

Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología

STAPHYLOCOCCUS E INFECCIÓN NOSOCOMIAL

Dra. Raquel de los A. Junco Díaz,¹ Dra. María Luisa Marrero² y Téc. César Lara Ortiz³

RESUMEN

Fue estudiado un total de 366 cepas de *Staphylococcus* aisladas de pacientes con infecciones intrahospitalarias en el período 1991-1994 procedentes de diferentes hospitales del país. De ellas 303 cepas fueron identificadas como *staphylococcus aureus*, las cuales fueron caracterizadas mediante el empleo de los siguientes marcadores epidemiológicos: fagotipia, antibiología y determinación de la producción de enterotoxinas (A, B, C₂, D y E). Los fagotipos que se encontraron con mayor frecuencia fueron 47,85 (13,80 %) y 53,54 (10,87 %); un total de 64 cepas resultaron no tipables a la dilución de trabajo de rutina (RTD) y utilizando una dilución de fagos 100 veces más concentrada, es decir 100 x RTD. La antibiología reveló que el patrón de resistencia más frecuente fue -A-P- (Ampicilina-Penicilina) con 37 cepas, estando presentes estos 2 antibióticos en el 97,7 % de las cepas estudiadas. La determinación de la producción de enterotoxinas A, B, C₂, D y E mostró que el 30,0 % de las cepas resultaron enterotoxigénicas, predominando las cepas productoras de enterotoxina E (14,0 %). Se encontró asociación entre las cepas enterotoxigénicas y las pertenecientes al grupo fágico III y fagotipo 94,96. No se encontró asociación entre los patrones de resistencia y los fagotipos identificados, lo cual se explica por el pequeño número de cepas estudiadas por cada hospital. Se identificaron 63 cepas como estafilococos coagulasa negativos los que correspondieron a *Staphylococcus epidermidis*, de los cuales 50 (79,36 %) resultaron ser productores de slime.

Descriptores DeCS: STAPHYLOCOCCUS/aislamiento & purificación; STAPHYLOCOCCUS AUREUS/aislamiento & purificación; INFECCION HOSPITALARIA.

Staphylococcus aureus ha demostrado ser un patógeno notablemente versátil capaz de producir una variedad de infecciones mucho más amplia que la mayoría de las bacterias.¹

El incremento en la importancia de estafilococos coagulasa negativos como agentes de infecciones nosocomiales ha

estimulado el desarrollo de nuevos sistemas capaces de identificar rápidamente esos organismos hasta el nivel de especies. Esos sistemas de identificación facilitarán investigaciones futuras de estafilococos de significado patogénico raro o indeterminado, los cuales pueden jugar un rol predominante en infecciones sobre prótesis o

¹ Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Auxiliar. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM).

² Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Agregada. INHEM.

³ Técnico en Microbiología. Instituto Nacional de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA).

catéteres vasculares tanto en hospederos inmunocomprometidos como inmunocompetentes.²

El propósito de este estudio fue la caracterización de *Staphylococcus* como agente causal frecuente en infecciones nosocomiales y de esta forma contribuir a perfeccionar la vigilancia y control de éstas.

MÉTODOS

Se recibieron 366 cepas con diagnóstico presuntivo de *Staphylococcus* aisladas en pacientes notificados de infección intrahospitalaria en hospitales de Ciudad de La Habana, Santiago de Cuba, Guantánamo y Matanzas en el período comprendido de 1991-1994.

La prueba de la coagulasa se realizó mediante la técnica de aglutinación en lámina,³ empleando el reactivo LATEX-STAF producido por la Empresa de Productos Biológicos "Carlos J. Finlay".

La prueba de la nucleasa termoestable se llevó a cabo con el empleo de la técnica recomendada por *Lachica* y otros.⁴

La fagotipia se llevó a cabo siguiendo la técnica de Blair y Williams,⁵ utilizando 22 (con excepción del fago 95) de los 23 fagos que componen el Juego Internacional; la antibiología se determinó mediante la técnica estandarizada de difusión de Bauer y Kirby⁶ recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se agruparon las cepas con resistencia a un antimicrobiano o más atendiendo a los diferentes bloques de resistencia con el fin de tiparlas.

La determinación de la producción de enterotoxinas (A, B, C₂, D y E) sólo se investigó en 200 cepas de *S. aureus* debido a la poca disponibilidad de reactivos, las cuales fueron seleccionadas al azar. Ésta se realizó utilizando el método de celofán sobre agar de *Hallander*⁷ modificado por *Jarvis y Lawrence*.⁸ Para detectar la producción de enterotoxinas se empleó el método de doble inmunodifusión radial de

Ouchterlony⁹. Los sueros antienterotoxinas específicas se produjeron en el Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Como controles positivos se utilizaron sobrenadantes de cultivos de las cepas de referencia suministradas por *M. S. Bergdoll*.

A las cepas que resultaron ser coagulasa y termonucleasa negativas se les aplicó el esquema simplificado de Kloos y Schleifer.¹⁰ Se aplicó la prueba de Slime^{11,12} a las cepas de *S. epidermidis* identificadas.

