

PROTOSCOLOS RED DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LOS MICROORGANISMOS
RESISTENTES (RedLabRA)

Vigilancia de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina

Aprobado por:	Código:	RedLabRa-I-006
Fecha: 15/02/2021	Ed.:	01
Firma:	Fecha edición:	15/02/2021

OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este protocolo describe la metodología para la **detección fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina**. El fenotipo de resistencia a la metilicina (y a la oxacilina) se debe a la adquisición de los genes *mecA* o *mecC* que codifican para proteínas fijadoras de penicilina auxiliares, PBP2a y PBP2c (del inglés *penicillin-binding protein*), respectivamente, que poseen baja afinidad por los beta-lactámicos.

Los principales documentos que se han utilizado para la elaboración de este protocolo son:

- *Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA); EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.01, July 2017* (1).
- Resistencia a los antimicrobianos en estafilococos; Procedimiento nº 39 en Microbiología Clínica de la SEIMC: Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos (2).

1. Resistencia a la metilicina (oxacilina): homogénea y heterogénea.

Este mecanismo de resistencia a la metilicina implica resistencia a todos los beta-lactámicos, incluyendo penicilinas, combinaciones de beta-lactámico con inhibidor de beta-lactamasa, cefalosporinas (con la posible excepción de ceftobiprole y ceftarolina, cuyos valores de CMI se ven menos afectados), monobactams y carbapenemas (con la posible excepción de razupenem, también con valores de CMI menos afectadas) (1, 2).

El fenotipo de resistencia a la metilicina (y a la oxacilina) es mucho más frecuente entre las diferentes especies de estafilococos coagulasa negativa (ECN) (con la excepción de *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*) que en *S. aureus*.

El elemento *mec* es exógeno no está presente en cepas de *S. aureus* sensibles a la metilicina. En cepas con una marcada expresión heterogénea del gen *mecA* y bajas CMIs a la oxacilina se dificulta una adecuada determinación de la sensibilidad antibiótica (3).

La expresión fenotípica de la resistencia mediada por el gen *mecA* es compleja y puede afectarse por diferentes factores como la temperatura, el pH, la osmolaridad, la presencia de secuencias cromosómicas reguladoras y de otros genes cromosómicos no relacionados. Esto da lugar a dos tipos de resistencia a metilicina, **homogénea** o de alto nivel (cuando la mayor parte de la población expresa la resistencia) y **heterogénea** (CMI de oxacilina 1-16mg/L), siendo ésta última la más habitual (2). La expresión heterogénea se caracteriza porque sólo una pequeña proporción de la población ($\leq 0,1\%$) sobrevive con concentraciones de oxacilina superiores a 10 mg/L, mientras que la mayor parte de la población no es viable con bajas concentraciones del antimicrobiano (1-5 mg/L) (2).

Algunas cepas expresan niveles de resistencia bajos a la oxacilina, pero no tienen los genes *mecA* y *mecC* y no producen PBPs alternativas, este fenómeno se conoce como la resistencia *borderline* a la oxacilina en *S. aureus* (BORSA). Estas cepas *borderline mecA* negativas son sensibles a todos los beta-lactámicos (penicilinas antiestafilocócicas, cefalosporinas y carbapenemas). Son muy poco frecuentes y el mecanismo de resistencia no está bien caracterizado, pero podría incluir la hiperproducción de beta-lactamasas o la alteración de PBPs preexistentes (4).

2. Detección de resistencia a la meticilina por difusión en disco o microdilución (CMI).

El fenotipo de resistencia a la meticilina/oxacilina en *Staphylococcus* se puede detectar fenotípicamente mediante la técnica de difusión en disco de cefoxitina (30 µg) o por microdilución en caldo o en agar.

