

Staphylococcus aureus portador del gen *mecA* sensible a oxacilina (OS-MRSA): otro desafío para los laboratorios de microbiología

María Guillermina Giudice Barbagelata*, Lorena Pardo Casaretto†, María Inés Mota Ciganda‡, Claudia Gutiérrez Correa§, Gabriela Algorta Rusiñol¶, Gustavo Varela Pensado**

Resumen

Staphylococcus aureus es un patógeno humano reconocido capaz de adquirir mecanismos de resistencia para distintos antibióticos. La resistencia a oxacilina se debe principalmente al producto de los genes *mecA* o *mecC* que determinan una concentración inhibitoria mínima (CIM) de oxacilina ≥ 4 mg/L. La expresión de estos genes es variable y se han descrito aislamientos portadores del gen *mecA* con CIM de oxacilina ≤ 2 mg/L (fenotípicamente susceptibles) denominadas OS-MRSA. A partir de una niña cursando una infección articular se obtuvieron aislamientos bacterianos de *S. aureus* del líquido articular y de hemocultivo. El aislamiento de hemocultivo fue clasificado como resistente a meticilina (MRSA), mientras que el de líquido articular fue sensible a meticilina (MSSA) utilizando el sistema automatizado Vitek 2. Ambos mostraron halos de inhibición para oxacilina >15 mm y para cefoxitina de 19 y 17 mm, respectivamente. En los dos aislamientos se demostró la presencia de los genes *mecA*, *sea*, *seb* y el SCC*mec* tipo V. La comparación genética por *Sma*I-PFGE mostró perfiles idénticos para ambos cultivos, sugiriendo que se trataba de la misma cepa. Este reporte informa la detección de un aislamiento de OS-MRSA en Uruguay y destaca las limitaciones de algunos procedimientos de laboratorio para identificar correctamente fenotipos de resistencia asociados al gen *mecA* en aislamientos clínicos de *S. aureus*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*
Resistencia a meticilina

Key words: *Staphylococcus aureus*
Methicillin resistance

* Ayudante de clase del Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

† Profesora Adjunta del Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay. Profesor Adjunto de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

‡ Profesora Adjunta del Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay. Médico Microbiólogo del Laboratorio de Microbiología del Centro Hospitalario Pereira Rossell (ASSE).

§ Asistente de Departamento del Laboratorio de Patología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

¶ Ex Profesora del Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay. Médico Microbiólogo del Laboratorio de Microbiología, Centro Hospitalario Pereira Rossell (ASSE).

** Profesor del Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

Laboratorio de Microbiología, Centro Hospitalario Pereira Rossell (ASSE).

Correspondencia: Dra. Lorena Pardo, Joaquín de Salterain 1235. Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: lpardo@higiene.edu.uy

Los autores del presente manuscrito declaramos no poseer conflicto de intereses.

Recibido: 25/4/18

Aceptado: 7/7/18

Caso clínico

Paciente de 7 años que consultó por dolor en rodilla derecha y fiebre de 48 horas de evolución. Con diagnóstico clínico de artritis infecciosa, ingresó a sala de cuidados moderados. Se tomaron muestras para hemocultivo y estudio bacteriológico de líquido articular iniciando luego tratamiento con cefuroxime y clindamicina por vía endovenosa.

En ambas muestras se obtuvo desarrollo de *Staphylococcus aureus* identificado mediante sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux). El estudio de la susceptibilidad antibiótica usando el mismo sistema mostró que el aislamiento del líquido articular (A) fue sensible a meticilina (MSSA) con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de oxacilina de 2 mg/L y *screening* de cefoxitina negativo (6 mg/L), mientras que el aislamiento del hemocultivo (S) fue resistente a meticilina (MRSA) con CIM de oxacilina ≥ 4 mg/L y *screening* de cefoxitina positivo. Ante los resultados discordantes de ambas muestras se realizó prueba de disco difusión para cefoxitina (30 μ g), oxacilina (1 μ g) y prueba de látex para PBP2a (Oxoid). Los halos de inhibición de cefoxitina fueron de 19 y 18 mm y los de oxacilina de 17 y 15 mm para los aislamientos A y S respectivamente; el aislamiento A mostró doble halo de inhibición a oxacilina. La detección de PBP2a positiva en ambos casos. Los aislamientos se interpretaron como resistentes según normas CLSI⁽¹⁾.

La paciente completó siete días de tratamiento con clindamicina endovenosa y luego continuó el mismo con trimetoprim-sulfametoxazol por vía oral con buena evolución clínica.

