



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Variantes pequeñas de *Staphylococcus aureus*: utilidad de distintas pruebas para su diagnóstico y estudio de sensibilidad

Mercedes Delgado-Valverde^{a,*}, Pedro Fernández-Echauri^a, Nínive Batista-Díaz^a y Álvaro Pascual-Hernández^{a,b}

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, España

^b Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de diciembre de 2012

Aceptado el 17 de junio de 2013

On-line el 19 de septiembre de 2013

Palabras clave:

Staphylococcus aureus

Variantes pequeñas

Identificación

Sensibilidad antibiótica

R E S U M E N

Objetivo: Las variantes de colonia pequeña de *Staphylococcus aureus* (VCPSA) constituyen una subpoblación con características especiales.

Métodos: Se estudió el comportamiento fenotípico y la sensibilidad antibiótica de 4 aislados clínicos de VCPSA.

Resultados: Las colonias crecieron en los medios de cultivo habituales excepto en Mueller Hinton. Todos los aislados fueron resistentes a ciprofloxacino y cotrimoxazol.

Discusión: Las VCPSA son aisladas con baja frecuencia, y es necesario conocer los métodos óptimos para su identificación y el estudio de su sensibilidad antibiótica.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: Usefulness of various test for diagnosis and susceptibility study

A B S T R A C T

Introduction: Small colony variants of *Staphylococcus aureus* (SCVSA) are a sub-population with special features.

Methods: The phenotypic features and antibiotic susceptibility of four clinical isolates SCVSA were studied.

Results: Colonies grew in the usual culture media, except in Mueller Hinton. All isolates were resistant to ciprofloxacin and co-trimoxazole.

Discussion: As SCVSA are isolated with low frequency, it is necessary to determine the optimal methods for their identification and antibiotic susceptibility study.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Staphylococcus aureus

Small colony variants

Identification

Antibiotic susceptibility

Introducción

Desde la primera descripción de las variantes de colonia pequeña de *Staphylococcus aureus* (VCPSA) hace alrededor de 80 años¹, se han descrito múltiples casos de infecciones producidas por estas. Tradicionalmente las VCPSA se han relacionado con infecciones en pacientes con fibrosis quística e infecciones crónicas como osteomielitis, debido a su capacidad de permanecer intracelularmente haciéndose resistentes a la acción de antimicrobianos; pero también se han descrito como agentes causantes de

infecciones agudas como sinusitis, timpanitis e infecciones del sistema nervioso²⁻⁵. Las VCPSA tienen características fenotípicas propias que las diferencian de sus parientes normales, dificultando su identificación en el laboratorio de microbiología. Sus principales rasgos son: lento crecimiento, tamaño reducido, disminución de la pigmentación, inhibición de la β -hemólisis y posible disminución de las reacciones de la catalasa y la coagulasa⁶. Las VCPSA pueden presentar dependencia de timidina, hemina o menadiona, sustratos implicados en la cadena transportadora de electrones y en la síntesis de ADN. La deficiencia de estos compuestos y el conocimiento de las rutas en las que están implicados pueden explicar sus características especiales⁷. Las implicaciones clínicas de las VCPSA y su difícil diagnóstico microbiológico hacen imprescindible conocer las características de crecimiento de las mismas, así como los métodos

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mercdss@gmail.com (M. Delgado-Valverde).

para su cultivo, identificación y estudio de sensibilidad antimicrobiana. El objetivo de nuestro estudio fue la búsqueda de los métodos óptimos para la identificación de VCPSA, así como para la detección de resistencias.

Métodos

Muestras

Se estudiaron 4 aislados de muestras clínicas obtenidas a lo largo de un año en nuestro hospital. Las muestras incluían un exudado ótico y 3 esputos de fibrosis quística, 2 de los cuales pertenecían al mismo paciente. Como control de los ensayos se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

Identificación

Se estudió el comportamiento de los 4 aislados en medios habituales: Columbia agar sangre (AS), Agar chocolate, Mueller Hinton (MHA), Mueller Hinton sangre (MHS) y Agar Schaedler. Los cultivos se incubaron 96 h a 35–37 °C en atmósfera aerobia, anaerobia y enriquecida con CO₂, realizándose lecturas cada 24 h. La identificación fenotípica de *S. aureus* se realizó mediante tinción de Gram, pruebas de la catalasa, y coagulasa en tubo (BD BBL™ Coagulase Plasma, rabbit with EDTA®) con lecturas a las 2, 4 y 24 h y aglutinación en látex para detección de coagulasa (Staphaurex Plus remel®). Paralelamente se realizó panel MIC/ID GRAM POSITIVOS (WIDER) con sistema semiautomatizado. La identificación genotípica se realizó mediante la amplificación por PCR y secuenciación del gen de la proteína A (spa)⁸.

