

Detección de biofilm en estafilococo coagulasa negativa y su relación con variables clínicas epidemiológicas

Biofilm detection in negative coagulasa staphylococcus and clinical epidemiological variables

MSc. Leonor Aties López^I; Dr. C Germán del Río Caballero^{II}; MSc. Rafael Escalona Veloz^{III}; Gardenia Brossard Alejo^{IV}; Lic. Ileana del Carmen Figueredo Acosta^{IV}; Lic. Yadmila Duret Gala.^I

I Facultad de Enfermería Tecnología "Dr. Juan Manuel Páez Inchausti". Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Santiago de Cuba, Cuba.

II Hospital Militar "Dr. Joaquín Castillo Duany". Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Santiago de Cuba, Cuba.

III Hospital General Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso. Universidad de Ciencias Médicas Santiago de Cuba. Santiago de Cuba, Cuba.

IV Hospital Provincial "Saturnino Lora". Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

Fundamento: la capacidad de algunas cepas de estafilococo coagulasa negativa para producir biofilm ha sido considerada como índice de virulencia y sirve para diferenciarlas de aquellas cepas contaminantes.

Objetivo: determinar la relación entre la producción de biofilm por cepas de estafilococo coagulasa negativa y variables clínicas epidemiológicas.

Métodos: se realizó un estudio observacional, analítico y transversal, en cepas de estafilococo coagulasa negativa y la relación entre la producción de biofilm y variables clínico-epidemiológicas seleccionadas de los pacientes infectados, en el laboratorio de Microbiología del Hospital Provincial Saturnino Lora de Santiago de Cuba, de enero a diciembre de 2012.

Resultados: el grupo de edades donde más aislamientos hubo a estafilococo coagulasa negativa, tanto en el sexo masculino como femenino, fue el de 50-59 y 60 y más años. Respecto a las enfermedades crónicas no transmisibles asociadas que presentaron los pacientes, se observó que el mayor número de personas afectadas fueron las que presentaron diabetes mellitus y nefropatías crónicas. La mayor cifra de aislamientos a estafilococo coagulasa negativa correspondió al servicio de nefrología. Los antimicrobianos que menor porcentaje de resistencia mostraron fueron la vancomicina, cloranfenicol

novobiocina y doxiciclina.

Conclusiones: la infección por estafilococo coagulasa negativa es frecuente en pacientes con edad avanzada, y la diabetes mellitus y nefropatías son factores a tener en cuenta. Se demostró que el medio agar rojo congo por su sencillez, alta sensibilidad y especificidad, puede sumarse al arsenal diagnóstico de los laboratorios para la detección de biofilm.

DeCS: BIOFILMES; STAPHYLOCOCCUS; AGAR/AISLAMIENTO & PURIFICACIÓN; FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS; ESTUDIO OBSERVACIONAL.

ABSTRACT

Background: the capacity of some stumps of negative coagulase staphylococcus to produce biofilm has been considered by some authors as index of virulence and it is useful to differentiate them of those polluting stumps.

Objective: to determine the relationship between the biofilm production for stumps of negative coagulase staphylococcus and epidemic clinical variables.

Methods: an observational, analytical cross-sectional study was conducted in stumps of negative coagulase staphylococcus and the relationship between the biofilm production and the selected clinical-epidemic variables of the infected patients, in the Microbiology laboratory in "Saturnino Lora" hospital in Santiago de Cuba, from January to December 2012.

Results: the age groups who had more isolation to negative coagulase staphylococcus, in male and female sex was the 50-59 and the over 60 one. Regarding the non-communicable chronic diseases associated presented in the patients studied, it was observed that the highest number of affected people was those that presented diabetes mellitus and chronic nephropathies. The biggest figure of isolations to negative coagulase staphylococcus corresponded to the nephrology service. The antimicrobials that showed smaller resistance percentage were Vancomycin, Chloramphenicol, Novobiocin, and Doxicycline.

Conclusions: the infection for negative coagulase staphylococcus is frequent in patient with advanced age, and diabetes mellitus and nephropathies are factors to keep in mind. Finally it was demonstrated that the red congo agar means, for their simplicity, high sensibility and specificity can be added to the diagnostic arsenal in our laboratories for the biofilm detection.

