*, induce la producción de PBP2a en cepas de *S. aureus* meticilino sensibles (SAMS); por lo que el método de difusión del disco usando cefoxitin (FOX 30 µg) ha probado ser un buen ensayo para la detección de resistencia de bajo nivel a OX en cepas de *S. aureus* (12,14-16).

Debido al enorme potencial patógeno de las cepas SAMR y a que estas son aisladas con una frecuencia general de 25.40% en pacientes (42.10% en hospitalizados y 13.90% en pacientes ambulatorios) y de 16.36% entre el personal de salud que labora en el SAHUM (datos no publicados), se consideró pertinente realizar la presente investigación, con el objetivo general de evaluar cuatro técnicas para la detección de resistencia a meticilina en *S. aureus*: método de difusión del disco con oxacilina (1 µg) y cefoxitin (30 µg), screening test, concentración inhibitoria mínima (CIM) y detección de PBP2a, utilizando la presencia del gen *mecA*, como método de referencia.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas: se analizaron 286 cepas de *S. aureus* aisladas en el Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (CRB-SAHUM). La identificación de los aislamientos fue confirmada utilizando la metodología convencional: morfología colonial y celular, afinidad tintorial (reacción al Gram), coagulasa libre, catalasa, oxidación-fermen-

tación (OF) de la glucosa, fermentación del manitol, DNasa y factor de agregación (Staphylase test kit, Oxoid®).

Susceptibilidad antimicrobiana: la susceptibilidad y resistencia a los antibióticos fue determinada mediante el método de difusión del disco en agar (17), siguiendo los lineamientos del CLSI (12). A este fin, se preparó un inóculo estandarizado comparable con el tubo 0.5 de Mactarland, por resuspensión directa de colonias a partir de un cultivo puro de 24 horas en agar sangre (AS). Con ayuda de un hisopo estéril, se inoculó la superficie de una placa de agar Müeller Hinton (MH) y se procedió a probar los discos de antibióticos, particularmente, oxacilina (OX 1 µg). Las placas inoculadas se incubaron a 35–37°C exactamente por 24 horas en atmósfera aeróbica. En la lectura, se consideró como sensible toda cepa cuyo halo de inhibición, fuese ≥ 13 mm; resistente, con halos de inhibición ≤ 10 mm y como intermedias, aquellas con diámetros comprendidos entre 11 y 12 mm.

Determinación de resistencia a oxacilina con FOX (30 µg): adicionalmente al disco de oxacilina (1 µg), se utilizó el método de difusión del disco con cefoxitin (FOX 30 µg considerando como resistente un halo de inhibición ≤ 21 mm. y sensible; un halo ≥ 22 mm, acorde a los criterios del CLSI(12). Toda cepa resistente al disco de FOX, fue considerada como resistente a OX.

Determinación de la resistencia a oxacilina mediante el método de descarte (Screening test): a todas las cepas de *S. aureus* que resultaron intermedias o resistentes a OX por el método de difusión del disco en agar, se les efectuó el descarte en agar MH conteniendo 4% de NaCl (p/v 0.68 mol/L) y OX (6 µg/mL) con un inóculo de 100 µL de una suspensión estandarizada comparando con la turbidez del tubo 0.5 de

MacFarland, preparada por resuspensión directa de las colonias provenientes de un cultivo en agar sangre de 24 horas. Las placas fueron incubadas 24 horas exactas a 35°C en aerobiosis y examinadas luego, cuidadosamente, con luz transmitida para su lectura e interpretación, considerándose resistentes cuando se observó crecimiento de, al menos, una colonia (12).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a OX: a todas las cepas de *S. aureus* resistentes o intermedias a OX por el método de difusión del disco único de alta potencia, se les determinó la CIM a OX mediante el método de E-test® (AB Biodisk, Solna, Suecia), probándose un rango de concentraciones entre 256 y 0.016 µg/mL, en agar MH y con un inóculo estandarizado en forma similar que en el método de difusión del disco. Se definió la CIM como la mínima concentración del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y se interpretó de acuerdo a los criterios del CLSI (12), reportándose como resistentes las cepas con una CIM ≥ 4 µg/mL y como sensibles, aquellas cuya CIM era ≤ 2 µg/mL (Figura 1).