Ensayos de dependencia

La dependencia de timidina, hemina y menadiona (Sigma Aldrich®) se ensayó con discos y con medios suplementados, ambos preparados en nuestro laboratorio⁹. En el método con discos, la dependencia de timidina se estudió utilizando discos impregnados con 15 µl de solución de timidina a distintas concentraciones (100 y 200 µg/ml) y para hemina y menadiona con discos impregnados con 15 µl de solución de menadiona o hemina a distintas concentraciones (10 y 20 µg/ml). Los ensayos se llevaron a cabo en medio MHA utilizando un inóculo de 0,5 McFarland. Un aislado fue considerado dependiente cuando se objetivó crecimiento de colonias solamente alrededor de los discos tras 24 h de incubación en atmósfera aerobia a 35–37 °C. Para el método en medio suplementado, se utilizó MHA suplementado con timidina (MHT) (100 y 200 µg/ml); MHA suplementado con menadiona (10 y 20 µg/ml), y MHA suplementado con hemina (10 y 20 µg/ml). Los medios se incubaron en atmósfera aerobia a 35–37 °C durante 24 h y se reincubaron hasta 72 h en caso de resultado negativo. Un aislado fue considerado dependiente cuando creció en el medio MHA suplementado con el correspondiente sustrato y no en medio MHA.

Sensibilidad antibiótica

La sensibilidad antimicrobiana fue estudiada por 2 métodos. Panel MIC/ID GRAM POSITIVOS (WIDER) en sistema semiautomatizado, y difusión con discos en medio AS y MHT para eritromicina, clindamicina, linezolid, cefoxitina, teicoplanina, vancomicina, ciprofloxacino, tetraciclina, gentamicina, trimetoprim-sulfametoxazol y rifampicina. Los valores de CMI y los diámetros de inhibición de los halos fueron interpretados según los puntos de corte de CLSI para *S. aureus*¹⁰. En aislados resistentes a cefoxitina se confirmó la resistencia mediante aglutinación de látex (MRSA Screen, Denka Seiken®) y PCR para detección del gen *mecA* (BD GeneOhm™). El tipo de SCCmec fue determinado usando una PCR múltiple. La presencia de *ccrB2* fue confirmada por PCR según está descrito. Las parejas de cebadores IS5, MA6, IS1272-F y *mecR1-R* fueron usadas para determinar la presencia del complejo SCCmec clase B⁸.

Estudio de la relación clonal

Todos los aislados fueron genotipados mediante electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) tras digestión del ADN cromosómico con enzima de restricción SmaI. Los geles fueron analizados por inspección visual. Las secuencias de nucleótidos obtenidas en la amplificación del gen *spa* fueron analizadas utilizando Ridom StaphType™ software 1.5 (Ridom GmbH, Würzburg, Alemania)⁸.

Resultados

Identificación

A las 24 h de incubación en AS, las colonias fueron puntiformes o con aspecto de «huevo frito», de tamaño aproximadamente 10 veces menor que el habitual, con disminución de la pigmentación y la hemólisis, independientemente de la atmósfera de incubación. El crecimiento en agar chocolate y en agar Schaedler correspondía a las características de VCP. No hubo reversión del fenotipo a la morfología normal durante el período de estudio. En medio MHA y en MHS no se obtuvo crecimiento de ninguno de los aislados. En la tinción de Gram se observaron cocos grampositivos compatibles con estafilococos. En la [tabla 1](#) se muestran las características fenotípicas de los aislados estudiados. La identificación en el sistema comercial fue *S. hyicus* (bajo porcentaje). La amplificación del gen *spa* se confirmó en todos los aislados.

Ensayos de dependencia

Todos los aislados fueron dependientes de timidina en el ensayo con discos, independientemente de la concentración empleada; ningún aislado presentó dependencia de hemina ni menadiona. A las 24 h de incubación todos los aislados crecieron en el medio MHT a ambas concentraciones; un aislado creció en medio suplementado con hemina a las 2 concentraciones empleadas.

Tabla 1
Características de los aislados estudiados

Aislado	Muestra	Catalasa	Coagulasa			Tipado spa	Hemólisis	Morfología	Dependencia con discos			
			Látex	Tubo					Timidina	Hemina	Menadiona	
				2 h	4 h							24 h
VCPSA1	Exudado ótico	+	+	–	–	+	T1482	Disminuida	Huevo frito	+	–	–
VCPSA2	Espuito FQ	+	+	+	+	+	T1341	Disminuida	Huevo frito	+	–	–
VCPSA3	Espuito FQ	+	+	+	+	+	T067	Disminuida	Puntiforme	+	–	–
VCPSA4	Espuito FQ	+	+	–	–	+	T067	No	Huevo frito	+	–	–

Sensibilidad antibiótica

No se obtuvo crecimiento en el pocillo control del sistema comercial y este lo interpretó como sensible a todos los antimicrobianos. En el test de difusión con discos en AS todos los aislados fueron resistentes a ciprofloxacino y a trimetoprim-sulfametoxazol, y sensibles al resto. Los 2 aislados del paciente con fibrosis quística fueron resistentes a cefoxitina; dieron positiva la PCR del gen *mecA* y la aglutinación en látex para detección de SARM. Los aislados portadores de gen *mecA* fueron identificados como SCC*mec* tipo iv. Los resultados de sensibilidad fueron los mismos en AS y en MHT.