DeCS: BIOFILMS; STAPHYLOCOCCUS; AGAR/ISOLATION & PURIFICATION; EPIDEMIOLOGIC FACTORS; OBSERVATIONAL STUDY.

INTRODUCCIÓN

La importancia clínica actual del estafilococo coagulasa negativa está relacionada, desde que se descubrió, con el importante papel que juega en la ocurrencia de enfermedades infecciosas y a su capacidad de colonizar sitios específicos del hospedero.

El *slime* producido inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos, la fagocitosis, y la actividad de los

glicopéptidos antimicrobianos, como la vancomicina y teicoplanina, además conduce efectos sobre la función inmunitaria que interfiere en la activación y producción de linfoquinas o células T auxiliaadoras, las que son necesarias para la estimulación de otras células del sistema inmune, donde el estafilococo coagulasa negativa ocupa con frecuencia los primeros lugares en los patrones

de circulación de gérmenes, relacionados con las infecciones del entorno hospitalario y el alto porcentaje de resistencia frente a los antimicrobianos.

La capacidad de algunas cepas de estafilococo coagulasa negativa para producir biofilm, ha sido considerada por algunos autores como índice de virulencia y sirve para diferenciarla de las cepas contaminantes.^{1, 2}

Por otro lado, la presencia de biofilm aumenta la capacidad de adherencia de los estafilococos coagulasa negativa e interfiere o modifica la actividad de antimicrobianos. Esto último ha sido asociado a la falta de permeabilidad, a un secuestro del antimicrobiano, en la complicada malla del biofilm en la que se organizan las bacterias al terminar el proceso de adherencia y a la ausencia del microorganismo en la circulación al mantenerse suspendido en dicha estructura.³

Se llevó a cabo esta investigación para determinar la relación entre la producción de biofilm en cepas de estafilococo coagulasa negativa y variables clínicas epidemiológicas.

MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, analítico y transversal en cepas de estafilococo coagulasa negativa y la relación entre la producción de biofilm y variables clínico-epidemiológicas seleccionadas de los pacientes infectados, en el laboratorio de Microbiología del Hospital Provincial Saturnino Lora de Santiago de Cuba, desde enero hasta diciembre de 2012.

El universo de estudio estuvo constituido por 107 cepas de estafilococo coagulasa negativa que crecieron de muestras de catéter y hemocultivos, de pacientes ingresados en las salas de cuidados intensivos, cardiología, nefrología y el centro de cirugía cardiovascular, en el período estudiado, a las cuales se le aplicaron los métodos diagnósticos: prueba para la producción de mucus y agar rojo congo.

Se validaron los resultados de ambas pruebas en términos de sensibilidad y especificidad, median-

te las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{b}{b + d}$$

Donde a): corresponde a los verdaderos positivos; b) a los falsos positivos; c) a los falsos negativos y d) a los verdaderos negativos.

Para lo cual se consideraron:

Verdaderos positivos: producen biofilm y la prueba fue positiva.

Falsos positivos: no producen biofilm y la prueba fue positiva.

Verdaderos negativos: no producen biofilm y la prueba fue negativa.

Falsos negativos: producen biofilm y la prueba fue negativa.

Con la información recopilada se confeccionó una base de datos mediante el sistema SPSS versión 13.0 para Windows, que permitió realizar todo el procesamiento estadístico al utilizar el sistema estadístico odd ratio diagnóstica (DOR), para obtener las distribuciones de frecuencias y confeccionar las tablas se hizo un análisis sintético, inductivo y deductivo; a partir de la bibliografía revisada se establecieron comparaciones con estudios nacionales y foráneos, lo cual permitió formular conclusiones.

RESULTADOS

En los grupos de edades donde hubo más aislamientos positivos a estafilococo coagulasa negativa; tanto en el sexo masculino como femenino, fueron los de 50-59 y el de 60 y más años (tabla 1).