Determinación de la producción de PBP2a: la detección de PBP2a como producto del gen *mecA* fue realizada utilizando el PBP2a Test Kit (Oxoid®), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Este método se basa en la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales contra la proteína PBP2a (18-20).

Procedimiento de extracción de la PBP2a: Añadir 4 gotas del reactivo de extracción 1 en un tubo de microcentrífuga. Con un asa estéril, tomar 5-10 colonias provenientes de un medio de agar sangre y suspender en el tubo conteniendo el reactivo de extracción. Colocar el tubo en bloque térmico (más de 90°C) por 3 minutos. Retirar el tubo de prueba del calor y esperar a que alcance

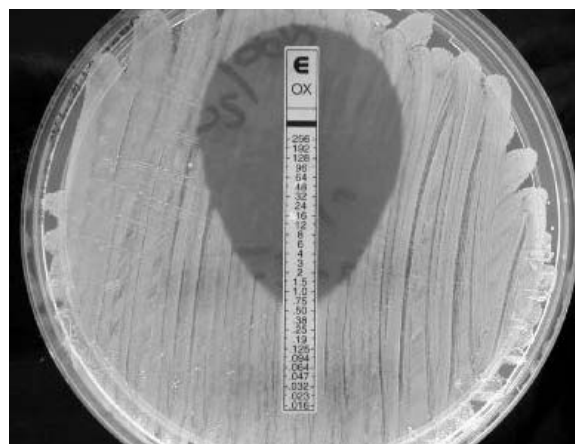


Figura 1. Determinación de CIM a OX en *S. aureus* por el método de E-test® 2007. CRB-SAHUM, Maracaibo (n=50).

temperatura ambiente. Añadir una gota del reactivo de extracción 2 y mezclar bien. Centrifugar a 1500 g durante 5 minutos y separar el sobrenadante.

Procedimiento de la aglutinación de partículas de látex: Para cada prueba a realizar, marcar un círculo en la tarjeta de reacción para el reactivo látex y otro para el control. Colocar 50 µL del sobrenadante en el círculo correspondiente y añadir una gota del reactivo látex. Mezclar bien con un aplicador. De la misma manera, colocar 50 µL del sobrenadante en el círculo marcado como control y añadir una gota del reactivo control. Mezclar bien con un aplicador. Imprimir un movimiento giratorio a la tarjeta durante 3 minutos y observar la aparición de aglutinación en condiciones normales de iluminación. Desechar la tarjeta de acuerdo con las normas de bioseguridad en un recipiente con desinfectante.

Lectura de la prueba: para considerar la prueba como positiva debe observarse aglutinación en 3 minutos con el reactivo látex y no con el control (Figura 2).

Detección del gen *mecA* (Determinante de la resistencia a oxacilina): se realizó mediante la técnica de Reacción en

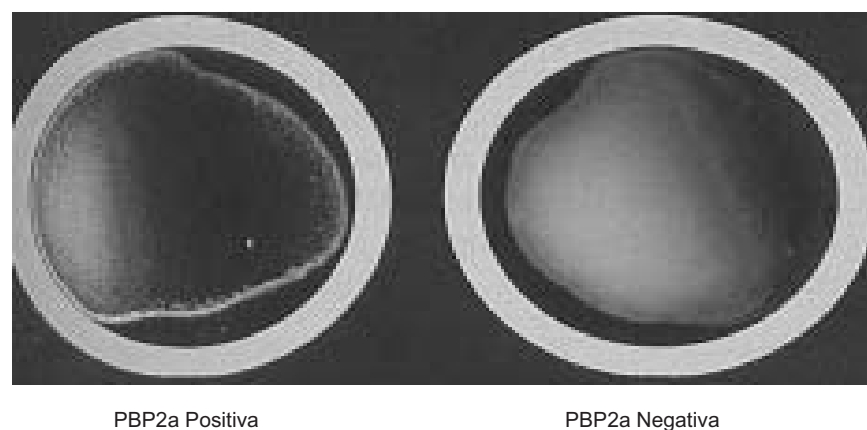


Figura 2. Detección de PBP2a en cepas de *S. aureus* mediante aglutinación de partículas de látex. 2007. CRB-SAHUM, Maracaibo (n=286).

