

EXPERIENCIA Y RESULTADOS



UTILIZACION DE UNA TECNICA DE AGLUTINACION AL LATEX (FINLATEX-STAPH) PARA LA IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURI"

Lic. Isis Tamargo Martínez,* Dr. José A. Valdivia,** Dra. Lidia Albert*** y Dra. Alina Lera Marqués****

RESUMEN

Se compara una forma rápida de identificar cultivos de *Staphylococcus aureus* con la utilización de la técnica de aglutinación al látex y algunas de las técnicas utilizadas tradicionalmente para la clasificación de dichos cultivos. Se clasificaron mediante las técnicas tradicionales 90 cepas como *Staphylococcus aureus* y 10 como no *Staphylococcus aureus*. La técnica de aglutinación al látex identificó correctamente 86 de las cepas identificadas inicialmente como *Staphylococcus aureus* por lo que se considera una prueba rápida y sensible.

INTRODUCCION

Tradicionalmente la prueba de la coagulasa en tubo ha sido utilizada como el método de referencia para la identificación de *Staphylococcus aureus*. No obstante han sido reportadas numerosas limitaciones de este método: el tipo de plasma utilizado, el tiempo de incubación, la formación

* Licenciado en Microbiología. Investigador Aspirante. Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".

** Doctor en Ciencias. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular. Lab. Nac. Ref. Micobacterias y Th. del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".

*** Especialista de II Grado en Microbiología. Profesor del ISCM.

**** Especialista de I Grado en Microbiología. Laboratorio de Microbiología. Hospital Pediátrico "Pedro Borrás Astorga".

de coágulo,^{1,2} así como los falsos positivos y negativos causantes de errores.

A causa de estas desventajas se han propuesto numerosas pruebas y esquemas de identificación de relativa facilidad de ejecución: producción de DNasa,^{3,4} crecimiento y tipo de crecimiento en medio semisólido con tioglicolato,⁵ fermentación del manitol,⁶ producción de nucleasa termoestable,⁷ susceptibilidad a la lisis por lisostafina,⁸ producción de ácido a partir de glicerol en un medio con eritromicina,⁹ crecimiento en medio con nitrofurantoina,¹⁰ actividad bacteriolítica,¹¹ etcétera.

Recientemente se han reportado métodos más rápidos para la identificación de *Staphylococcus aureus*, entre los que se encuentran: pruebas de hemaglutinación para la detección del factor cumpling,¹² así como aglutinación al látex para la detección del factor cumpling y la proteína A.^{13,14} La principal ventaja de estos métodos es que permite la identificación del microorganismo a los pocos minutos de haber obtenido el cultivo primario, además de tener una sensibilidad en muchos casos superior que los que se utilizan tradicionalmente.

El diagnóstico rápido de *Staphylococcus aureus* resulta de gran interés, así como su diferenciación con las demás especies del género, pues constituye un agente causal de numerosas afecciones en el hombre.

Los objetivos de nuestro trabajo consistieron en comparar algunas de las diferentes pruebas que se realizan hasta el momento para el diagnóstico de *Staphylococcus aureus* con el Finlatex-Staph, reactivo para la aglutinación al látex producido en nuestro país.

MATERIAL Y METODO

MUESTRAS

Se estudiaron 100 cepas de cocos grampositivos, catalasa positivos aislados de niños con infección respiratoria aguda bacteriana del Hospital Pediátrico "Pedro Borrás", en el periodo comprendido entre enero y mayo de 1986.

Cepas controles. Como control para cada prueba se utilizó la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 12 598 Cowan serotipo I) y la cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12 228.

METODOS

Prueba de la fosfatasa.¹⁵ La prueba se realizó según el método recomendado por Stevens.

Prueba de la coagulasa en tubo. Se llevó a cabo la técnica descrita por Loeb en 1903¹⁶ con la única variación de que cada prueba se realizó a 2 temperaturas (37 °C y temperatura ambiente).

