Genotipos de *Staphylococcus aureus* con fenotipo meticilino resistente, aislados de pacientes del Hospital Base de Valdivia

Myra Wilson S^{1a}, Carola Otth L^{1b}, Gustavo Medina S^{1c}, Laura Otth R^{1a}, Heriberto Fernández J^{1a}, María Arce^{2a}, Angela Zaror C^{2a}, Víctor Lizama^{2a}, Mónica Gil D⁴, Ana María von Chrismar^{3b}.

Genotypes of Staphylococcus aureus strain with methicillin resistant phenotype

Background: Methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA) are an important cause of nosocomial infections. **Aim:** To determine the genotypes of MRSA strains. **Material and methods:** Fifty five strains of MRSA, isolated from patients hospitalized in Hospital Base Valdivia, were studied. The phenotype was determined through MicroScan[®] in all strains and by minimum inhibitory concentration (MIC) in 41. The genotype of the strains was analyzed by a duplex polymerase chain reaction (PCR) of the *mecA* gene, amplifying eight hypervariable AND regions associated to such gene. **Results:** According to MIC, 88% of strains had a pattern of resistance against multiple antimicrobial (penicillin, ampicillin, cephradine, gentamycin, ciprofloxacin, lincomycin and erythromycin). Vancomycin resistant strains were not detected. Only 53 strains (96%) had at least one of the eight hypervariable regions and were classified as MRSA. Genotypic patterns types 15 were the most commonly detected in 38% and 34% of strains, respectively. MicroScan[®] erroneously classified five strains in an incorrect phenotype, according to results obtained with duplex PCR. MIC results did not differ from those of duplex PCR. **Conclusions:** Duplex-PCR is a useful tool to detect hyper variable regions associated to *mecA* gene (Rev Méd Chile 2007; 135: 596-601). **(Key words:** Drug resistance, bacterial; Methicillin; *Staphylococcus aureus*)

Recibido el 27 de junio, 2006. Aceptado el 25 de octubre, 2006.

Financiamiento: Proyecto DID 2004-64 UACH.

¹Instituto de Microbiología Clínica, Universidad Austral de Chile. ²Laboratorio de Hospital Base de Valdivia- Unidad de Microbiología. ³Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. ⁴Servicio de Salud de Valdivia.

^aTecnólogo Médico

^bBioquímico

^cAlumno Escuela de Tecnología Médica, UACH

Correspondencia a: Myra Wilson S. Instituto de Microbiología Clínica, Edificio Ciencias Biomédicas, Campus Isla Teja, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. Fono: 63 221921. Fax: 63 293300. E mail: myrawilson@uach.cl

Staphylococcus aureus constituye un importante agente etiológico de diversas patologías infecciosas, entre las que destacan infecciones de piel y tejidos blandos, abscesos y septicemia¹.

En 1961, Jevons² describió por primera vez, en Londres, la aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SAMR), las que se han constituido en uno de los principales agentes de infección nosocomial a nivel mundial³.

En Chile, Lederman et al⁴ informaron por primera vez estas cepas en 1967. Desde entonces diversos autores han determinado una alta incidencia de infecciones por SAMR, especialmente nosocomiales, lo que implica un aumento en la morbilidad y mortalidad a nivel hospitalario^{5,6}.

El mecanismo de resistencia a meticilina más importante lo constituye la síntesis de una nueva proteína fijadora de penicilina o *penicillin binding protein* (PBP), denominada PBP2a, la cual es capaz de mantener la integridad de la pared celular durante el crecimiento y la división celular cuando las PBPs habituales son inhibidas por los antibióticos β -lactámicos⁶. Esta resistencia se debe a la incorporación en el ADN bacteriano de un elemento extracromosomal que contiene el gen *mecA*, encargado de codificar dichas proteínas. La expresión fenotípica de esta resistencia suele ser heterogénea, lo que significa que, a pesar que todas las células de una población poseen el gen, sólo algunas lo manifiestan, haciendo difícil su detección en el laboratorio por los métodos habituales⁵.

Se han detectado regiones «hipervariables» asociadas al gen *mecA*. Esta variabilidad ha sido utilizada con la finalidad de llevar a cabo estudios de epidemiología molecular de SAMR⁷.

Nuestro objetivo es determinar el genotipo de cepas de SAMR aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Base de Valdivia, con el fin de conocer los genotipos presentes en nuestro hospital y relacionarlos con sus patrones de resistencia antimicrobiana y los servicios de hospitalización desde donde fueron aisladas.

MATERIAL Y MÉTODO

Fueron estudiadas 55 cepas de *Staphylococcus aureus* que presentaban fenotipo de resistencia a meticilina, aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Base de Valdivia entre marzo de 2004 y diciembre de 2005.