Cadena de la Polimerasa (PCR). La extracción del ADN bacteriano se realizó a partir de un cultivo puro de SAMR, en AS de 18-24 horas de incubación. A este fin, se resuspendieron 4 a 5 colonias del microorganismo en 100 μ L de solución salina fisiológica estéril. Se sometieron a ebullición durante 10 minutos, para posteriormente, centrifugar a 12000 rpm por 2 minutos. Se separó el sobrenadante en un nuevo eppendorf estéril, utilizándose 5 μ l de este sobrenadante como ADN molde para la reacción de PCR.

Para esta, se utilizó una mezcla que contenía además: 200 μ M desoxinucleótidos trifosfato; 10 mM Tris (pH 8.3); 50 mM KCl; 1.5 μ M $MgCl_2$; 50 pmo de primers y 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Promega®). Los primers utilizados correspondieron a una región altamente conservada del gen *mecA* de 310 bp: *mecA*-Plus: 5'TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG 3' (Eurogentec®) y *mecA*-Minus: 5'CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG 3' (Eurogentec®). Se utilizó como control interno de amplificación el gen ribosomal 16S, con los primers: 16S Plus: 5'AGG AGG TGA TCC AAC CGC A 3' (Eurogentec®) y 16S Minus: 5'AAC TGG AAG AAG GTG GGG AT 3' (Eurogentec®). La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research PTC100® de

acuerdo al siguiente protocolo: desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos amplificados por PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio para su posterior visualización con luz UV. Las condiciones de la corrida electroforética fueron 100 V por 30 minutos (21).

Análisis estadístico: Para el registro de los datos de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana se utilizó el programa WHO-NET™ (World Health Organization Net), versión 5.4.

Para comparar los métodos de detección de resistencia a oxacilina, se determinó la sensibilidad (SEN), especificidad (ESP), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y eficiencia (EFC) de cada uno de los métodos utilizados, empleando la presencia del gen *mecA*, como método de referencia.

Los criterios anteriormente mencionados para la evaluación de los distintos métodos fenotípicos de detección de resistencia a OX, se definieron de acuerdo a lo expresado en la Tabla 1.

Tabla 1. Definición de criterios para la evaluación de métodos fenotípicos de detección de resistencia a oxacilina.

Prueba a evaluar*	Método de Referencia**		
	Positivos	Verdaderos positivos (a)	Falsos positivos (b)
	Negativos	Falsos negativos (c)	Verdaderos negativos (d)

* Método del disco, screening test, E-test, detección de PBP 2a * Detección de gen *mecA* (PCR).

$$SEN = (a/a+c) \times 100$$

$$ESP = (d/b+d) \times 100$$

$$VPP = (a/a+b) \times 100$$

$$VPN = (d/c=d) \times 100$$

$$EFC = (a=d/a=b=c=d) \times 100$$

Control de Calidad: para el control de calidad de las pruebas de tipificación molecular y susceptibilidad antimicrobiana, se utilizaron las cepas *S. aureus* ATCC 29213 (susceptible a OX) y *S. aureus* ATCC 43300 (resistente a OX).

Resultados

La prevalencia observada para SAMR fue de 17.48% (50 cepas). Entre los 286 aislamientos de *S. aureus*, 50 fueron SAMR, PBP2a positivos y *mecA* positivos y 236 resultaron SAMS, PBP2a negativos, *mecA* negativos (Figura 3).

La sensibilidad del disco de oxacilina (1 µg) fue de 100.00% con inóculo de 10⁸ UFC/mL incubado a 37°C por 24 horas (Tabla 2). Todos los aislamientos metilino-resistentes mostraron halos de inhibición ≤ 21 mm para FOX; mientras que todas las cepas metilino-sensibles mostraron halos de inhibición con diámetros mayores. Utilizando estos diámetros críticos, las pruebas de difusión del disco empleando FOX fueron 100% sensibles y 100% específicos (Tabla 2).

La sensibilidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y eficiencia de los otros métodos probados (difusión del disco utilizando FOX, E-test®, agar screening test y detección de PBP2a) fue de 100%.

Todos estos métodos, a excepción del método de difusión del disco de OX (1 µg) (99.15% de especificidad), resultaron 100% específicos (Tabla 2).