Producción de DNasa: La detección de DNasa se realizó según Martín y Ewing.¹⁷

Crecimiento y tipo de crecimiento en medio semisólido con tioglicolato: La prueba se realizó según lo recomendado por Evans y Kloos en 1982.¹⁸

Producción de ácido a partir de hidratos de carbono y resistencia a la novobiocina. Ambas técnicas se realizaron según Kloos W.E. y Shleifer, K.H. en 1975.¹⁹

Aglutinación al látex Finlatex-Staph. Se utilizaron para la prueba partículas de látex sensibilizadas con fibrinógeno e IgG purificadas producidas en Cuba, por la Empresa de Productos Biológicos "Carlos J. Finlay". La prueba se realizó según las instrucciones del fabricante.²⁰

RESULTADOS

La prueba de la coagulasa en tubo y la DNasa fueron tomadas como pruebas de referencia en nuestro trabajo porque son consideradas por muchos autores como técnicas altamente sensibles,²¹⁻²³ además consideramos que son técnicas disponibles en los laboratorios de la red nacional para ser utilizadas como técnicas referenciales, hasta tanto se establezca el diagnóstico rápido de *S. aureus*.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla.

TABLA . Pruebas para la identificación de las cepas de estafilococos estudiadas

Pruebas utilizadas	No. de cepas positivas	No. de cepas negativas
Prueba de fosfatasa	100	2
Prueba de coagulasa en tubo:		
- Δ 37 °C.	85	15
- Δ temperatura ambiente	90	10
DNasa	90	10
Producción de ácido a partir de hidratos de carbono.		
- Trehalosa.	99	1
- Manitol.	98	2
- Maltosa.	100	0
- Sacarosa.	100	0
- Arabinosa.	0	100
- Xilitol.	0	100
Resistencia a la novobiocina	100	0
Finlatex-Staph.	86	14

Mediante la prueba de la coagulasa en tubo a temperatura ambiente y la DNasa se detectó el mayor porcentaje de positividad y basados en estos resultados 90 cepas fueron inicialmente identificadas como *S. aureus* y 10 como no *S. aureus*.

La prueba de la coagulasa en tubo a 37 °C identificó correctamente 85 cepas (94,4 %) de las cepas identificadas anteriormente como *S. aureus*.

La técnica de aglutinación al látex Finlatex-Staph fue altamente sensible y permitió clasificar 86 (96 %) como *S. aureus* y de las 14 restantes 2 presentaron resultados dudosos y 12 fueron negativas.

Las 10 cepas clasificadas inicialmente como no *S. aureus* fueron identificadas correctamente mediante otras técnicas utilizadas en nuestro trabajo (8 como *S. haemolyticus*, 1 como *S. epidermidis* y 1 como *S. hominis*).

DISCUSION

No siempre es posible realizar una identificación rápida de *S. aureus*, pues los métodos existentes hasta el momento requieren de un mínimo de 48 horas para su identificación. Algunas cepas que dan resultados negativos al realizar la prueba de la coagulasa en portaobjeto, pueden demorar hasta 24 horas para dar un resultado positivo al realizar la prueba de la coagulasa en tubo. Esto demuestra la necesidad de desarrollar métodos alternativos que permitan la identificación correcta de *S. aureus*.

Por la existencia de reportes anteriores²⁴ donde se plantea la existencia del 7,5 % de cepas de *S. aureus* productoras de coagulasa a temperatura ambiente y no a 37 °C, en nuestro trabajo realizamos la prueba a ambas temperaturas y se confirmó la mayor sensibilidad a temperatura ambiente, pues 5 cepas productoras de coagulasa en estas condiciones fueron negativas a 37 °C.

En la mayoría de las cepas coagulasa positivas a 37 °C se detectó la producción de coagulasa a las 4 horas, mientras que la formación de coágulo a temperatura ambiente en muchos casos requirió 24 horas.

Por lo tanto la prueba realizada a 37 °C puede ser más rápida pero menos sensible.