La expresión heterogénea de la resistencia afecta particularmente a las CMIs de oxacilina, que pueden ser sensibles. La **cefoxitina** es un marcador muy sensible y específico de la resistencia a meticilina mediada por los genes *mecA/mecC*, pues es un inductor más potente del sistema regulatorio de *mecA* que las penicilinas y por ello mejora la expresión de este gen, incluso en cepas con resistencia heterogénea. El disco de oxacilina no se recomienda, por lo que no está incluido en la tabla de puntos de corte de EUCAST. Los criterios EUCAST establecen el uso de cefoxitina con los siguientes puntos de corte:

- A. Difusión en disco de cefoxitina (30 µg). Cepas de *S. aureus* con un halo de inhibición < **22mm a cefoxitina** deben informarse como resistentes a meticilina.
- B. Microdilución cefoxitina. Cepas de *S. aureus* con **CMIs > 4 mg/L a cefoxitina** deben informarse como resistentes a meticilina.

Un método de detección alternativo para la detección de PBP2a es la aglutinación, método no disponible para la detección de PBP2c.

3. Utilización de controles: cepas de referencia.

Las cepas patrón o de referencia se usan para comprobar que los valores de sensibilidad obtenidos mediante los diferentes métodos de determinación son los correctos. A continuación, se nombran algunas cepas que podrían ser utilizadas a tal efecto.

Cepa	Mecanismo	Fuente
<i>S. aureus</i> ATCC 29233	Sensible a meticilina	EUCAST (1)
<i>S. aureus</i> NCTC 12493	Resistente a meticilina (<i>mecA</i>)	EUCAST (1)
<i>S. aureus</i> NCTC13552	Resistente a meticilina (<i>mecC</i>)	EUCAST (1)

REALIZACIÓN

Se utiliza el medio Mueller-Hinton suplementado con 2% de NaCl en el caso de realizar los métodos de dilución y además ajustado con cationes en el caso de que se realice mediante el método de dilución en caldo. Se requiere un inóculo equivalente al 0,5 de la escala de McFarland y 24 horas completas de incubación en atmósfera aerobia a 35°C. La incubación a temperaturas superiores a 35°C puede no permitir la detección de la resistencia a la meticilina en los estafilococos.

Preparación del inóculo bacteriano: realizar una suspensión del microorganismo en un tubo con agua destilada estéril o con solución salina hasta conseguir una turbidez del 0,5 de la escala de McFarland.

Siembra: introducir una torunda dentro de la suspensión y al retirarla, rotar varias veces contra la pared del tubo con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. Inocular completamente las placas de Mueller-Hinton: para ello debe deslizarse la torunda por la superficie del agar tres veces, en tres direcciones distintas y por último pasarla por la periferia del agar, para conseguir una siembra uniforme. Dejar secar la superficie inoculada.

Con la ayuda de un dispensador o de pinzas, depositar un disco de cefoxitina de 30 µg, sobre la superficie inoculada y dejar unos minutos a temperatura ambiente para permitir la difusión del antibiótico.

Incubar en estufa a temperatura no superior a 35°C durante 24 horas completas en atmósfera aerobia.

Lectura de los resultados: la lectura de los halos de inhibición se realiza con la ayuda de un pie de rey.

RECURSOS MATERIALES

Equipos y materiales:

- Frigorífico (2-8°C)
- Congelador de -20°C
- Estufa de incubación atmósfera aeróbica (37 ± 2°C)
- Agitadores "vortex":
- Pipetas de 200 µl, 1000 µl
- Mecheros bunsen de gas
- Dispensador de discos o pinzas previamente flameadas y frías.
- Pie de rey con resolución de 1 mm
- Tubos de vidrio estériles
- Asas de plástico estériles para siembra
- Escobillones estériles
- Gradillas para tubos

Reactivos:

- Estándar de turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland
- Solución de PBS salina estéril
- Agar Müeller-Hinton en placas.
- Discos de cefoxitina (30µg)
- Tubos con caldo de Mueller Hinton ajustado con cationes y tubos con caldo suplementados con NaCl al 2% o sistema comercial similar
- Antibiótico cefoxitina para la microdilución

BIBLIOGRAFÍA

1. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.01, July 2017
2. Procedimiento nº 39 en Microbiología Clínica de la SEIMC: Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. Resistencia a los antimicrobianos en estafilococos. PNT- MRP- 02.
3. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:595-603.
4. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:781-91.