En casos de resistencia heterogénea a OX por el método de E-test®, la CIM registrada correspondió al límite superior de la inhibición del crecimiento de la población más resistente. Las CIM's encontradas para las cepas SAMR oscilaron entre 8 µg/mL y > 256 µg/mL, con una CIM₅₀ y CIM₉₀ de 256 µg/mL. Todos los métodos probados dieron resultados satisfactorios con las cepas de referencia utilizadas como control.

Discusión

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública a nivel mundial (22), que ha sido considerado como el desafío supremo de la microbiología del siglo XXI (23, 24). La prevalencia de gérmenes Gram positivo resistentes a antimicrobianos de primera línea para su tratamiento ha aumentado desde la pasada década, modificándose las pautas terapéuticas en base a los patrones de susceptibilidad de cada región (25, 26).

El tratamiento de las infecciones producidas por *S. aureus* es cada vez más complicado, ya que a pesar de la existencia de gran variedad de antibióticos “activos” *in vi-*

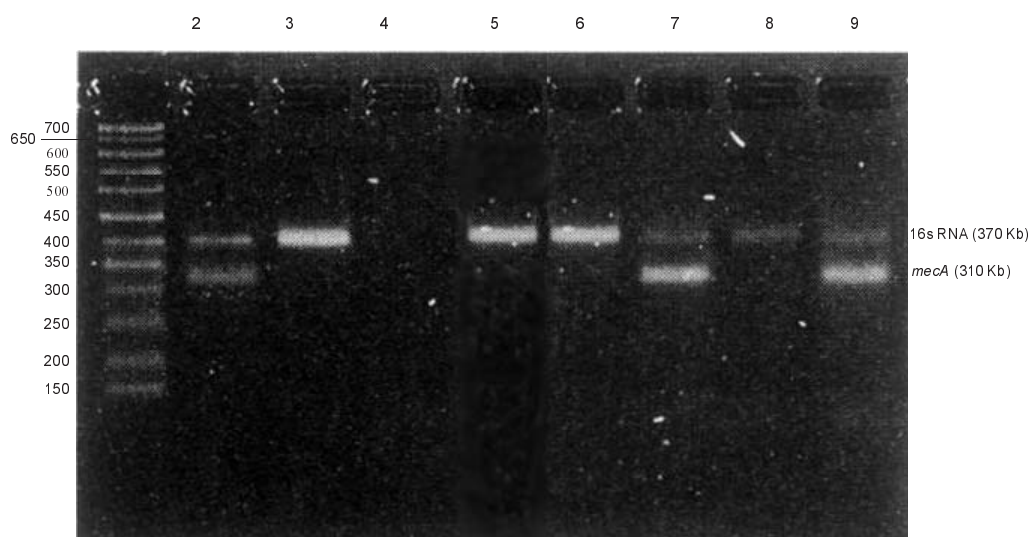


Figura 3. Amplificación del gen *mec A* por PCR. 1: Marcador de Peso Molecular; 2: Control positivo *S. aureus* ATCC 43300; 3: Control negativo *S. aureus* ATCC 29213; 4: Agua destilada; 7 y 9: *S. aureus mec A* (+); 5,6 y 8: *S. aureus mec A*(-).

Tabla 2. Detección fenotípica de resistencia a oxacilina en cepas de *S. aureus*. 2007. CRB-SAHUM, Maracaibo (n=286).

Método	SEN	ESP	VPP	VPN	EFC
Difusión del disco					
OX (1 µg)	100.00	99.15	96.15	100.00	99.00
FOX (30 ug)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Otros métodos ^a	100.00	100.00	100.00		100.00

a: Agar screening test, E-test (CIM), detección de PBP2a (látex).

SEN: Sensibilidad.

ESP: Especificidad.

VPP: Valor Predictivo Positivo.

VPN: Valor Predictivo Negativo.

EFC: Eficiencia.

tro contra este patógeno, su habilidad natural para desarrollar nuevos mecanismos de resistencia, compromete su utilidad terapéutica (24, 26).

Desde su aparición, la prevalencia de cepas SAMR se ha ido incrementando a nivel mundial, correspondiéndole hasta un 35% de los aislamientos clínicos en hospitales americanos y europeos (21, 27).

Dentro de las técnicas fenotípicas para detectar meticilino-resistencia se puede

mencionar el screening en agar MH con 6 µg/mL de OX y 4% de NaCl, el método de difusión del disco en agar, determinación de CIM por dilución, E-test y los métodos automatizados (28).