Estudio de la relación clonal

Los aislados de diferentes pacientes no estuvieron relacionados clonalmente, mientras que los 2 aislados del mismo paciente mostraron idéntico patrón de bandas. Los resultados del tipado spa se muestran en la [tabla 1](#).

Discusión

Las variantes de colonia pequeña de *S. aureus* son aisladas con baja frecuencia en los laboratorios de microbiología clínica¹¹; en nuestro centro se aislaron con una prevalencia del 1% con respecto a los *S. aureus* totales, mientras que en pacientes con fibrosis quística la prevalencia se situó en el 11%. Su baja prevalencia puede ser debida en parte a la dificultad de reconocimiento y aislamiento de las mismas, ya que pueden quedar enmascaradas por el crecimiento de colonias normales de *S. aureus* y de otras especies. Este hecho supone un reto para los microbiólogos clínicos: es importante reconocer sus rasgos fenotípicos, conocer los métodos para su identificación y el estudio de su resistencia¹². En nuestra serie, 3 de los aislados procedían de pacientes con fibrosis quística, confirmando así lo descrito en cuanto a la mayor prevalencia de VCP en este cuadro¹³. Proctor et al.⁷ describen la existencia de una asociación entre aislados de fibrosis quística y dependencia a timidina, así como resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol; esta asociación se demuestra en nuestro estudio, ya que todos los aislados de fibrosis quística presentaron dependencia de timidina y fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol. Spanu et al.³ describen un caso de meningitis por VCP *S. aureus*, y demostraron que la identificación por sistemas semiautomatizados puede ser errónea, como ocurrió en nuestro caso. Las variantes de colonia pequeña pueden actuar como reservorio de resistencia a meticilina, y es necesario conocer las opciones para la detección de resistencia. En nuestro caso la detección de resistencia a meticilina se realizó por 3 métodos diferentes sin detectarse discrepancias entre los resultados; se ha demostrado que los métodos más sensibles son la aglutinación en látex y la PCR del gen *mecA*¹⁴.

En conclusión, es necesario tener en cuenta a las VCPSA en la etiología de infecciones crónicas, así como conocer las características especiales de las mismas y los métodos a emplear para su correcta detección. Los ensayos de dependencia son útiles para su caracterización, y junto con las pruebas de la catalasa y la coagulasa se puede llegar fácilmente a una correcta identificación. Para la detección de resistencias es mejor emplear métodos manuales a métodos semiautomatizados, utilizando medios ricos como Columbia AS o MH suplementado con timidina; para la detección de aislados SARM se pueden emplear tanto técnicas rápidas como test de difusión con discos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Hoffstadt RE, Youmans GP. *Staphylococcus aureus*: Dissociation and its relation to infections and to immunity. J Infect Dis. 1932;51:216-42.
- Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 1995;20:95-102.
- Spanu T, Romano L, D'Inzeo T, Masucci L, Albanese A, Papacci F, et al. Recurrent ventriculoperitoneal shunt infection caused by small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2005;41:e48-52.
- Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, et al. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. J Clin Microbiol. 2007;45:168-72.
- Besier S, Zander J, Kahl BC, Kraiczky P, Brade V, Wichelhaus TA. The thymidine-dependent small-colony-variant phenotype is associated with hypermutability and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:2183-9.
- Kipp F, Kahl BC, Becker K, Baron EJ, Proctor RA, Peters G, et al. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. J Clin Microbiol. 2005;43:1956-9.
- Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: A pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol. 2006;4:295-305.
- Velasco C, López-Cortés LE, Caballero FJ, Lepe JA, deCueto M, Molina J, et al. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia in Southern Spain. J Hosp Infect. 2012;81:257-63.
- Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, et al. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis. 1998;177:1023-9.
- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twentieth informational supplement M100-S22. Wayne, PA: CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- Gomez-Gonzalez C, Acosta J, Villa J, Barrado L, Sanz F, Orellana MA, et al. Clinical and molecular characteristics of infections with CO₂-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2010;48:2878-84.
- Von Eiff C. *Staphylococcus aureus* small colony variants: A challenge to microbiologists and clinicians. Int J Antimicrob Agents. 2008;31:507-10.
- Yagci S, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U, Sener B. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect. 2013;19:77-84.
- Kipp F, Becker K, Peters G, von Eiff C. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2004;42:1277-9.