RESULTADOS

De las 366 cepas recibidas con diagnóstico presuntivo de *Staphylococcus*, fueron clasificadas 303 cepas como *S. aureus* y 63 cepas como estafilococos coagulasa negativos.

La tabla 1 demuestra el predominio del fagotipo 47,85, seguido del fagotipo 53,54. Es importante destacar que se logró tipar 239 cepas, permaneciendo sin tipar a la dilución de rutina de trabajo (RTD) y utilizando una dilución de fagos 100 veces más concentrada, es decir al 100 x RTD un total de 64 cepas.

TABLA 1. Fagotipos más frecuentemente encontrados en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. INHEM, 1991-1994

No. de cepas tipables	Fagotipos más frecuentes	Otros fagotipos		
		%	NT	NT
239	(33) 47,85	13,80	90	64
	(26) 53,54	10,87		
	(23) 94,96	9,62		
	(13) 36,55	5,43		
	(13) 55,71	5,43		
	(12) 42E,47	5,02		
	(12) 3A, 71	5,02		
	(10) 29,52	4,18		
	(7) 29,52,52A,79,80	2,92		

(): No. de cepas que presentan ese fagotipo.

NT: No tipables.

Fuente: Registro del Laboratorio de Referencia de Estafilococos. INHEM, 1991-1994.

En la tabla 2 se aprecia que el 30,0 % de las cepas fueron productoras de enterotoxinas, con predominio de la enterotoxina E. El 7,0 % de las cepas produjeron más de un tipo de enterotoxina, predominando las cepas productoras de enterotoxina E + C₂ (8 cepas).

TABLA 2. Producción de enterotoxinas A, B, C₂, D y E en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. INHEM, 1991-1994

Tipo de enterotoxina	Positivas	%
A	3	1,5
B	10	5,0
C ₂	5	2,5
D	-	-
E	28	14,0
Mixtas	14	7,0
Total	60	30,0

Fuente: Registro del Laboratorio de Referencia de Estafilococos. INHEM, 1991-1994.

TABLA 3. Antibiotipia en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. INHEM, 1991-1994

Patrón de resistencia	No. de cepas
-A-P	37
-A-P-Ox	17
-A-P-Ox-Sef	14
-A-P-T	14
-A-P-Sef	11
K-A-P-E	10
-A-P-Ce	10
-A-P-E	10
K-A-P-E-T-Ce-S-Cl	6
-A-P-E-T	6
K-A-P-E-Cl	5
K-A-P-T	5
K-A-P	5
Otros	149
Total	299

Antimicrobianos utilizados: kanamicina (K), ampicilina (A), oxacilina (Ox), seftazidín (Sef), tetraciclina (T), eritromicina (E), ceprán (Ce), estreptomina (S), cloranfenicol (Cl), penicilina (P).

Fuente: Registro del Laboratorio de Referencia de Resistencia Antimicrobiana. INHEM, 1991-1994.

En la tabla 3 se observa que el patrón de resistencia más frecuente fue -A-P- estando presentes estos dos antibióticos en el 97,7 % de las cepas estudiadas. Otros patrones b-lactámicos como -A-P-Ox, -A-P-Ce, -A-P-Ox-Sefy -A-P-Sef fueron detectados con relativa frecuencia.

Sólo fue posible establecer relación entre la fagotipia y la producción de enterotoxinas A, B y C₂ en las cepas de *S. aureus* y como se muestra en la tabla 4 se encontró asociación entre las cepas enterotoxigénicas y las pertenecientes al grupo fágico III y fagotipo 94, 96 predominantemente.

TABLA 4. Relación entre la fagotipia y la producción de enterotoxinas A, B y C₂ en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. INHEM, 1991-1994

Enterotoxina	Fagogrupos				No. tipable	
	I	II	III	94/96	100 RTD	Total
Tipo A	-	1	3	-	-	4
Tipo B	1	1	2	2	1	7
Tipo C ₂	-	-	2	3	-	5

Fuente: Registro del Laboratorio de Referencia de Estafilococos. INHEM, 1991-1994.

Al aplicar el esquema de Kloos y Schleifer a las 63 cepas de estafilococos coagulasa negativos se obtuvo que el 100,0 % se identificaron como *S. epidermidis* y al realizarle la prueba de Slime, 50 cepas resultaron positivas para un 79,36 %.

DISCUSIÓN

Al aplicar la fagotipia a las cepas de *S. aureus* identificadas se obtuvo que los resultados obtenidos no coinciden con lo expresado por otros investigadores^{13,14} en cuanto a los fagotipos más frecuentemente

encontrados, lo cual puede atribuirse a variaciones según la procedencia de las cepas y a la utilización de fagos experimentales no empleados en este estudio. Diferentes métodos de tipaje han sido empleados para estudiar las cepas de *S. aureus* no tipables.¹⁴ En nuestro estudio sólo fue posible la aplicación de los fagos en una dilución más concentrada (100xRTD) debido a dificultades materiales que no permitieron el montaje de otros métodos. No obstante, al aplicar este método se obtuvo el 49,60 % de tipabilidad adicional.