Varios estudios han demostrado que el 100% de aislamientos SAMR pueden ser detectados por el método de dilución en caldo (29), dilución en agar (30), agar screening test (31), gradiente de difusión (E-test) (32) o el método de difusión del disco en agar (33).

Las metodologías mencionadas anteriormente, por lo general, tienen limitaciones en diferenciar entre resistencia a meticilina heterogénea de grado 1 y la falsa resistencia debida a la hiperproducción de β -lactamasas, alteración de PBP's 1, 2 y 4, o hiperproducción de PBP4 (28, 30, 33). En el caso de falsa resistencia, no hay evidencias clínicas que sugieran su relación con fracasos terapéuticos y de hecho, en diferentes estudios en modelos animales se demostró que el tratamiento con penicilinas resistentes a penicilinasas es efectivo contra estas cepas (34-36).

En esta investigación, se observó una buena sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y eficiencia, en todos los métodos probados. Como ya se ha reportado, la detección de resistencia a OX mediante el empleo de discos de antibióticos (OX, 1 μ g) es el método menos confiable para la detección de resistencia a OX en *S. aureus*; ya que presentó menor especificidad (99.15%), valor predictivo positivo (96.15%) y eficiencia (99.30%), además de requerir 24 horas de incubación previo a su lectura e interpretación (36). No obstante, es bueno señalar que estos valores corresponden a la comparación con el *gold standard*, el que si bien detecta el tipo de resistencia a meticilina, más frecuente entre las cepas de *S. aureus*, no incluye todos los mecanismos de resistencia que pueden encontrarse en estos microorganismos (28).

Se ha determinado la existencia de cepas SAMR que no poseen el gen *mecA* y que deben su resistencia a la modificación de genes que codifican las PBP's normales, a la sobre-expresión de PBP's normales o a la hiper-producción de β -lactamasa estafilocócica (10, 12). Estas cepas presentan un nivel de resistencia "boderline" a OX (4 a 8 μ g/mL) y no producen PBP2a (2). Además, generalmente, no se observa asociación con resistencia a

otros antimicrobianos, a diferencia de lo que ocurre con las cepas *mecA* positivas (10, 17).

En este trabajo, se detectaron 2 cepas de este grupo, las cuales resultaron resistentes a OX por el método del disco (1 μ g); pero PBP2a negativas (*mecA* negativas). La inclusión del disco de amoxicilina/ácido clavulánico en el antibiograma reveló un fenotipo correspondiente a la hiperproducción de β -lactamasas.

El método de difusión del disco empleando FOX se presentó con una sensibilidad y especificidad del 100% para todos los aislamientos SAMR. Esto demuestra que este método es una alternativa confiable, al método del disco de OX (1 μ g), usado rutinariamente en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (17, 37).

La fuerte correlación entre los diámetros de los halos de FOX y la resistencia a OX obedece a mecanismos todavía no demostrados; al parecer, puede deberse a la interacción entre la PBP2a y varias PBP's, por mecanismos todavía desconocidos (37). Comparadas con las cefalosporinas, las cefamicinas (FOX y MOX) tienen mayor afinidad por la PBP4 de *S. aureus*, una proteína involucrada en el entrecruzamiento del peptidoglucano de la pared celular (38-40). *In vitro*, la sobre-expresión de la PBP4 en una cepa SAMS la convierte en resistente a meticilina (SAMR) (40); a nivel local, debido a la poca disponibilidad de discos de MOX, el empleo de FOX, es una opción válida para la detección de resistencia en *S. aureus*, e incluso puede usarse, conjuntamente con el disco de OX (1 μ g) para verificar los resultados obtenidos.

Existe un gran consenso en la literatura, en relación a que el agar screening test es el método fenotípico más confiable para la detección de resistencia a OX en estafilococos (14,31-34). Soportando tales afirmaciones, los resultados obtenidos muestran que este

es un método sensible y específico para detectar resistencia a meticilina en cepas de *S. aureus* (9).

En el presente estudio, las CIM's a OX fueron determinadas por E-test®, el cual ha sido referido como una excelente opción a los métodos convencionales de dilución en caldo o agar (30). Los resultados muestran que es un método con excelente "performance", con una eficacia diagnóstica similar a la del método de referencia, permitiendo detectar la totalidad de cepas SAMR; sin embargo, su empleo es limitado a trabajos de investigación, pues su elevado costo, lo hace inalcanzable para laboratorios de rutina; a pesar de su facilidad de empleo y reproducibilidad de resultados.

