

Avaliação da acurácia da placa de screening com oxacilina para detecção de resistência em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de crianças internadas

Evaluation of oxacillin screening plate for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized children

Marcelo Jenné Mimica¹, Eitan Naaman Berezin¹, Rozane de Lima Bigelli Carvalho², Eliana Schneider², Hélio Hehl Caiaffa-Filho^{2,3}

Resumo

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina se tornaram um grande problema clínico e também epidemiológico nas últimas décadas. A detecção apropriada desta resistência é vital para que o uso de antimicrobianos e as medidas de controle epidemiológico sejam instituídos da forma mais adequada. Com o objetivo de avaliar a acurácia da placa de screening com oxacilina para detecção de resistência em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de crianças internadas, nós estudamos 73 cepas isoladas de pacientes da Santa Casa de São Paulo. Utilizamos como gold standard a presença do gene *mecA*. Das 73 cepas, 45 (61,6%) foram *mecA*-positivas e 28 (38,4%) *mecA*-negativas. A placa de screening com oxacilina foi 100% sensível e específica para a presença do gene *mecA*. Portanto, trata-se de um método que pode ser largamente utilizado em nosso meio, em que existe alta prevalência de resistência à oxacilina.

Descritores: *Staphylococcus aureus*, Oxacilina, Resistência a metilina, Criança hospitalizada

Abstract

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become a major epidemiological and clinical problem over the last decades. In this setting, the accurate detection of methicillin resistance may ensure correct use of antibiotics and appropriate epidemiological control. To evaluate the accuracy of the oxacillin screening plate for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized children we have studied 73 clinical *S. aureus* isolates in Santa Casa. Detection of *mecA* gene was considered the gold standard method. Of the 73 strains, 45 (61,6%) were *mecA*-positive and 28 (38,4%) were *mecA*-negative. The oxacillin agar screening plate was 100% sensitive and specific for *mecA* presence. Thus it can be used in our setting, where we found a high prevalence of methicillin resistance.

Key words: *Staphylococcus aureus*; Oxacillin; Drugs resistance, microbial; Child, hospitalized

Introdução

A resistência à oxacilina no *S. aureus* requer a presença de um gene localizado no cromossomo, o gene *mecA* (Lowy, 2003). Este gene é responsável pela síntese das PBP2a (penicillin-binding protein 2a, também chamada PBP2', que substitui as outras PBPs na membrana, e que têm baixa afinidade não só para a oxacilina como também para os outros antimicrobianos beta-lactâmicos (Schito, 2006). O *mecA* faz parte de uma ilha genômica de resistência chamada SCC_{mec} (staphylococcal cassette chromosome *mec*). Estas ilhas podem conter também outros genes de resistência a antimicrobianos (Lowy, 2003).

A resistência fenotípica à oxacilina é extremamen-

¹Setor de Infectologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Santa Casa de São Paulo

²Laboratório de Microbiologia, Departamento de Patologia, Santa Casa de São Paulo

³Laboratório de Investigação Médica – LIM 03, Hospital das Clínicas-FMUSP

Trabalho realizado: Setor de Infectologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Santa Casa de São Paulo.

Endereço para correspondência: Departamento de Pediatria – Santa Casa de São Paulo. A/C.: Dr. Marcelo Jenné Mimica. Rua Dr. Cesário Motta Jr, 112 – 5 andar – Vila Buarque – CEP. 01221-020 – São Paulo. E-mail: mjmmimica@hotmail.com

te variável, e depende da expressão do gene *mecA*. Esta variabilidade é conhecida como heterorresistência fenotípica, e consiste em que, de toda população bacteriana heterogeneamente resistente todas as células carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém nem todas expressam fenotipicamente a resistência da mesma forma (Maranan et al, 1997). Cada cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) tem um perfil característico da proporção de células que crescem na presença de concentrações específicas de oxacilina e de diferentes condições ambientais (Maranan et al, 1997; Lowy, 2003). A expressão da resistência à oxacilina no *S. aureus* é regulada por genes homólogos aos reguladores do gene *blaZ*. Estes genes, *mecl* e *mecR1*, regulam a resposta do *mecA* aos beta-lactâmicos de uma maneira similar à regulação do *blaZ* pelos genes *blaR1* e *blaI* frente à exposição à penicilina (Chambers, 1997; Lowy, 2003).

Outro mecanismo (mais raro) de resistência à oxacilina que pode ocorrer é através da hiper-produção de beta-lactamases. Estes isolados que hiper-produzem beta-lactamases em geral apresentam resistência fenotípica limítrofe (Maranan et al, 1997).