El fenotipo de resistencia a meticilina se determinó mediante MicroScan® en la totalidad de las cepas, siguiendo las indicaciones del fabricante. Sólo 41 cepas fueron analizadas mediante la determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a oxacilina, según normas del NCCLS⁸. Además, se estudió la CIM frente a penicilina, ampicilina, vancomicina, cefradina, gentamicina, ciprofloxacino, lincomicina y eritromicina.

Para la genotipificación se siguió el protocolo descrito por Huygens et al⁷. Con este fin, se implementó un multiplex PCR con 8 set de partidores destinados a amplificar regiones hipervariables asociadas al gen *mecA*. Estas regiones corresponden a HVR, pUB110, Ins117, pT181, p1258 (I), p1258 (II), mecR1, IS256. El producto de amplificación de estas regiones corresponde a 300pb, 331pb, 215pb, 255pb, 295pb, 270pb, 406pb y 371pb, respectivamente.

Las cepas estudiadas fueron sembradas en agar tripticasa de soya por 24 h a 34°C, con el fin de pesquisar las cepas heterogéneas. La extracción de ADN se llevó a cabo resuspendiendo una colonia en 100 μ l de agua estéril y calentando a ebullición durante 10 min.

La mezcla de PCR se preparó con 5 μ l de la célula lisada, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,5 μ M de cada partidor, 1 U de Taq polimerasa, 10 x PCR *buffer* y 1,5 mM de cloruro de magnesio; volumen final 50 μ l. La amplificación consistió en un ciclo inicial de 95°C por 5 min; 30 ciclos de 95°C por 30 s, 50°C por 30 s, 72°C por 30 s; extensión final de 72°C por 10 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio.

Todos los ensayos se hicieron en triplicado, obteniéndose los mismos resultados.

Se utilizó como control negativo, la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y como control positivo para las regiones hipervariables asociadas al gen *mecA*, una cepa analizada por otra institución (gentileza de María Teresa Ulloa, Universidad de Chile).

RESULTADOS

Al implementar la técnica descrita por Huygens⁷, no se obtuvo una buena amplificación y resolución de los productos de amplificación esperados.

Por esta razón, se optó modificarla a las condiciones de nuestro laboratorio, reemplazando el multiplex PCR por un ensayo de duplex PCR. Así, la amplificación se llevó a cabo incluyendo dos sets de partidores por reacción, por lo que el análisis de una cepa se realizó en cuatro reacciones individuales. Con esto se obtuvo una mejor amplificación de los productos esperados y, por ende, resultados confiables (Figura 1).

Se analizó un total de 55 cepas con fenotipo meticilino resistente. De ellas, 53 (96,3%) presentaron al menos una de las ocho regiones hipervariables asociadas al gen *mecA* posibles de amplificar mediante la aplicación del ensayo duplex-PCR. Una de las cepas negativas para este ensayo fue clasificada erróneamente en un fenotipo de resistencia mediante MicroScan®. La otra cepa negativa, presentó una resistencia mediada por hiperproducción de β -lactamasa (datos no mostrados).

En las 41 cepas analizadas mediante CIM frente a oxacilina, se obtuvo 100% de concordancia con el duplex PCR. A su vez, MicroScan® clasificó tres (5,4%) de 55 cepas, con un fenotipo diferente de acuerdo a los resultados obtenidos mediante el PCR (datos no mostrados).

Las 53 cepas que presentaron regiones hipervariables asociadas al gen *mecA*, se agruparon en 5 genotipos según las regiones amplificadas (Tabla 1). El genotipo más frecuentemente encontrado correspondió al genotipo 15 (37,7%), seguido del genotipo 14 (34,0%).

La distribución de los diferentes genotipos según servicio de aislamiento de la cepa, se detalla en la Tabla 2. Los servicios en que se encontró la mayor cantidad de cepas de SAMR correspondieron a Cirugía, Medicina y UCI con 26,4%, 22,6% y 20,7%, respectivamente. Cabe destacar que en estos servicios predominan los genotipos 14 y 15, los cuales presentaron tres patrones de resistencia diferentes (Tabla 3).

De las 41 cepas analizadas mediante CIM, 87,8% presentó resistencia simultánea a los 7 antimicrobianos estudiados (Figura 2). No se detectó cepas resistentes a vancomicina.

DISCUSIÓN

Un problema importante en clínica es dilucidar si la cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de un

Figura 1. Modificación realizada a la técnica multiplex PCR de elementos variables asociados al *mecA*. El multiplex PCR descrito por Huygens⁷ (carril 5) fue dividido en cuatro duplex-PCR (carriles 1-4) para facilitar la interpretación de los resultados.