Se estudió la presencia de los genes *mecA*, *pvl* (leucocidina de Pantón-Valentine), *sea-see* (enterotoxinas estafilocócicas A-E) y *tst* (toxina de síndrome de shock-tóxico 1) mediante técnica de PCR. El tipo de elemento *SCCmec* se estableció usando el protocolo de PCR múltiple descrito por Oliveira y Kondo. La comparación genética se realizó por macrorrestricción del ácido desoxirribonucleico ADN bacteriano con la enzima *SmaI* y separación posterior de los fragmentos obtenidos por electroforesis en campos pulsantes (*SmaI*-PFGE)⁽²⁻⁴⁾.

Los dos aislamientos resultaron positivos para los genes *mecA*, *sea*, *seb*, el elemento *SCCmec* del tipo V y mostraron patrones de PFGE idénticos (tabla 1 y figura 1). Además, ambos cultivos resultaron negativos para los genes *tst* y *pvl*.

Discusión

La resistencia a meticilina en *S. aureus* está dada fundamentalmente por la síntesis de una proteína de unión a penicilina –PBP– supernumeraria, llamada PBP2a, co-

Tabla 1. Resumen de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* aisladas de líquido articular (A) y hemocultivo (S).

	Aislamiento A	Aislamiento S
DD oxacilina (1 μ g)	S (17 mm)	S (15 mm)
DD cefoxitina (30 μ g)	R (19 mm)	R (18 mm)
Vitek 2	S (OXA 2 mg/L; FOX -)	R (OXA ≥ 4 mg/L; FOX +)
PBP2a	+	+
<i>mecA</i>	+	+
Tipo <i>SCCmec</i>	V	V
<i>pvl</i>	-	-
<i>sea</i>	+	+
<i>seb</i>	+	+
<i>sec</i>	-	-
<i>sed</i>	-	-
<i>see</i>	-	-
<i>tst</i>	-	-

DD: disco difusión; S: sensible; R: resistente; OXA: oxacilina; FOX: cefoxitina.

dificada por el gen *mecA*. Este gen se encuentra inserto en un elemento genético móvil, llamado casete cromosómico estafilocócico (*SCCmec*). Hay descritas 11 variantes de *SCCmec* (I-XI) reconocidas por el *IWG-SCC*; los aislamientos hospitalarios poseen generalmente los tipos I, II y III, mientras que los provenientes de la comunidad portan los tipos IV, V y VII⁽⁵⁾.

En general, la resistencia mediada por *mecA* determina CIM de oxacilina ≥ 4 mg/L. Sin embargo, en los últimos años y en distintos países se ha descrito la circulación de cepas de *S. aureus* portadoras del gen *mecA* con CIM de oxacilina ≤ 2 mg/L, denominadas OS-MRSA⁽⁶⁻¹⁰⁾. Estos aislamientos se pueden categorizar erróneamente como susceptibles a meticilina por métodos microbiológicos convencionales. Como ocurrió en este caso, uno de los aislamientos estudiado (A) fue definido como sensible a meticilina por el sistema automatizado utilizado. Sin embargo, en la prueba de disco difusión fue resistente a cefoxitina, PBP2a positivo y portador del gen *mecA*. Por lo tanto, se trata del primer aislamiento de OS-MRSA reportado en Uruguay.

Ambos aislamientos (A y S) mostraron un patrón de *SmaI*-PFGE idéntico, el elemento *SCCmec* tipo V y los ge-

nes codificantes para las enterotoxinas A y B, sugiriendo que se trataría de la misma cepa con expresión diferente del gen *mecA*. En África, Chung y colaboradores recuperaron aislamientos de OS-MRSA portadores del SSC*mec* V con fenotipos de heteroresistencia a oxacilina en los cuales la mayoría de las bacterias resultaron sensibles y una pequeña parte de la población (1 cada 10^4 - 10^6 bacterias) mostró fenotipo resistente. La inducción con mupirocina permitió que estos cultivos heteroresistentes se transformaran en cultivos homoresistentes para oxacilina con CIM ≥ 4 mg/L. Por otra parte, la inducción con oxacilina fue menor en aquellos aislamientos que no producían β -lactamasa, portadores del SCC*mec* tipo V y pertenecientes al secuencia-tipo 8 (ST8)⁽¹¹⁾.

Si bien la población mayoritaria de los aislamientos OS-MRSA es susceptible a oxacilina, existe la chance que durante el tratamiento de estas infecciones con beta-lactámicos se seleccionen bacterias resistentes que determinen fallas terapéuticas⁽¹¹⁻¹³⁾.