Diversos métodos tem sido utilizados para a detecção da resistência à oxacilina no *Staphylococcus aureus*. Esta detecção muitas vezes pode ser difícil, devido ao fenômeno da heterorresistência do *S. aureus* à oxacilina. Os métodos historicamente mais comumente usados baseiam-se em modificações na tentativa de aumentar a expressão da resistência. Estas modificações incluem: incubação a 33-35°C ao invés de 37°C, incubação por 24 horas, ao invés de 16-18 horas, e adição de cloreto de sódio ao meio de cultura. (Chambers, 1997; Felten et al, 2002).

A detecção do gene *mecA* por métodos moleculares é considerado o método *gold standard* para avaliação qualitativa da resistência à oxacilina (Chambers, 1997). No entanto, este método não está amplamente disponível nos laboratórios. Um método com acurácia próxima a 100% é a detecção do produto do gene *mecA*, a PBP2a, através de métodos de aglutinação em látex (Cavassini et al, 1999; van Griethuysen et al, 1999; Felten et al, 2002), que também ainda são pouco difundidos e utilizados, principalmente devido ao seu custo (Fernandes et al, 2005; Velasco et al, 2005).

Para a detecção rotineira da resistência à oxacilina são os testes de disco-difusão os mais largamente utilizados. Entre todas as penicilinas penicilinase-estáveis (cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, meticilina e nafcilina), a oxacilina é a preferida para teste *in vitro* através de disco-difusão (CLSI, 2005) e tem sido utilizada por várias décadas, com estudos mostrando acurácias variadas (Cavassini et al, 1999;

Kohner et al, 1999; Felten et al, 2002; Swenson et al, 2001; Skov et al, 2003; Pottumarthy et al, 2005; Swenson et al, 2005). No entanto, diversos autores têm mostrado, nos últimos anos, a boa acurácia do teste de disco-difusão com cefoxitina para o diagnóstico da resistência à oxacilina em estafilococos coagulase-positivos (Felten et al, 2002; Skov et al, 2003; Fernandes et al, 2005; Pottumarthy et al, 2005; Sharp et al, 2005; Swenson et al, 2005; Velasco et al, 2005).

Além dos testes qualitativos, existem aqueles para determinação da CIM (concentração inibitória mínima) de oxacilina para os estafilococos, incluindo métodos de diluição em ágar e em caldo (macrodiluição e microdiluição), e de difusão em agar (Etest®, AB Biodisk, Solna, Suécia). Apesar destes métodos possibilitarem uma avaliação quantitativa da resistência à oxacilina, eles parecem não ter acurácia significativamente maior do que os testes fenotípicos qualitativos (Weller et al, 1997; Gradelski et al, 2001; Swenson et al, 2001; Velasco et al, 2005).

A acurácia dos métodos automatizados também foi avaliada em alguns estudos. É difícil comparar os resultados destes, já que há freqüentes mudanças de *software* e diferentes cartões ou painéis são disponíveis. Alguns estudos demonstraram acurácia comparável à dos testes de disco difusão, porém outros evidenciaram sensibilidade e especificidade baixas se cepas heterorresistentes ou *borderline* eram testadas (Sakoulas et al, 2001; Swenson et al, 2001; Felten et al, 2002).

Outro teste que pode ser utilizado é o teste de *screening* com placa contendo agar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e com 6µg de oxacilina por mL. Alguns estudos demonstraram sensibilidade que variava de 82,5 a 100% e especificidade de 92 a 100%, dependendo da proporção de cepas heterorresistentes ou *borderline* testadas (Cavassini et al, 1999; Kohner et al, 1999; van Griethuysen et al, 1999; Sakoulas et al, 2001; Swenson et al, 2001; Felten et al, 2002; Sharp et al, 2005; Velasco et al, 2005; CLSI, 2005). Uma das grande vantagens deste método laboratorial de detecção de resistência à oxacilina em *S. aureus* é o baixo custo, quando comparado aos outros métodos, fator de grande importância, principalmente no nosso meio. Em pacientes pediátricos internados em nosso serviço, a taxa de resistência do *S. aureus* à oxacilina beira 50% (Mimica et al, 2005), sendo vital o diagnóstico desta resistência por um método prático, barato e com boa acurácia, para uso adequado de antimicrobianos possa ser assegurado.

Desta forma, decidimos avaliar a acurácia da placa de *screening* para detecção de resistência à oxacilina em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de crianças internadas, utilizando-se a determinação da pre-

sença do gene *mecA* por reação em cadeia pela polimerase como *gold standard*.

