

**Staphylococcus aureus y su identificación en los laboratorios microbiológicos.
Revisión bibliográfica**

**Staphylococcus aureus and its identification in microbiologic labs.
Bibliographical review**

**Dr. Oscar Hernández Betancourt; Lic. Yaidimi Ulloa Cuesta; Dr. Douglas del
Río Méndez; Tec. María del Carmen Galdós**

Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Centro de Inmunología y
Productos Biológicos CENIPBI. Camagüey, Cuba.

RESUMEN

Se realizó un compendio con más de 30 publicaciones que abordan las nuevas investigaciones sobre los principales elementos que intervienen en el mecanismo de infección y los métodos diagnósticos más utilizados para la detección del *Staphylococcus aureus* por parte de los laboratorios microbiológicos en el mundo y Cuba. Nuevas moléculas que contribuyeron al proceso infectivo del ente se encuentran en fase de estudio, para algunas de ellas se describió su papel en el mecanismo. El método más difundido en Cuba es el ensayo de la coagulasa en tubo. Se decidió informar los métodos más utilizados en el diagnóstico de esta entidad, incluyendo los más recientes, aún en fase de estudio y estandarización en algunos casos, así como brindar algunos de los elementos básicos o factores que intervienen en el mecanismo de infección.

DeCS: STAPHYLOCCUS AUREUS; LABORATORIOS; MICROBIOLOGÍA.

ABSTRACT

A compendium of more than 30 publications which covered new investigations about main elements that intervened in the mechanisms of infection was performed, and diagnostic methods more used for the detection *Staphylococcus aureus* in microbiologic labs in the world and Cuba. New molecules that contributed to the infective process are in the study phase, for some of them its role in the mechanism was described. The method more expanded in our country is the essay of coagulase in tube. It was decided to inform the methods most used in the diagnosis of this entity, including the most recent, even in study phase and standardization in some cases, as well as to give some of the basic elements or factors that participate in the infection mechanism.

DeCS: STAPHYLOCOCCUS AUREOUS; LABORATORIES; MICROBIOLOGY.

INTRODUCCIÓN

El *Staphylococcus aureus* es el causante de un gran número de infecciones graves como infecciones por heridas, septicemias, endocarditis y osteomielitis. El correcto diagnóstico de los gérmenes causantes de infecciones en pacientes, tanto hospitalizados como ambulatorios es importante al abordar el tratamiento adecuado para su eliminación. El cultivo de líquidos y secreciones corporales en los laboratorios microbiológicos permite el aislamiento de varias especies patógenas entre las que se encuentran los *S. aureus*, la cual constituye la especie de mayor importancia clínica humana dentro del género. ¹ Su crecimiento en medio sólido está caracterizado por colonias circulares de bordes lisos, de color gris a amarillo dorado intenso. En ocasiones se encuentra presente en la microbiota normal, en cambio en otros pacientes puede ser el agente etiológico de diversas enfermedades, fuera del hombre o animal, carecen de un hospedero significativo. En el primero, se encuentran principalmente en la nariz y las superficies cutáneas y su transmisión generalmente es por contacto persona a persona. ^{2, 3} La mayor incidencia de las infecciones se presentan en niños, principalmente neonatos y lactantes, ⁴⁻⁶ así como en pacientes

sometidos a intervenciones quirúrgicas, incrementándose el número de infecciones nosocomiales.⁷⁻¹⁰

Se decide realizar un estudio que permita mencionar los métodos que se utilizan en la actualidad para el diagnóstico del *S. aureus*, y buscar la información necesaria para evaluar la eficiencia del método tradicional (prueba de la coagulasa en tubo) empleado en Cuba, con la finalidad de mejorar la atención al paciente en los laboratorios microbiológicos de las entidades de la red hospitalaria de la región Centro- Oriental de Cuba, con investigaciones que se llevan a cabo en el laboratorio.

DESARROLLO

Estafilocoagulasa y algunos factores que intervienen en el mecanismo de infección

El *S. aureus* coagula el plasma descalcificado debido a la producción de una enzima conocida por estafilocoagulasa que actúa como un agente activo en la coagulación capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina. Existe una correlación positiva entre la presencia de la misma y la virulencia del patógeno en humanos.^{11, 12}

La enzima se encuentra presente en dos formas.³

- **Coagulasa libre:** Es una proteína extracelular, que se encuentra presente en los filtrados de cultivos, la misma reacciona con el factor reactivo de la coagulasa (FRC) presente en el plasma, para formar una sustancia similar a la trombina (estafilotrombina), actúa indirectamente en la conversión del fibrinógeno en fibrina.