La sensibilidad de la prueba de la DNasa fue del 100 % y permitió identificar el 100 % de las cepas de *S. aureus*; estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores.^{4,22,25} Ninguna cepa coagulasa negativa a temperatura ambiente fue positiva a la DNasa y existió una equivalencia total entre una y otra pruebas.

Existen autores como Zierdt y Golde²⁶ que plantean que algunos estafilococos coagulasa negativos producen suficiente DNasa como para dar una prueba positiva. Esto también fue reportado por Menzies, R.E.²¹

El crecimiento y tipo de crecimiento en medio semisólido con tioglicolato, la producción de ácido a partir de hidratos de carbono, la resistencia a la novobiocina, y la prueba de la fosfatasa permitieron identificar correctamente todas las cepas que anteriormente habían sido identificadas como no *S. aureus*.

La sensibilidad del Finlatex-Staph encontrada por nosotros fue del 96 %. Estos resultados coinciden con los señalados por Aldridge¹² y Jungkind et al.²⁷ quienes detectaron una sensibilidad de 95.1 % y 95.9 % respectivamente, al utilizar kits comerciales similares al Finlatex-Staph. No obstante, existen reportes de sensibilidad mayor como son los trabajos realizados por Baker et al.,²⁴ Doern y Robbie,²⁸ Myrick y Ellner,²⁹ Mifsud y Parker.²⁵

Reportes de Aldridge et al.¹² demostraron la relación que existía entre las cepas meticillin resistentes y los falsos negativos al SeroStat Staph (kit para la detección del factor cumpling mediante aglutinación al látex). Anteriormente ya había sido demostrado que las cepas meticillin resistentes carecían de Proteína A en la superficie lo cual puede ser la causa de los falsos negativos observados con el reactivo Finlatex-Staph.

En nuestro trabajo no se investigó la sensibilidad al meticillin, por lo que esta comparación no puede ser realizada.

RECOMENDACIONES

Consideramos que el Finlatex-Staph, es un reactivo de alta calidad que una vez incorporado a la red nacional permitirá un diagnóstico rápido y eficaz de cepas de *S. aureus*, lo cual permitirá ofrecer mayor información de utilidad al clínico.

SUMMARY

A rapid manner of identifying cultures of *Staphylococcus aureus* is compared with the use of the latex agglutination techniques traditionally used for the classification of these cultures. 90 strains were classified as *Staphylococcus aureus* and 10 as non-*Staphylococcus aureus* by routine techniques. Latex agglutination technique identified correctly 86 of the strains initially classified as *Staphylococcus aureus*. Thus, it is considered a rapid and sensitive test.

RESUME

On compare une forme rapide d'identifier les cultures de *Staphylococcus aureus* en employant la technique d'agglutination au latex et quelques des techniques utilisées traditionnellement pour la classification de ces cultures. On a classifié au moyen des techniques traditionnelles 90 souches comme appartenant au *Staphylococcus aureus* et 10 autres différentes. La technique d'agglutination au latex a pu identifier correctement 86 des souches identifiées initialement comme appartenant au *Staphylococcus aureus*, c'est pourquoi elle est considérée comme une épreuve rapide et sensible.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. MALONEY, C. V.: Coagulase activity and anticoagulants. Lab Med. 10, 358, 1979.