Materiais e métodos

Amostra

Foram incluídas no estudo cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras clínicas de pacientes pediátricos internados enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar da Santa Casa de São Paulo no período de abril de 2004 a junho de 2005.

Foram excluídas as cepas isoladas de paciente que já havia anteriormente tido alguma cepa isolada envolvida no estudo (apenas a primeira cepa isolada de cada paciente durante o período do estudo foi incluída). Os isolados foram diagnosticados como *Staphylococcus aureus* através da bacterioscopia e do aspecto das colônias, sendo confirmados com as provas bioquímicas de catalase e coagulase (*slide test* e coagulase em tubo).

Detecção do gene *mecA*

Uma única colônia bacteriana era obtida de uma sub-cultura fresca e suspensa em 25µL de água esterilizada. A suspensão era então fervida a 95°C para extração do DNA. Um microlitro de cada amostra de DNA era adicionado a 19µL da mistura para a PCR, que consistia em 1U de *Taq* polimerase, 1X tampão para polimerase [contendo 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂], 200 µM da mistura de dNTPs e 0,5 µM de cada primer. As amplificações foram realizadas utilizando-se um termociclador Perkin Elmer 2400 (Applied Biosystems, California, USA). Após uma etapa inicial de desnaturação (três minutos a 94°C) 30 ciclos de amplificação eram feitos: desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 56°C por um minuto e extensão do DNA a 72°C por um minuto. A reação de amplificação concluía-se com uma etapa final de extensão a 72°C por sete minutos. O par de primers utilizados (M1, 5'-TGGCTATCGTGTCAACAATCG-3' and M2, 5'-CTGGAAGTTGTT-GAGCAGAG-3') foi descritos por Vannuffel et al (1995). O produto obtido pela amplificação do gene *mecA*, se presente, era um fragmento de DNA com 310 pb, que era então visualizado após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, utilizando-se luz ultra-violeta.

Placa de *screening* com oxacilina

Inóculo equivalente a 0,5 da escala de McFarland

era semeado em placa contendo agar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina. A semeadura também era feita com *swab* (e a retirada do excesso da mesma forma) em movimento circular em uma pequena área da placa (10 a 15 mm). As placas eram então incubadas em 33 a 35°C por 24 horas e então era feita a leitura utilizando-se luz transmitida, conforme recomendado pelo CLSI (CLSI, 2005). A presença de crescimento indicava resistência à oxacilina.

As cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) 25923, 29213 e 33591 foram utilizadas no controle de qualidade dos procedimentos.

Resultados

Foram incluídas 73 cepas durante o período do estudo. Destas, 45 foram *mecA*-positivas (61,6%) e 28 *mecA*-negativas (38,4%). A Tabela 1 mostra a distribuição das cepas por unidade de internação:

TABELA 1

Presença do gene *mecA* nas 73 cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes pediátricos em diferentes unidades no período de abril de 2004 a junho de 2005

Unidade	MecA		Total
	+	-	
CI	1	0	1
Diálise	2	1	3
RETA	2	1	3
SEMI	3	4	7
UNN	24	8	32
Ortopedia	0	1	1
UP3	3	3	6
UP4	2	2	4
UTI	8	8	16
Total	45	28	73

CI: cirurgia infantil; RETA: retaguarda do pronto-socorro infantil; SEMI: unidade semi-intensiva pediátrica; UNN: unidade neonatal; UP3: enfermaria-terceiro andar; UP4: enfermaria-quarto andar; UTI: unidade de terapia intensiva pediátrica

Em relação aos materiais clínicos em que foi isolado *Staphylococcus aureus*, tivemos: sangue (14), secreção de abscesso (4), fragmento de tecido (1) e ponta de cateter (13), *swabs* (28), secreção de cânula (10), secreção respiratória em não-FC (1), secreção respiratória em FC (2).

O teste de *screening* em placa de agar com oxacilina e NaCl teve sensibilidade e especificidade de 100% para a presença do gene *mecA*, conforme mostrado na Tabela 2

TABELA 2

Correlação entre resultado do teste de *screening* e presença do gene *mecA* nas 73 cepas de *S. aureus*

	Placa de <i>Screening</i>	
	R	S
<i>mecA</i> +	45	0
<i>mecA</i> -	0	28

R: resistente; S: sensível

Discussão

Desde o surgimento das primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina, o aumento nas taxas de resistência têm sido um fenômeno global. Porém, a incidência de MRSA varia bastante geograficamente, e mesmo dentro de uma região quando se comparam diferentes serviços de saúde. Em nosso estudo a taxa de MRSA, diagnosticados pela presença do gene *mecA* e pela placa de *screening* com oxacilina, foi bastante alta: 61,6% das cepas eram *mecA*-positivas. Em estudo prévio realizado por nós avaliando cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de corrente sanguínea de pacientes pediátricos esta taxa foi de no máximo 50% (Mimica et al, 2005).