- **Coagulasa ligada:** La coagulasa ligada o factor de aglutinación no está presente en filtrado de cultivos. Convierte el fibrinógeno en fibrina insoluble de forma directa sin intervención de los factores plasmáticos.

La función de la coagulasa *in vivo* no ha sido todavía aclarada y aún queda en el campo especulativo, aunque está bien esclarecido, que esta enzima está implicada en el desarrollo de los abscesos, mediante la formación de una capa de fibrina alrededor de la lesión, lo que impide la localización y fagocitosis del agente patógeno.²

Se identificaron otros factores que intervienen en la patogenesis del mismo mediante el mecanismo de la coagulación. La expresión de estos factores empleando

las técnicas de recombinación genética en microorganismos poco patógenos como *Lactococcus lactis*, permitió conocer que los mismos se encuentran directamente asociados a su patogenicidad.^{13, 14}

Entre los mas estudiados aparecen:

Proteína A de unión a la fibronectina (fnbA): tiene afinidad por el receptor de las inmunoglobulinas con lo que evita de modo eficaz la eliminación inmunológica mediada por anticuerpos, jugando un papel importante en las infecciones endovasculares, incrementa la adherencia del *S. aureus* a los ligandos específicos y por consiguiente la liberación de toxinas que causan la patología.^{15, 16}

Factor de unión celular A (clfA): Conocida como coagulasa ligada, se encuentra en la superficie externa de los *S. aureus*. El 95 % de las cepas contiene este factor, lo que permite diferenciarlos de otras especies del género. Este factor está estrechamente ligado a infecciones como la endocarditis.¹⁷⁻¹⁹

Factor de unión al fibrinógeno extracelular (Efb): Es secretado por el germen, se une a la cadena de fibrinógeno de forma divalente,²⁰ esta proteína, junto a otras, median la adherencia con las proteínas del tejido hospedero como: fibrinogeno/fibrina, vitronectina, fibronectina, y el colágeno. Recientemente se identificó un Efb que interfiere con las plaquetas,²¹ no obstante, debe señalarse que esta proteína aún no está bien caracterizada en los *Staphylococcus* provenientes de aislamientos clínicos.²²

Otras: Proteína de adhesión extracelular (Eap) y proteína de unión a la proteína de la matriz extracelular (Emp), estas proteínas al igual que las otras median el proceso de adherencia, en el caso de la Eap (60KDa), se plantea que está estrechamente ligada a la internalización de la bacteria a la célula.^{21, 23}

Además de la moléculas antes mencionadas, los *S. aureus* producen un gran número de antígenos solubles, entre los que se encuentran otras enzimas como la *catalasa*, *β -lactamasa*, y antígenos anclados a la membrana, que incluyen entre otras, toxinas como las enterotoxinas (ocho tipos), citotoxinas (cinco tipos), citoxinas exfoliativa (dos tipos) y la toxina de choque tóxico. Estos metabolitos son la causa principal de las infecciones postquirúrgicas de heridas, implantación de marcapasos, sitios de desviaciones arteriovenosas externos para hemodiálisis, síndrome del shock tóxico y en el envenenamiento por comidas.³

Ensayos realizados para la determinación de la coagulasa

A continuación se mencionan los métodos más empleados en los laboratorios microbiológicos para el diagnóstico del *S. aureus*.

a) Prueba de la coagulasa en tubo

Constituye la principal prueba que se realiza en los laboratorios microbiológicos para la identificación de este germen. Es capaz de detectar ambas coagulasas. Se realiza directamente de una colonia obtenida en la placa de aislamiento, pero es mejor utilizar un crecimiento de 18-24 h en medio líquido enriquecido como la infusión de cerebro-corazón (BHI). La determinación se evidencia mediante la aparición de un coágulo en el substrato empleado para la identificación, que consiste en plasma animal o humano.
2, 11

b) Prueba de la coagulasa en lámina

Se utiliza para determinar la coagulasa ligada. Constituye una forma rápida de identificación del *S. aureus*, aunque es solo presuntiva, deben verificarse mediante la prueba en tubo todos aquellos cultivos que den resultados negativos o positivos tardíos, ya que algunas cepas no producen factor de aglutinación. No es recomendable realizar el ensayo de la coagulasa de *S. aureus* en lámina, pues a pesar de ser más rápida y económica, presenta los siguientes inconvenientes: ²⁴

- Entre un 10 y un 15 % de las cepas de *S. aureus* pueden dar un resultado falso negativo.
- Las reacciones deben leerse rápidamente porque aparecen resultados falsos positivos si los tiempos de incubación exceden los 10 s.
- Las cepas en estudio no deben provenir de medios que contengan altas concentraciones de sal (agar-manitol salado) porque se presentan reacciones de autoaglutinación.