Las bases genéticas del fenotipo heteroresistente en los aislamientos OS-MRSA no se conocen en detalle. Sin embargo, se han mencionado factores cromosómicos relacionados al promotor del gen *mecA*, expresión diferencial de genes vinculados con la síntesis de la pared bacteriana y también la participación de factores ambientales que podrían afectar la expresión de dicho gen⁽¹⁴⁾.

Habiendo detectado la circulación de estas cepas en nuestro medio, es importante que los laboratorios de microbiología desarrollen estrategias para la detección de OS-MRSA, fundamentalmente frente a aislamientos de *S. aureus* de infecciones sistémicas, graves, aquellas que ocurren en pacientes inmunocomprometidos y en casos de falla terapéutica. Los métodos disponibles incluyen las pruebas de susceptibilidad a cefoxitina por disco difusión o determinación de la CIM, detección de la proteína PBP2a o del gen *mecA*. En nuestro país se encuentran disponibles para la detección de PBP2a pruebas de aglutinación de látex, pruebas inmunocromatográficas y más recientemente la espectrometría de masas (MALDI-TOF). La detección del gen *mecA* puede realizarse por PCR convencional o en plataformas cerradas de RT-PCR. Las pruebas de susceptibilidad a cefoxitina tienen la desventaja de que los halos de inhibición se encuentran cercanos al punto de corte, con lo cual algunas cepas podrían incluso ser categorizadas como susceptibles, como ha sido reportado⁽¹⁰⁾.

Por otro lado, la detección aislada de PBP2a o del gen *mecA* no identifica las cepas resistentes a meticilina portadoras del gen *mecC*⁽¹⁵⁾.

Por lo tanto, la utilización de una combinación de técnicas teniendo en cuenta su disponibilidad y sus limitaciones sería adecuada para identificar correctamente

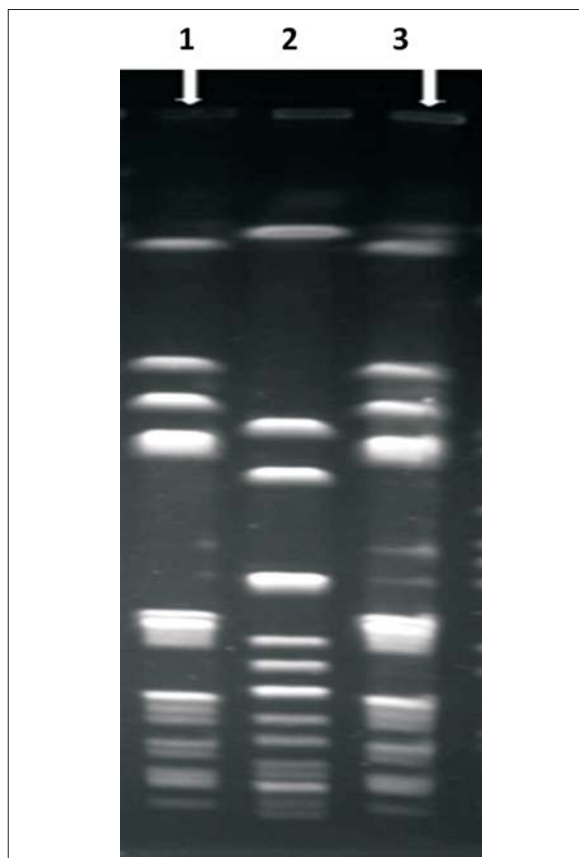


Figura 1. Patrones de electroforesis en campos pulsantes de las cepas analizadas. Flecha 1: cepa S. Flecha 2: cepa de *S. aureus* de colección. Flecha 3: aislamiento A.

los aislamientos MSSA, OS-MRSA o MRSA y así realizar el tratamiento antimicrobiano adecuado.

Conclusión

Este es el primer reporte en Uruguay a propósito de un aislamiento clínico definido como OS-MRSA.

Se precisan más estudios para establecer la prevalencia local de estas cepas (OS-MRSA y MRSA por *mecC*) y para conocer sus características microbiológicas.