Diversos estudos já avaliaram a acurácia de testes diagnósticos fenotípicos para prever a presença do gene *mecA*, que é o determinante genético da resistência à oxacilina (e a todos os beta-lactâmicos) nos *Staphylococcus* spp. Um dos mais utilizados é a placa de *screening* contendo agar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6 µg/mL de oxacilina.

A acurácia deste método relatada na literatura é variável, mas em geral muito boa. Cavassini et al (1999) encontraram sensibilidade baixa (82,5%), porém as 80 cepas de MRSA incluídas no estudo eram cepas previamente diagnosticadas como heterorresistentes. Uma menor sensibilidade da placa de *screening* (90%) foi também encontrada por Swenson et al (2001), mas assim como no estudo de Cavassini et al (1999), estes autores analisaram cepas já conhecidas como muito heterorresistentes. As especificidades do método nestes estudos foi de 98,3% (Cavassini et al, 1999) e 92% (Swenson et al, 2001).

Nas cepas analisadas, este método apresentou sensibilidade e especificidade de 100%, sendo ainda de fácil leitura, prático, e possibilitando a avaliação de mais de uma cepa na mesma placa, diminuindo assim o custo.

São limitações do presente estudo a amostra pequena e a possibilidade de clonalidade. Porém nossos resultados chamam a atenção para a importância do diagnóstico correto da resistência à oxacilina nos estafilococos. Para o uso adequado de antimicro-

bianos e de medidas de controle de infecção hospitalar, principalmente em ambientes como o nosso, em que o gene *mecA* está amplamente distribuído, a utilização de um método com boa acurácia é indispensável.

Referências bibliográficas

- Cavassini M, Wenger A, Jatou K, Blanc DS, Bille J. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1999;37:1591-4.
- Chambers HF. Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997;10:781-91.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, Estados Unidos, 2005.
- Felten A, Grandry 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 the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol 2002;40:2766-71.
- Fernandes CJ, Fernandes LA, Collignon P. Cefoxitin resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2005;55:506-10.
- Gradelski E, Valera L, Aleksunes L, Bonner D, Fung-Tomc J. Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. J Clin Microbiol 2001;39:2961-3.
- Kohner P, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill III, 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;37:2952-61.
- Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. [Review] J Clin Invest 2003;111:1265-73.
- Maranan MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistance in Staphylococci: Epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. [Review] Infect Dis Clin North Am 1997;11:813-49.
- Mimica, MJ, Carvalho R, Berezin EM, Sáfiadi MAP, Matsunaga A, Neves T, et al Perfil de sensibilidade de 68 cepas de *S. aureus* causadoras de infecção nosocomial bacteriêmica em crianças de 0-14 anos em hospital terciário de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Infectologia Pediátrica, 2005, Foz do Iguaçu. J Paranaense Pediatr 2005;6:53.
- Pottumarthy S, Fritsche TR, Jones RN. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting *mecA*-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: validation report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Diagn Microbiol Infect Dis 2005;51:57-62.
- Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. J Clin Microbiol 2001;39:3946-51.
- Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. [Review] Clin Microbiol Infect 2006;12(Supl. 1):3-8.
- Sharp SE, Warren JA, Thomson RB. Cefoxitin disk diffusion screen for confirmation of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates and utility in the clinical laboratory. Diagn Microbiol Infect Dis 2005;51:69-71.

Skov R, Smyth R, Claussen M, Larsen AR, Frimodt-Moller N, Olsson-Liljequist B, et al Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2003;52:204-7.

Swenson JM, Williams PP, Killgore G, O'Hara CM, Tenover FC. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. J Clin Microbiol 2001;39:3785-8.

Swenson JM, Tenover FC, and the Cefoxitin Disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol 2005;43:3818-23.

van Griethuysen A, Pouw M, van Leeuwen N, Heck M, Willemse P, Buiting A, et al Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1999;37:2789-92.

Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, et al Specific detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1995;33:2864-7.

Velasco D, Tomas MM, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, et al Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2005;55:379-82.

Weller TMA, Crook DW, Crow MR, Ibrahim W, Pennington TH, Selkon JB. Methicillin susceptibility testing of staphylococci by Etest and comparison with agar dilution and *mecA* detection. J Antimicrob Chemother 1997;39:251-3.

Data de recebimento: 15/08/2006

Data de Aprovação: 09/10/2006