c) Ensayo de la termonucleasa (desoxiribonucleasa termoestable estafilocócica):

El ensayo se realizó por primera vez en la década de lo 80. Shanholtzer y Peterson, probaron su factibilidad en la determinación de cepas de *S. aureus* cuando lo compararon con otros tres métodos en 189 aislamientos clínicos. Los autores no encontraron diferencias significativas entre este método y el ensayo en tubo. ²⁵ Este método es simple, económico, rápido y brinda resultados fáciles de interpretar, está basado en una fosfodiesterasa con propiedades endo y exonucleasas capaces de cortar tanto el ADN como el ARN. ²⁶ Esta prueba no sustituye la prueba de la coagulasa en

tubo, pero se recomienda que las reacciones de coagulasa 2+ (pequeños coágulos organizados) sean confirmadas por una prueba de termonucleasa antes de considerar *S. aureus* a los microorganismos investigados.²⁷⁻²⁹

d) Ensayo de aglutinación en látex:

Existen varios juegos comercializados a base de látex como soportes sólidos, los cuales también surgieron en la década del 80 y muestran que son métodos rápidos y prácticos para la identificación del *S. Aureus*.^{27, 28} No obstante, se han observado falsos positivos en el uso de alguno de éstos, lo que conlleva a la determinación de otras características típicas de la especie para diferenciarla.²⁹ Estudios recientes plantean que este método presenta una alta sensibilidad y especificidad, y permite además la detección de otras especies de estafilococos coagulasa positiva (*S.intermedius* y *S. lycus*)³⁰ aunque no permite distinguir entre éstas.

e) Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA):

Estos métodos han revolucionado el diagnóstico clínico y microbiológico en los países desarrollados, el mismo se basa en el reconocimiento inmunológico de algunos antígenos o factores presentes en el agente patógeno. Los primeros ELISAS destinados al reconocimiento de antígenos específicos del *S. aureus* surgieron a principio de los años 80. Varias son las moléculas seleccionadas para tales fines, entre las que se encuentran: peptidoglicanos, ácido teicoico, α -toxinas, lipasas, y polisacaridos capsulares.³¹⁻³³ El uso de algunas de estas moléculas permitió diferenciar entre pacientes con endocarditis por *S. aureus* e individuos sanos (controles negativos).³⁴

Años más tarde se diseñaron experimentos encaminados a estudiar y estandarizar un ELISA que empleó anticuerpos monoclonales (AcMs) dirigidos a reconocer los títulos de anticuerpos levantados contra la proteína A de unión al fibrinógeno celular, extracelular (Efb), y al factor de unión o clumping factor (Clf), en suero de pacientes con septicemia.¹⁸ Los estudios realizados con individuos sanos mostraron niveles variables de anticuerpos levantados contra los antígenos estudiados, no se observó correlación entre los niveles de anticuerpos para Clf y Efb, aunque para este último se evidenció su presencia en la fase tardía de la enfermedad. Se experimentó la producción *in vivo* de la proteína A de unión a la fibronectina del *S. aureus*, así como se evidenció el posible papel diagnóstico de los anticuerpos generados contra estas proteínas. Matsuka et al,³⁵ realizaron estudios que mostraron los diferentes grados de interacción que presenta la proteína A de unión a la fibronectina (recombinante), con el fibrinógeno, fibronectina y la fibrina. Recientemente se publicó una investigación que demuestra el

empleo de las enterotoxinas A y B para el montaje del ELISA, ³⁶ no obstante, los resultados obtenidos con estos métodos inmunológicos, no han sido conclusivos debido a la presencia de anticuerpos específicos para estas toxinas en la mayoría de los sueros de pacientes normales.

f) Identificación mediante medios de cultivos:

Tradicionalmente los *Staphylococcus* son identificados presuntivamente antes de tener una caracterización definitiva en medios de cultivos no específicos como el agar sangre. En 1994 se probó un nuevo método para la identificación del *S. aureus*, basado en la detección fluorogénica de la coagulasa mediante la incorporación en el medio de cultivo de substratos cromogénicos para la *fosfatasa alcalina* y la *B-galactosidasa*. ³⁷ El RAPIDEC-Staph como se le denominó se evaluó con 303 cepas de *Staphylococcus*. La comparación con varios métodos convencionales evidenció el reconocimiento del 100 % de las cepas *S. Aureus*, se observó que la especificidad y sensibilidad del método varió en relación de la especie a identificar. Recientemente Gaillot y et al, ³⁸ ensayaron un método cromogénico altamente específico para la identificación de *S. aureus* basados en la formación de colonias malvas posterior a las 18 h de incubación. El método presenta una excelente sensibilidad y especificidad, superiores a otros métodos convencionales y permite el recobrado o aislamiento de muestras clínicas que no fueron detectadas en el medio agar sangre.