Abstract

Staphylococcus aureus is a common human pathogen that is able to acquire resistance mechanisms for different antibiotics. Oxacillin resistance mainly results from *mecA* or *mecC* genes which determine an oxacillin minimum inhibitory concentration (MIC) ≥ 4 mg/L. Expression of these genes is variable and the isolation of *mecA* gen with oxacillin MIC ≤ 2 mg/L (phenotypically susceptible) have been described carriers has been described, having been named OS-MRSA. *S. aureus* bacteria was isolated from

the synovial fluid and blood culture in a girl with a joint infection. Isolation of the blood culture was classified as methicillin resistant (MRSA) while that of the synovial fluid was methicillin sensitive (MSSA), by using the automated Vitek 2 system. Both of them present oxacillin inhibition halos > 15 mm, and inhibition halos of 19 and 17 mm for cefoxitin, respectively. Both isolations proved *mecA*, *sea*, *seb* and type V *SCCmec* genes were present. Genetic comparison by *Sma*I-PFGE showed identical profiles for both cultures, suggesting it was the same strain. These report informs the identification of an OS-MRSA isolation in Uruguay and points out the limitation of a few laboratory procedures to correctly identify resistant phenotypes associated to *mecA* gene in clinical isolations of *S. aureus*.

Resumo

Staphylococcus aureus é um agente patogênico humano conhecido capaz de adquirir mecanismos de resistência para distintos antibióticos. A resistência a oxacilina é devida principalmente ao produto dos genes *mecA* ou *mecC* que determinam uma concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina ≥ 4 mg/L. A expressão destes genes é variável e isolamentos portadores del gen *mecA* com CIM de oxacilina ≤ 2 mg/L (fenotipicamente susceptíveis) denominadas OS-MRSA foram descritos. Com material extraído de um menina com infecção articular foram obtidos isolamentos bacterianos de *S. aureus* do líquido articular e de hemocultura. O isolamento da hemocultura foi classificado como resistente a meticilina [MRSA] e o do líquido articular foi sensível a meticilina [MSSA] utilizando o sistema automatizado Vitek 2. Ambos mostraram halos de inibição para oxacilina >15 mm e para cefoxitina de 19 e 17 mm, respectivamente. Nos 2 isolamentos a presença dos genes *mecA*, *sea*, *seb* e o *SCCmec* tipo V foi demonstrada. A comparação genética por *Sma*I-PFGE mostrou perfis idênticos para ambos cultivos, sugerindo que se tratava da mesma cepa. Este artigo descreve a detecção de um isolamento de OS-MRSA no Uruguai e destaca as limitações de alguns procedimentos de laboratório para identificar corretamente fenótipos de resistência associados ao gen *mecA* em isolamentos clínicos de *S. aureus*.

Bibliografía

1. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28 ed. Wayne, PA: CLSI, 2018.
2. **Pardo L, Vola M, Macedo-Viñas M, Machado V, Cuello D, Mollerach M, et al.** Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children treated in Uruguay. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(1):10-6.
3. **Kondo Y, Ito T, Ma X, Watanabe S, Kreiswirth B, Etienne J, et al.** Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(1):264-74.
4. **Mehrotra M, Wang G, Johnson W.** Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3):1032-5.
5. **International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome Elements.** IWG-SCC Home. Disponible en: http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html. [Consulta: 4 abril 2018].
6. **Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, Suzuki Y, Nagasawa Z, Otsuka Y, et al.** Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother* 2007; 13(2):79-86.
7. **Saeed K, Ahmad N, Dryden M, Cortes N, Marsh P, Sitjar A, et al.** Oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA), a hidden resistant mechanism among clinically significant isolates in the Wessex region/UK. *Infection* 2014; 42(5):843-7.
8. **He W, Chen H, Zhao C, Zhang F, Wang H.** Prevalence and molecular typing of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* from multiple hospitals in China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77(3):267-9.
9. **Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino T.** Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol* 2016; 16(1):115.
10. **Sharff K, Monecke S, Slaughter S, Forrest G, Pfeiffer C, Ehrlich R, et al.** Genotypic resistance testing creates new treatment challenges: two cases of oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2012; 50(12):4151-3.
11. **Chung M, Kim CK, Conceição T, Aires-De-Sousa M, De Lencastre H, Tomasz A.** Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2A by oxacillin-susceptible/*mecA*-positive MRSA strains from Africa. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71(10):2804-9.
12. **Proulx M, Palace S, Gandra S, Torres B, Weir S, Stiles T, et al.** Reversion from methicillin susceptibility to methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* during treatment of bacteremia. *J Infect Dis* 2016; 213(6):1041-8.
13. **Ikonomidis A, Michail G, Vasdeki A, Labrou M, Karavasilis V, Stathopoulos C, et al.** In vitro and in vivo evaluations of oxacillin efficiency against *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(11):3905-8.
14. **Saeed K, Marsh P, Ahmad N.** Cryptic resistance in *Staphylococcus aureus*: a risk for the treatment of skin infection? *Curr Opin Infect Dis* 2014; 27(2):130-6.
15. **Paterson G, Harrison E, Holmes M.** The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2014; 22(1):42-7.