

# BATTERIOLOGIA

## Nuovo terreno cromogeno MRSA ID per la rilevazione di *S. aureus* meticillino-resistente: affidabilità nella lettura

Marco Arosio<sup>1</sup>, Sergio Perego<sup>1</sup>, Annibale Raglio<sup>1</sup>, Marco Passera<sup>1</sup>, Laura Trezzi<sup>2</sup>,  
Francesca Vailati<sup>1</sup>

<sup>1</sup> USC Microbiologia e Virologia, Ospedali Riuniti di Bergamo.

<sup>2</sup> Dipartimento di prevenzione medico, ASL Bergamo.

**Key words:** *S. aureus*, methicillin-resistant, chromogenic medium, MRSA ID.

**New chromogenic agar medium MRSA ID for detection of methicillin-resistant *S. aureus*:  
Reliability of reading.**

### SUMMARY

We proceeded to the evaluation of the reability of reading and interpretation of cultures on the chromogenic medium MRSA ID for the detection of methicillin-resistant *S. aureus*, within a surveillance program.

Our observations demonstrate such method results a useful instrument of screening for the prevention and the control of the spread of the infections by MRSA.

### INTRODUZIONE

La prima segnalazione di *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) è di poco successiva all'introduzione della meticillina in terapia.

In Europa la prevalenza media di MRSA è aumentata dall'1% nel 1980 al 30% nel 1991 e attualmente mostra una diversa distribuzione tra i diversi Paesi che varia da meno dell'1% (Paesi Baltici) a più del 40% (Italia, Regno Unito) (8, 15).

L'elevata circolazione di MRSA rappresenta un problema non solo nelle strutture ospedaliere ma anche nelle Residenze Assistenziali per Anziani dove la prevalenza di colonizzazione da MRSA oscilla tra l'8% ed il 53% (8, 9).

I soggetti residenti colonizzati da MRSA hanno un rischio sei volte maggiore di sviluppare un'infezione stafilococcica rispetto a quelli colonizzati da ceppi sensibili (MSSA) (10).

Negli ultimi anni sono stati introdotti terreni cromogeni che consentono la rapida rilevazione di MRSA anche dai campioni contaminati, come le cavità nasali; tale screening dei portatori può quindi contribuire in modo efficace a ridurre la trasmissione e la diffusione di questa infezione (1-3, 5, 7, 14).

Diversi Autori hanno dimostrato una buona performance del terreno cromogeno MRSA ID (bioMérieux) con sensibilità tra 89 - 98.8% e specificità 97.4 - 99.5 (6, 11-13).

Con questo lavoro, abbiamo voluto valutare la

facilità di lettura ed interpretazione delle colture di *S. aureus* meticillino-resistente su MRSA ID in relazione al colore ed aspetto delle colonie, nell'ambito di un programma di sorveglianza.

### MATERIALI E METODI

Sono stati effettuati 838 tamponi nasali tra gli ospiti e gli operatori di due Residenze Sanitarie Assistenziali della provincia di Bergamo che sono stati poi seminati, entro 24 ore dal prelievo, direttamente sul terreno cromogeno MRSA ID presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia degli Ospedali Riuniti di Bergamo.

Il terreno è stato incubato a 37°C in aerobiosi con lettura delle piastre dopo 24 ore, valutando la presenza di colonie MRSA; in assenza di crescita o di colorazione le piastre sono state reincubate per un altro giorno.

Il terreno MRSA ID presenta un substrato nutritivo costituito da differenti peptoni, un substrato cromogeno ( $\alpha$ -glucosidasi), un antibiotico (cefotaxina) ed inoltre una miscela selettiva che inibisce la crescita della maggior parte dei microrganismi diversi dagli stafilococchi.

Secondo le indicazioni del produttore:

- le colonie di MRSA appaiono di colore verde a 24 ore e non sono richieste ulteriori indagini di conferma;
- dopo un'incubazione di 48 ore l'eventuale presenza di colonie caratteristiche deve essere confermata con test biochimici o immunologici;

- le colonie di stafilococchi coagulasi negativi (CoNS) possono apparire verde pallido;
- le colonie di *Bacillus* spp, bacilli Gram negativi e ceppi ESBL produttori, appaiono di colore verde ma si differenziano per la diversa morfologia;

L'aspetto cromatico delle colonie è stato registrato come di seguito indicato: verde, verde pallido e non-verde in considerazione a quanto descritto per il test MRSA ID.

Su tutte le colonie verdi e verdi pallide sono stati effettuati i test di conferma dell'identificazione (esame microscopico ed eventualmente il test della catalasi e della coagulasi in provetta) e della meticillino-resistenza (agar diffusione Kirby-Bauer secondo le indicazioni CLSI) (15).

Dopo 24 ore di incubazione, si è osservato lo sviluppo di colonie francamente verdi in 77 casi (9.2%), verde pallido in 119 (14.2%) e non verdi in 642 (76.6%). La successiva analisi con i test tradizionali ha permesso di confermare come MRSA le colonie verdi in 73 casi su 77 (94.8%) e le colonie verde pallido in solo 3 casi su 119 (2.5%); prolungando invece l'incubazione a 48 ore si è constatato che altre 22 colonie acquistavano una caratteristica colorazione verde, aggiungendosi quindi alle precedenti 77, ma tutte risultavano poi non MRSA. Pertanto 73 su 99 colonie verdi (73.7%) si confermano *S. aureus* meticillino-resistente.