Se mencionaron seis métodos donde se expusieron algunas ventajas e inconvenientes que presentan estos. Un aspecto no analizado en la literatura revisada, fue el alto costo de estas técnicas en el mercado internacional, que impide o dificulta la generalización de los mismos en países subdesarrollados, estos tuvieron que valerse de las técnicas más simples pero no menos útiles, establecidas hace varias décadas y que se mantienen vigentes por los buenos resultados que con ellas se obtienen.

Los países con recursos disponibles para las investigaciones destinadas al diagnóstico del *S. aureus*, incorporan técnicas de avanzadas descritas en esta revisión, donde los mejores resultados se lograron con medios de cultivos que incluyen substratos cromogénicos, que permitieron obtener índices de especificidad y sensibilidad elevados.

CONCLUSIONES

1. La mayor incidencia del *S. aureus*, se presentó en infantes, fundamentalmente en neonatos y lactantes, así como en pacientes intervenidos quirúrgicamente.
2. La prueba de la coagulasa en tubo es la técnica mas extendida y establecida en Cuba, mostró resultados que varían en cuanto a los índices de positividad obtenidos, en dependencia del plasma empleado, lo cual generó nuevas investigaciones por parte de nuestro grupo.
3. Los ELISAS no se encontraron bien establecidos para el diagnóstico *in vitro* de esta enfermedad. Pocos laboratorios emplearon la presencia de antígenos específicos del *S. aureus* para tales fines, por no existir una molécula que brinde una especificidad adecuada que permita obtener resultados altamente confiables y un sistema correctamente estandarizado.
4. Los mejores resultados obtenidos en el diagnóstico de esta enfermedad se obtuvieron con los métodos basados en medios de cultivos con substratos cromogénicos incorporados, que mostraron altos índices de especificidad y sensibilidad comparado con los restantes métodos aquí mencionados para el diagnóstico *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rojas N, Fernández N, Espino M, Fernández M. Patrones de drogorresistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico humano. Rev Cubana Med Trop. 2001;53(1):53-8.
2. Llop A, Valdez-Dapena M, Zuazo J. Microbiología y parasitología médica. TI. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001.
3. Murray P, Kobayashi G, Pfaller M, Rossenthal K. Microbiología Médica. 2ed. España: Ed. Harcourt Brace; 1999.
4. Espino M, Couto MJ, Lee M, Páez N, Meriño E. Efecto sinérgico de penicilina Gy Kanamicina en septicemia neonatal por estafilococo. Rev Cubana Pediatr. 1998;67(3):45-7.
5. Floret D. Syndrome de Kawasaki:maladie toxinique?. Med Mal Infect. 1998;285:564-7.
6. Floret D, Gillet Y, Lina G. Les problemes actuels posés par les stapylocoques en pédiatrie. Le point sur. 2001;30(37):1836-43.

7. Escarpanter JC, Cruz PM, Alfonso D. Sepsis nosocomial en ortopedia. Estudio de un año. Rev Cubana Ortop Traumatol. 1996;10(1):26-9.
8. Cabrera JL, Hernández A, González P, Durán C. Infección protésica en los servicios de cirugía vascular. Rev Cubana Angiol de Cir Vasc. 2001;2(1):5-9.
9. Eiff, C, Proctor R, Peters G. Phathogens have major role in nosocomial infections. Postgrad Med. 2001;10(4):63-76.
10. Cordero DM, García AL, Barreal RT, Jiménez J, Rojas N. Comportamiento de la infección nosocomial en las unidades de terapia en un periodo de 5 años. Rev Cubana Higiene y Epidemiol. 2002;40(2):79-88.
11. Mac Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Baltimore: Editorial Williamsand Willains; 1985.
12. Ayres I. Device and procedure for identifying pathogenic microorganisms. United State. 1995;5:380-652.
13. Lowe AM, Bealtie DT, Deresewiccs RL. Identification of novel staphylococcal virulence genes by in vivo expression technology. Mol Microbiol. 1998;27:967-76.
14. Que YA, Haefliger JA, Franciulli P, Moreillon P. Expression of *Stapylococcus aureus* Clumping Factor in *Lactococcus lactis* subsp cremoris using a new shutle vector. Inf Immunity. 2000;68(6):3516-22.
15. Greene C, McDevitt D, Vaudaux PE, Lew DP, y Foster TJ. Adhesion properties of mutants of *Stapylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of fnb genes. Mol Microbiol. 1995;17:1143-152.
16. 16-Flock JI, Heidmdahl SA, y Schennings T. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 1996;64:1876-79.
17. MacDevitt DP, Francois P, VaudauxE y Foster TJ. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Stapylococcus aureus*. Mol Microbiol. 1994;11:237-248.
18. Colque-Navarro P, Palma M, Soderquist B, Flock JI, Mollby R. Antibody response in patientswith staphylococcal septicemia against two *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins: clumping factor and an extracellular fibrinogen binding protein. Clin Diag Lab Immunolgy. 2000;7(1):14-20.
19. Que YA, Haefliger JA, Franciulli P, Moreillon P. Reassening the role of *Stapylococcus aureus* clumping factor and Fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. Infection and Immunity. 2001;69(10):6296-6302.