Debe señalarse en general que aunque se encontró coincidencia lógica entre los patrones de resistencia y algunos marcadores frecuentes en *S. aureus*, como termonucleasa y hemolisina, no sucedió así con el fagotipo que se considera como uno de los marcadores que asociados a la resistotipia sí conforman un conjunto de interés para la búsqueda de cepas epidémicas dentro de los servicios hospitala-

rios. Por las características generales del estudio no puede arribarse a conclusiones particulares, pero sí nos permite referir la existencia de grandes bloques de multi-resistencia que existen en cepas de las diferentes unidades, factor de gran importancia para la promoción de estudios de tipaje por hospitales y servicios, elemento fundamental para el control de la resistencia a los antibióticos.

La comparación de la producción de enterotoxinas y el fagotipaje confirmó lo que ha sido establecido por diferentes autores¹⁵⁻¹⁷ en cuanto al predominio de cepas enterotoxigénicas entre las cepas pertenecientes al fagogrupo III. No se encontró asociación entre los patrones de resistencia y los fagotipos identificados, por el pequeño número de cepas estudiadas en cada hospital.

Los resultados obtenidos permiten establecer una vigilancia microbiológica sobre la circulación de *Staphylococcus* en infecciones nosocomiales.

SUMMARY

We studied a total of 366 strains of *Staphylococcus* isolated from patients with in-hospital infections from various hospitals throughout the country in 1991-1994 period. Of these, 303 strains were identified as *Staphylococcus aureus* which were characterized using the following epidemiologic markers: phage typing, antibiotic typing and determination of enterotoxin production (A, B, C₂, D and E). The most frequent phago types were 47,85 (13,80 %) and 53,54 (10,87 %). 64 strains resulted non-typable in a routine testing dilution (RTD) so, a one-hundred time more concentrated phago dilution, i. e. 100 x RTD. Was used. Antibiotic typing revealed that the most frequent pattern of resistance was A-P (ampicilline- penicilline) with 37 strains and these two antimicrobial agents were present in 97,7 % of studied strains. The determination of production of enterotoxins A, B, C₂, D and E disclosed that 30 % of strains were enterotoxigenic in which enterotoxin E-producing strains (14 %) predominated. There was an association of enterotoxigenic strains with those stains of phage group III and phage type 94,96. No relationship was found between the patterns of resistance and the identified phage types, which is explained by the small number of strains studied in each hospital. Sixty-three strains were identified as coagulase-negative staphylococci which corresponded to *Staphylococci* epidemidis. Fifty of them (79,36 %) were slime producers.

Subject headings: STAPHYLOCOCCUS/ isolation and purification; STAPHYLOCOCCUS AUREUS/ isolation & purification; CROSS INFECTION.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eykyn SJ. Sepsis estafilocócica. Cambio de patrón de la enfermedad y su tratamiento. *Lancet* (ed Esp.) 1988;12(5):316-20.
2. Torres DG, Ferraro G, Fiori GP, Martegani R, Speranza F, Tambini R, et al. Ventriculoatrial shunt infection caused by *Staphylococcus warneri*: case report and review. *Clin Infect Dis* 1992;14:49-52.
3. Doern GV. Evaluation of a commercial latex agglutination test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1982;15(3):416-8.

4. Lachica RVF, Genegeorgis C, Hoepflich PD. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl Microbiol* 1971;21:585-7.
5. Blair JE, Williams RE. Phage typing of staphylococci. *Bull World Health Organ* 1961;24:771-84.
6. Bauer AW, Kirby WM. Antibiotic susceptibility testing by a standardized method. *Am J Clin Pathol* 1966;45:453-6.
7. Hallander HO. Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solid media. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;63:299-305.
8. Jarvis AW, Lawrence RC. Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. *Appl Microbiol* 1970;19:698-9.
9. Ouchterlony O. Handbook in immunodiffusion and immunoelectrophoresis. 5ta ed. Arbor Humphrey Science, London, England, 1971.
10. Kloos WE, Schleifer Karl H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus species*. *J Clin Microbiol* 1975;11:82-8.
11. Christensen, GD, Parisi JT, Bisno AL, Simpson WA, Beachey EH. Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1983;18:258-69.
12. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immunol* 1982;37:318-26.
13. Martin-Bourgon C, Otero Pastor MR, Casal Lombos J. Fagotipia de *Staphylococcus aureus*: análisis de resultados (mayo 1978-mayo 1980). *Immunologica*, 1981,2:14-23.
14. Vindel A, Martin-Bourgon C, Saez-Nieto JA. Characterization of non-typable strains of *Staphylococcus aureus* from cases of hospital infection. *Epidemiol Infect* 1987;99:191-200.
15. Hallander HO, Korlof B. Enterotoxin producing staphylococci. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1967;71:359-75.
16. Lindbom G, Gaurell G. Studies on the epidemiology of staphylococcal infections. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 1967;69:246-55.
17. Osváth-Martón A, Domján J. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* strains in Hungary. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1974;18:289-92.

Recibido: 19 de mayo de 1997. Aprobado: 22 de marzo de 1999.

Dra. *Raquel de los A. Junco Díaz*. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Infanta No. 1158 e/ Llinás y Clavel. Ciudad de La Habana.