2. SPERBER, W. H.; S. R. TATINI: Interpretation of tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiol* 29, 502, 1975.
3. MENZIES, R. E.: Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (Dnase) and heat-stable nuclease test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Pathol (Lond)* 30, 606, 1977.
4. MORTON, H. E.; J. COHN: Coagulase and deoxyribonuclease activities of *Staphylococci* isolates from clinical sources. *Appl Microbiol* 23, 725, 1972.
5. EVANS, J. E.; W. E. KLOOS: Use of shake cultures in a semisolid thio-glicolate medium for differentiating staphylococci from micrococci. *Appl Microbiol* 23, 326, 1972.
6. KOCUR, M.; N. MORTENSEN: Comparison of methods for estimation of anaerobic production of acid from glucose and manitol in staphylococci and micrococci. *Acta Pathol Microbiol Scand* 71, 141, 1967.
7. LACHICA, R. V. F.; F. D. HOEPRICH: Nuclease production and lysostafin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase positive cocci. *Appl Microbiol* 21, 823, 1971.
8. KLESIUS, P. H.; V. T. SCUHARD: Use of lysostaphin in the isolated of highly polymerized deoxyribonucleic acid and in the taxonomy of aerobic Micrococaceae. *J Bacteriol* 95, 739, 1968.
9. SCHLEIFER, K. H.; W. E. KLOOS: A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. *J Clin Microbiol* 1, 337, 1975.
10. HERBERT, J. P.; R. CAILLET: Diferenciación entre microcoques y staphylocoques par l'étude de la sensibilité a la nitrofurantoine. *Path Biol* 31, 2, 1983.
11. VARALDO, P. E. ET AL.: Routine separation of staphylococci from micrococci based on bacteriolytic activity production. *J Clin Microbiol* 9, 147, 1979.
12. ALDRIDGE, K. E.; C. KOGOS; C. V. SANDERS: Comparison of rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 19, 703, 1985.
13. DOORN, G. V.: Evaluation of commercial latex agglutination test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 15, 416, 1982.
14. ESSERS, L.; K. RADOBOLD: Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* by latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 12, 641, 1980.
15. STEVENS, D. L.; JONES: Use of trehalose-manitol phosphatase agar to diferenciate *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* from other coagulase negative *Staphylococci*. *J Clin Microbiol* 20, 977, 1984.
16. LOEB, L.: The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *J Med Res* 10, 407, 1903.
17. MARTIN, W. J.; W. H. EWING: The deoxyribonuclease test as applied to certain Gram negative bacteria. *Canadian J Microbiol* 13, 616, 1967.
18. EVANS, J. E.; W. E. KLOOS: Use of shake cultures in a semisolid thio-glicolate medium for differentiating staphylococci from micrococci. *Appl Microbiol* 23, 326, 1972.
19. KLOOS, W. E.; K. K. SCHLEIFER: Simplified scheme for routine identification of humans *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 1, 82, 1975.
20. FINLATEX-STAPH: Para la identificación rápida del *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo. E.P.B. "Carlos J. Finlay", 1987.
21. MENZIES, R. E.: Comparison of coagulase, deoxyribonuclease Dnase and heat stable nuclease test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Pathol* 30, 606, 1977.
22. RAYMAN, M. K. ET AL.: Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease test as means of identifying *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology* 28, 451, 1975.
23. BARRY, A. L. ET AL.: Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease test. *Appl Microbiol* 26, 496, 1973.

24. BAKER, J. E. ET AL.: Evaluation of various rapid agglutination methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 5, 726, 1985.
25. MIFSUD, A. D.; S. C. PARKER: Staphaurex reappraised role of protein A in false positive results and recommendation for use. *J Clin Pathol* 40, 808, 1987.
26. ZIERDT, C. D.; D. W. GOLDE: Deoxyribonuclease positive *Staphylococcus epidermidis* strains. *Applied Microbiology* 20, 54, 1970.
27. JUNGKIND, D. L. ET AL.: Comparison of two commercially available test methods with conventional coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 19, 199, 1984.
28. DOERN, G. V.; C. D. ROBBIE: Direct identification of *Staphylococcus aureus* in blood culture fluid with a commercial latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 16, 1048, 1982.
29. MYRICK, B. A.; P. D. ELLNER: Evaluation of the latex slide agglutination test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 15, 275, 1982.

Recibido: 20 de octubre de 1988. Aprobado: 17 de diciembre de 1988.
Lic. Isis Tamargo Martínez. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".
Calle 200 y avenida 15, Siboney, Ciudad de La Habana, Cuba.