A pesar de que la determinación del gen *mecA* es considerada el *gold standard* en la detección de resistencia a OX en *S. aureus*, la realización cotidiana en laboratorios clínicos es poco práctica y de alto costo (21, 28, 41). Desde el año 2002, el NCCLS actualmente CLSI, ha aceptado que la detección de PBP2a es un método alternativo para la evaluación de resistencia a meticilina en estafilococos, el cual correlaciona de forma excelente, con la presencia del gen *mecA* (14, 21, 41).

La aglutinación presenta una ventaja adicional en lo que respecta al tiempo de detección, ya que se pueden obtener resultados en sólo 15–20 minutos, después de aislada la cepa bacteriana. Por otra parte, es fácil de realizar e interpretar, y podría representar, en los casos que se justifique, una alternativa para laboratorios clínicos que no disponen de métodos moleculares de diagnóstico y donde la comunicación eficiente de estos resultados rápidos, al cuerpo médico, podría contribuir al uso racional y acotado de los glicopéptidos y los nuevos agentes antiestafilocócicos (12, 21, 29).

Referencias Bibliográficas

- (1) Archer G, Niemeyer D. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in *Staphylococci*. *Trend Microbiol.* 1994;2:343-347.
- (2) Mendoza C, Velazquez R, Mercado L, Ballon J, Maguiña C. Susceptibilidad antimicrobiana de *S. aureus* sensible, con sensibilidad "BORDERLINE" y resistentes a meticilina. *Rev.Med.Hered.* 2003;14:181-185.
- (3) Hanssen A, Kjeldsen G, Ericsson J. Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococci*: evidence of horizontal transfer? *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:285-296.
- (4) Wisplinghoff H, Ewertz B, Wisplinghoff S, Stefanik D, Plum G, Pedreau-Remington F, et al. Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the metropolitan area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:5445-5451.
- (5) Ito T, katayama Y, Asda K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents.Chemother.* 2001;45:1328-1336.
- (6) Archer G, Pennell E. Detection of methicillin-resistance in *staphylococci* by using a DNA probe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990;34:1720-1724.
- (7) O'Brien F, Lim T, Chong F, Coombs G, Enright M, Robinson D, et al. Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:3185-3190.
- (8) Quintiliani R, Sahm D, Courvalin P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. *Manual of Clinical Microbiology.* 7th Edition. Washington DC. ASM Press. 1999;pp:1505-1525.

- (9) Cavassini M, Wenger A, Jaton K, Blanc D, Bille J. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP2a slide test agglutination kit, for rapid detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:1591-1594.
- (10) Ulloa M, Porte L, Carmi A, Varela C, Fica A. Comparación de reacción de polimerasa en cadena, látex y antibiograma para detección de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente. *Rev. Chil. Infec.* 2001;18: 255-260.
- (11) Wren M, Carder C, Coen P, Gant V, Wilson A. Rapid molecular detection of methicillin-resistant *S. aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:1604-1605.
- (12) CLSI (Clinical Laboratory Standardization Institute). Antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement. Document M100/S16 Vol:27 N° 1. 2007; pp:46-49; 110-115.
- (13) Sopena N, Sabriá M. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Med. Clin.* 2002;118:671-676.
- (14) Sakoulas G, Gold L, Venkataraman L, Degirolami P, Eliopoulos G, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:3946-3951.
- (15) Felten A; Grande 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 MRSA-screen latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:2766-2771.
- (16) Okonogi K, Nogi Y, Kondo M, Imada A, Yokota T. Emergence of methicillin-resistant clones from cephamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1989;24:637-645.
- (17) Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966;45:439-496.
- (18) Hussain Z, Stoakes L, Garrow S. Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative coagulase-negative *Staphylococci* by an anti-penicillin-binding protein 2a slide latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:2051-2054.
- (19) Yamazumi T, Marshall S, Wilke W, Diekema D, Pfaller M, Jones R. Comparison of the Vitek Gram-Positive 120 card and the MRSA-Screen latex test for determining oxacillin-resistance in clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:53-56.
- (20) York M, Gibbs L, Chehab F, Brooks G. Comparison of PCR-*mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin-resistance in coagulase-negative *Staphylococci*. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34:249-253.
- (21) Soloaga R, Corso A, Galletti P, Faccione D, Galas M, Grupo colaborador MRSA. Methicillin resistance detection in *Staphylococcus aureus*: Comparison between conventional methods and MRSA-Screen latex agglutination technique. *Rev. Argent. Microbiol.* 2004;36:36-40.
- (22) Shittu A, Lin J. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal Province, South Africa. *BMC. Infectious Diseases.* 2006;125-168.
- (23) Smolinski M, Hamburg M, Lederberg J. Editors. Microbial threats to health: emergence, detection and response. Washington. Institute of Medicine. 2003. pp:32-33.
- (24) Camacarena J, Sánchez R. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Control Calidad SEIMC. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/sarm.htm. Acceso: 26/06/2007.
- (25) García-Mayorgas A, Causse M, Rodriguez F, Ibarra A, Solis F, Casal M. Evolución de la resistencia a la meticilina de *Staphylococcus aureus* en la Provincia de Córdoba (España) en los años 2002-2005. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2005;18:328-330.
- (26) Haddadin A, Fapianno S, Lipsett P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgraduate Medical Journal* 2002;78:385-392.