## CONCLUSIONI

La recente emergenza di MRSA pone l'esigenza da parte dei Laboratori di Microbiologia di attuare nuove e sempre più efficaci strategie nei programmi di sorveglianza attiva per la prevenzione ed il controllo della diffusione di *S. aureus* meticillino-resistente sia nelle Strutture Ospedaliere che nelle Residenze Assistenziali Sanitarie.

Lo svantaggio dei terreni tradizionali risulta nella richiesta di test aggiuntivi per la differenziazione di *S. aureus* dall'eventuale flora polimicrobica. Il riconoscimento poi delle colonie di MRSA rispetto a quelle di MSSA necessita quindi dell'esecuzione di ulteriori test di sensibilità con un significativo dispendio di tempo e di carico di lavoro nella comune pratica di laboratorio.

Il recente sviluppo di terreni cromogeni per l'identificazione di *S. aureus* è stato utilizzato per la rilevazione delle colonie meticillino-resistenti. L'aggiunta di vari agenti selettivi comporta una sensibilità e specificità variabile nello screening degli MRSA quando confrontati con alcuni dei terreni tradizionali.

Anche se studi comparativi indipendenti sono comunque richiesti, la performance migliore dei terreni cromogeni è stata ottenuta con l'aggiunta

di cefoxitina, presente in MRSA ID al posto dell'oxacillina come agente selettivo, in accordo con le più recenti indicazioni del CLSI che suggeriscono questa molecola nella valutazione della meticillino-resistenza (3, 6).

Sebbene diversi metodi, anche in biologia molecolare, sono stati sviluppati e descritti per la rapida identificazione di *S. aureus* meticillino-resistente, i terreni cromogeni, come MRSA ID, non richiedono una speciale strumentazione e pertanto potrebbero trovare una prossima utilizzazione nei laboratori di Microbiologia, anche se occorre tenere presente che l'interpretazione del colore delle colonie risulta critica, considerata la variabilità di esperienza e di sensibilità cromatica tra i diversi operatori.

Un altro elemento da considerare criticità, in relazione alla sede di prelievo (tamponi muco-cutanei) nei programmi di sorveglianza, è rappresentato dall'elevata percentuale di colture miste: relativamente facile risulta a questo proposito la rilevazione delle colonie verdi in MRSA ID suggestive di *S. aureus* meticillino-resistente in presenza di flora polimicrobica.

Le nostre osservazioni dimostrano che, in base al colore verde, sono stati correttamente identificati come MRSA, 73 casi su 76 (96%) dopo 24 h di incubazione, come segnalato da Diederer et al, che riportano una migliore performance del terreno cromogeno MRSA ID a 24 ore (13).

Il terreno cromogeno MRSA ID si pone pertanto come utile strumento di screening nei programmi di sorveglianza attiva per la rilevazione dei portatori nasali e la prevenzione ed il controllo della diffusione delle infezioni da MRSA.

Ulteriori studi sono richiesti per valutare l'utilità di questo promettente metodo nell'identificazione di *S. aureus* meticillino-resistente direttamente da altri campioni clinici, prima dell'introduzione nella routine microbiologica.

Le nostre osservazioni confermano comunque la relativa facilità di lettura e di interpretazione del terreno cromogeno Agar MRSA ID, sia pure alla prima valutazione nell'attività diagnostica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Apfalter P, Assadian O, Kalczyk A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation of five selective media. BR J Biomed SCI. 2000; 57: 269-72.
2. Blanc DS, Wenger A, Bille J. Evaluation of a novel medium for screening specimens from hospitalized patients to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41: 3499-502.
3. Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005; 56: 1000-18.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing: sixteenth informational supplement. M100-S16. CLSI, 2006.
5. Davies S, Zadik PM. Comparison of methods for the isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Pathol 1997; 50: 257-8.
6. Diederer BMW, van Leest ML, van Duijn, et al. Performance of MRSA ID, a new chromogenic medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2006; 44: 586-8.
7. Diederer B, van Duijn I, van Belkum, et al. Performance of CHROMagar MRSA Medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43: 586-8.
8. Goglio A. Infezioni nelle strutture residenziali per anziani: microrganismi responsabili e resistenze agli antibiotici. GIIO 2005; 1: 22-37.
9. Mendelson G, Yearmack Y, Granot E, et al. *S. aureus* carrier state among elderly residents of a long-term care facility. J Am Med Dir Assoc 2003; 4: 125-7.
10. Muder RR, Brennen C, Drenning SD, et al. Multiple antibiotic-resistant Gram negative bacilli in a long-term care facility: A case-control study of patient risk factors and prior antibiotic use. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18: 809-13.
11. Nonhoff C, Struelens MJ, Brenner A, et al. Comparison of MRSA ID medium and enrichment broth culture for detection of methicillin resistant *S. aureus* carriers by muco-cutaneous surveillance cultures. ECCMID 2005.
12. Perry JD, Davies A, Butterworth LA, et al. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *S. aureus*. J Clin Microbiol 2004; 10: 4519-23.
13. Perry JD, Rennison C, Butterworth LA, et al. Evaluation of *S. aureus* ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 12: 5695-8.
14. Safdar N, Narans L, Gordon B, et al. Comparison of culture screening methods for detection of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a prospective study comparing 32 methods. J Clin Microbiol 2003; 41: 3163-6.
15. Tiemersma EW, Bronzwaer S, Lyytikainen O, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* in Europe, 1999-2002. Emerging Infectious Diseases 2004; 10: 1627-34.

**Marco Arosio, Francesca Vailati**

USC Microbiologia e Virologia  
A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo  
Largo Barozzi, 1 - 24128 Bergamo  
Tel. 035 269012

E-mail:

[microbiologia@ospedaliriuniti.bergamo.it](mailto:microbiologia@ospedaliriuniti.bergamo.it)