Tabla 1. Genotipos identificados en 53 cepas de SAMR según región hipervariable amplificada

Genotipo	HVR	pUB110	Amplicones					Nº cepas (%)
			Ins117	pT181	pI258	mecR1	IS256	
6*	+	-	-	-	-	-	-	6 (11,3)
14**	+	-	-	+	+	-	-	18 (34,0)
15**	+	-	-	-	+	-	-	20 (37,7)
16**	+	-	-	-	+	-	+	5 (9,4)
17**	+	-	-	+	-	-	-	4 (7,5)

*Único genotipo idéntico a Huygens⁷. **Genotipos nuevos, siguiendo la clasificación de Huygens⁷.

Tabla 2. Número de cepas por genotipo según servicio clínico

Servicio clínico	Genotipos identificados					Nº de cepas (%)
	6	14	15	16	17	
Cirugía	3	5	6			14 (26,4%)
Medicina	1	3	5	3		12 (22,6%)
UCI		5	3	2	1	11 (20,7%)
Traumatología		2			1	3 (5,6%)
Recién nacido	1	1				2 (3,7%)
Oncología			1		1	2 (3,7%)
Lactante	1		1			2 (3,7%)
Ginecología		1			1	2 (3,7%)
Urología			1			1 (1,8%)
Posoperatorio		1				1 (1,8%)
Pensionado			1			1 (1,8%)
Neonatología			1			1 (1,8%)
Neurología			1			1 (1,8%)
Total	6	18	20	5	4	53
Porcentaje	11,3%	33,9%	37,7%	9,4%	7,5%	

Tabla 3. Patrones de resistencia de 41 cepas estudiadas por CIM asociados a los genotipos

Genotipo	Patrón de resistencia	cepas Nº/n	Porcentaje
14	P-A-C-G-Ci-L-E*	12/14	86,0
	P-A-C-Ci-L-E	1/14	7,1
	P-A-C-G-Ci	1/14	7,1
15	P-A-C-G-Ci-L-E	15/17	88,2
	P-A-G-Ci-L-E	1/17	5,9
	P-A-C-G-Ci	1/17	5,9
16	P-A-C-G-Ci-L-E	4/4	100
17	P-A-C-G-Ci-L-E	4/4	100
6	P-A-C-G-Ci-L-E	1/2	50
	P-A-E	1/2	50

*P: penicilina, A: ampicilina; C: cefradina; G: gentamicina; Ci: ciprofloxacino; L: lincomicina; E: eritromicina.

Figura 2. Porcentaje de patrones de resistencia de 41 cepas de SAMR

cuadro infeccioso es o no resistente a la oxacilina. Esto último debido a que constituye el antibiótico de elección utilizado para tratar las infecciones por *Staphylococcus aureus*. En la actualidad, se cuenta con diferentes técnicas para detectar SAMR, siendo las más utilizadas las fenotípicas. Estas presentan algunos inconvenientes, entre los que destaca, períodos de incubación variables dependiendo de la técnica y, además, el resultado puede verse afectado por la expresión heterogénea de resistencia a meticilina de la cepa^{5,9}.

De las 55 cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas, 53 presentaron regiones hipervariables asociadas al gen *mecA*. A 41 de estas cepas se les determinó CIM frente a oxacilina, obteniéndose una correlación de 100%. Este último método cuantitativo es recomendable aplicarlo cuando los demás métodos cualitativos de susceptibilidad antimicrobiana no son concluyentes¹⁰.

La determinación fenotípica de resistencia a meticilina mediante MicroScan® presentó errores (5,4%), lo cual se debe a que los sistemas automatizados de microdilución poseen una menor sensibilidad, especificidad y eficacia diagnóstica, ya que no se consideran los múltiples factores que influyen en la expresión de la resistencia como son la temperatura de incubación, osmolaridad del medio, tiempo de incubación y densidad del inóculo⁶.

Sólo una de las cepas carentes de regiones hipervariables, fue clasificada como resistente a

oxacilina mediante CIM y MicroScan®. Posteriormente, se determinó que la resistencia no se debía a la producción de PBP2a, sino a una hiperproducción de β -lactamasas (BORSA).

Las cepas BORSA, a diferencia de las cepas SAMR, se caracterizan por ser susceptibles a antibióticos β -lactámicos asociados a inhibidores de β -lactamasas y por carecer del gen *mecA*^{6,11,12}. La cepa en cuestión fue sensible a ampicilina-sulbactam, razón por la cual fue clasificada como una cepa BORSA. Es importante destacar que la cepa BORSA presentó una CIM frente a oxacilina de 8 μ g/ml, lo que la diferencia de las demás cepas SAMR que presentaron una CIM ≥ 16 μ g/ml.