20. Palma M, Wade D, Flock M, Flock J. Multiple Binding Sites in the Interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* and fibrinogen. J Biol Chem. 1998;273(21):13177-81.
21. Palma, M, Shannon, Quezada H, Berg A, Flock J. Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks platelet aggregation. J Biol Chem. 2001;276:31691.
22. Hussain M, Becker K, von Eiff C, Peters G, Herrmann M. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Clinical and Diagnostic Lab Immunol. 2001;8(6):1271-6.
23. Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M. Identification and characterization of a novel 38.5-Kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. J Bacteriol. 2001;183(23):6778-6.
24. Castillo A, Pajuelo Y. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria en fórmulas de nutrición parenteral usadas en dos hospitales de la ciudad de Lima. Rev Cubana Ortop Traumatol. 1996;10(1):26-9.
25. Shanholtzer CJ y Peterson LR. Clinical laboratory evaluation of termonuclease test. An J Clin Pathol. 1982;77(5):587-91.
26. Muriana PM. *Staphylococcus aureus*: foodborne illness. J Bacteriol. 2003;183(23):6778-6.
27. Perssone P, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Brun X, Etenne J. Comparative performance of six agglutination kit assessed by using typical and atypical strains of *S. aureus*. J Clin Microb. 1997;35:1138-40.
28. Wilkerson M, McAllister S, Miller JM, Heiter BJ, y Bourbeau PP. Comparison of five agglutination test for identification of *Stapylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1997;35:148-51.
29. Emmerling P, Schulze H, Lohneiss MT. Evaluation of a new latex agglutination test for identification of *Staphylococcus aureus*. Zentralbl Bakteriol Mikr. 1983;253(4):462-65.
30. Quinn NE. Clinical veterinary microbiology. London. Wolfe 1994;730:118-26.
31. Weste TE, Cantey JR, Apicella MA, Burdash NM. Detection of anti-teichoic acid immunoglobulin G antibodies in experimental *Staphylococcus epidermidis* endocarditis. Infect Immun. 1983;42(3):1020-6.
32. Christensson B, Espersen F, Hedström SA, Kronvall G. Methodological aspects of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan serology: comparisons between solid-phase

radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 1984;19(5):680-6.

33. Ryding U, Espersen F, Soderquist B, Christensson B. Evaluation of seven different enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002;42(1):9-15.

34. West TE, Cantey JR, Burdash NM, Apicella MA. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G and M antibodies to teichoic acid in intravascular staphylococcal disease. Eur J Clin Microbiol. 1985;4(3):286-90.

35. Matsuka YV, Anderson ET, Milner-Fish T, Ooi P, Baker S. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein serves as a substrate for coagulation factor XIIIa: evidence for factor XIIIa-catalyzed covalent cross-linking to fibronectin and fibrin. Biochemistry. 2003;42(49):14643-52.

36. Poli MA, Rivera VR, Neal D. Sensitive and specific colorimetric ELISAS for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer. Toxicon. 2002;40(12):1723-6.

37. Janda WM, Ristow K, Novak D. Evaluation of Rapidec staph for identification of *S. aureus*, *S. epidermitis* and *S. saprophyticus*. J Clin Microbiol. 1994;32(9):2056-59.

38. Gaillot O, Wetsh M, Fortineau N, Berche P. Evaluation of Chromagar Staph. aureus, a new medium, for isolation and presuntive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. J Clin Microbiol. 2000;38(4):1587-591.

Recibido: 12 de abril de 2004.

Aceptado: 8 de noviembre de 2004.

Dr. Oscar Hernández Betancourt. Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador Auxiliar. Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Centro de Inmunología y Productos Biológicos CENIPBI. Camagüey, Cuba. oscar@finlay.cmw.sld.cu