- (27) Kohner P, Kolbert U, Persing D, Cockerill F. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus spp.* J. Clin. Microbiol. 1999;37:2952-2961.
- (28) Thornsberry C, McDowgal I. Use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) *Staphylococci*. J. Clin. Microbiol. 1983;18:1084-1091.
- (29) Wallet F, Roussel-Delvallez M, Courcol R. Choice of routine method for detecting methicillin-resistance in *Staphylococci*. J. Antimicrob. Chemother. 1996;37:901-909.
- (30) Weller T, Cook D, Crow M, Ibrahim W, Pennington T, Selkom J. Methicillin-susceptibility testing of *Staphylococci* by E-test and comparison with agar dilution and *mecA* detection. J. Antimicrob. Chemother. 1997;39:251-253.
- (31) Coudron P, Jones D, Dalton H, Archer G. Evaluation of laboratory tests for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. J. Clin. Microbiol. 1986; 24:764-769.
- (32) Chambers H. *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. Mecanismos de resistencia e implicaciones para el tratamiento. Hospital Practice. 2001;1:5-12.
- (33) Chambers H. Methicillin-resistant in *Staphylococci*: Molecular and Biochemical basis and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. 1997;10:781-791.
- (34) Unal S, Werner K, De Girolami P, Barsanti F, Eliopoulus G. Comparison of tests for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a clinical microbiology laboratory. Antimicrob. Agents Chemother. 1994;38:345-347.
- (35) Van Griethuysen A, Pouw M, Van Leeuwen N, Heck M, Willense P, Buiting A, et al. Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 1999;37:2789-2792.
- (36) Higashi Y, Wakahayashi A, Matsumoto Y, Watanabe Y, Ohno A. Role of inhibition of penicillin-binding proteins and cell wall cross-linking by beta-lactam antibiotics in low-and high-level methicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. Chemotherapy. 1999;45:37-47.
- (37) Murakami K, Nomura K, Doi M, Yoshida T. Increased susceptibility to cephamycin-type antibiotics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* defective in penicillin-binding protein 2. Antimicrob. Agents Chemother. 1987;31:1423-1425.
- (38) Hemze U, Berger-Bachi B. Penicillin-binding protein 4 overproduction increases β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. 1996;40:2121-2125.
- (39) Barbier N, Nouet D, Lemée L, Martín E, Lemeland J. Comparison of ATB Staph, Rapid Staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin hetero-resistance in *Staphylococci* possessing *mecA*. J. Clin. Microbiol. 1998;36:52-57.
- (40) Chapin K, Musgnug M. Evaluation of penicillin-binding protein 2a latex agglutination assay for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures. J. Clin. Microbiol. 2004;42:1283-1284.
- (41) Ercis S, Sancak B, Hascelik G. A comparison of PCR detection of *mecA* with oxacillin disk susceptibility testing in different media and seceptor automated system for both *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolates. Indian J Medical Microbiology 2008;26:21-24.