Los procedimientos moleculares que permiten detectar la presencia del gen *mecA* son considerados métodos *gold standard* frente a la identificación de los SAMR.

En la actualidad se emplean diferentes metodologías moleculares para este fin, sin embargo, muchas de ellas son de elevado costo y muy laboriosas, por lo que no son de utilidad diagnóstica para la clínica^{7,13,14}.

Por esta razón, en este trabajo se implementó un duplex PCR del gen *mecA*, basado en la técnica de multiplex PCR previamente descrita por Huygens⁷, la cual detecta la presencia o ausencia de regiones variables o elementos móviles asociados al gen *mecA*. Las 53 cepas que presentaron el

gen *mecA*, se agruparon en 5 genotipos, de los cuales 4 fueron distintos a los descritos por Huygens⁷. Es decir, nuestras cepas amplificaron diferentes regiones a las previamente descritas y con el fin de seguir la clasificación, denominamos nuestros genotipos con los números 14, 15, 16 y 17. Sólo seis cepas concordaron con el genotipo 6 de la clasificación de Huygens⁷, aquella que sólo amplificó la región HVR. Así, podemos inferir que en nuestro medio circulan cepas diferentes a las de Australia⁷.

Los servicios de procedencia en que se aisló el mayor número de SAMR fueron Cirugía, Medicina y UCI. Estos resultados son similares a los reportados por Otth y col en el año 1999¹⁵.

El alto porcentaje de resistencia simultánea frente a los antibióticos analizados da cuenta de la gran probabilidad de que cepas meticilino resistentes presenten multiresistencia, lo cual es de gran importancia al elegir el tratamiento antimicrobiano. De allí la necesidad de implementar técnicas moleculares de diagnóstico, las cuales entregan resultados rápidos y confiables.

Considerando las modificaciones realizadas por nuestro laboratorio a la técnica descrita por Huygens⁷ sugerimos que la implementación de ella en los laboratorios asistenciales sería de gran utilidad, tanto para determinar la presencia de regiones hipervariables asociadas al gen *mecA*, como para eventuales seguimientos epidemiológicos.

REFERENCIAS

1. WALDVOGEL F. *Staphylococcus aureus*. (Including Staphylococcal Toxic Shock). En: Mandell, Douglas & Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fifth ed 2000, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds., Churchill Livingstone, Philadelphia, pp 2070-92.
2. JEVONS M. Celbenin-resistant *Staphylococci*. *BMJ* 1961; 1: 124-5.
3. BROWN D, EDWARDS D, HAWKEY P, MORRISON D, RIDGWAY G, TOWNER K ET AL. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 1000-18.
4. LEDERMAN W, MÍMICA I. Sensibilidad *in vitro* del *S aureus* a meticilina y cloxacilina en los últimos ocho años (1961-1968). *Rev Chil Pediat* 1970; 41: 213.
5. ULLOA M, PORTE L, CARMÍ K, VARELA C, FICA A. Comparación de reacción de polimerasa en cadena, látex y antibiograma para detección de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Rev Chil Infect* 2001; 18: 255-60.
6. GIL M. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Rev Chil Infect* 2000; 17: 145-52.
7. HUYGENS F, NIMMO G, SCHOONEVELDT J, MUNCKHOF W, GIFFARD P. Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Assaying for the Presence of Variable Elements Associated with *mecA*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3093-107.
8. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standart M7-A6. NCCLS; Wayne, PA, USA. 2003.
9. LOUIE L, MATSUMURA S, CHOI E, SIMOR A. Evaluation of Three Rapid Methods for Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2170-3.
10. CAMARENA J, SÁNCHEZ R. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Control Calidad SEIMC. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/sarm.htm. (Consultado el 7 de agosto de 2006)
11. MARTÍNEZ J. *Antibióticos y Quimioterápicos Antimicrobianos*. 2ª ed. Universidad de Concepción, 1990.
12. MCDUGAL L, THORNSBERRY C. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillin and cephalosporins. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 832-9.
13. TRINDADE P, MCCULLOCH J, OLIVEIRA G, MAMIZUKA E. Molecular Techniques for MRSA Typing: Current Issues and Perspectives. *BJID* 2003; 7: 32-3.
14. SHOPSIN B, KREISWIRTH B. Molecular Epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7: 323-6.
15. OTTH L, MILSON M, ZAROR A, ARCE M, LIZAMA V. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en pacientes atendidos en el Hospital Clínico Regional de Valdivia. *Cuad Cir* 1999; 13: 55-8.