Con respecto a las enfermedades crónicas no transmisibles asociadas que presentaron los pacientes, cuyas muestras se estudiaron según grupos de edades, se observó que el mayor número de personas afectadas fueron las que presentaron diabetes mellitus y nefropatías crónicas, lo que corresponde al grupo de edades de 60 y más años, con 44 y 34 pacientes (tabla 2).

El mayor número de aislamientos a estafilococo coagulasa negativa correspondió al servicio de nefrología, tanto en muestras de catéter con 25 como en hemocultivos con 31; seguido de la unidad de cuidados intensivos con 13 y 11 en orden; cardiología tres y nueve y el centro de cirugía cardiovascular, 11 y cuatro (tabla 3).

Con respecto a los procedimientos diagnósticos empleados, se realizó la comparación entre el agar rojo congo y la prueba de mucus, esta última utilizada como *gold standard* o patrón de oro; la misma reveló la sensibilidad y especificidad del método agar rojo congo, las cuales estuvieron en 93, 4 y 100 % (tabla 4).

Tabla 1. Distribución de las muestras de cepas de estafilococo coagulasa negativa según edad y sexo. Hospital Provincial Docente Saturnino Lora. Santiago de Cuba.

2012

Edad (años)	Sexo				Total
	Masculino		Femenino		
	No.	%	No.	%	
20-39	1	2,1	3	5	4
40-49	1	2,1	1	1,6	2
50-59	11	23,4	7	11,6	18
60 y más	34	72,3	49	81,6	83
Total	47	100	60	100	107

Tabla 2. Enfermedades crónicas no transmisibles asociadas, según grupos de edades

Edad (años)	Enfermedades crónicas no transmisibles			Total	
	Diabetes	Insuficiencia renal crónica	Enfermedades del corazón	No	%
20-39	1	2	1	4	3,7
40-49	1	1	-	2	1,8
50-59	9	7	2	18	16,8
60 y más	44	34	5	83	77,5
Total	45	54	8	107	100

Tabla 3. Total de aislamientos de cepas de estafilococo coagulasa negativa en catéter, hemocultivos por servicios hospitalarios de procedencia

Servicios	Hemocultivos		Catéter		Total
	No.	%	No.	%	
Nefrología	31	56,3	23	48	54
Unidad de cuidados intensivos	11	20	13	25	24
Cardiocentro	4	7,2	12	21,1	15
Cardiología	9	16,3	4	5,7	14
Total	55	100	52	100	107

Tabla 4. Sensibilidad y especificidad del agar rojo congo para detectar la producción de biofilm por el estafilococo coagulasa negativa

Estafilococo coagulasa negativa	Prueba de Mucus			
	Positivo	Negativo	Total	%
Prueba Agar rojo Congo				
Positivo	100	7	107	93,4
Negativo	7	98	107	6,5
Total	107	107	214	100

Entre los gérmenes asociados a estafilococo coagulasa negativa en muestras de catéter y hemocultivos, se aisló *klebsiella spp*, *acinetobacter spp*, *escherichia coli*, *estreptococo a hemolítica* y *enetrobacter spp*.

En relación con la resistencia del estafilococo coagulasa negativa frente a los antimicrobianos utilizados en el laboratorio, para las pruebas de antibiograma in vitro, se observó que los antimicrobianos que menor porcentaje de resistencia mostraron fueron la vancomicina, cloranfenicol novobiocina y doxiciclina.

DISCUSIÓN

La adherencia bacteriana constituye el paso previo al desarrollo de una infección. Esta en sus primeros estadios, está mediada por interacciones físico-químicas, donde se destacan las interacciones hidrofóbicas.^{1,2}

La capacidad de algunas cepas de estafilococo coagulasa negativa para producir *slime*, ha sido considerada por algunos autores como índice de virulencia y sirve para diferenciarla de aquellas cepas contaminantes.³

Este estudio reflejó que el mayor número de aislamientos a estafilococo coagulasa negativa, se comportó igual para ambos sexos en el mismo grupo de edades, lo cual coincide con lo planteado en las bibliografías internacionales.⁴⁻⁶

Con respecto a las enfermedades crónicas no transmisibles asociadas, que presentaron los pacientes cuyas muestras se estudiaron según grupos de edades, se asumió lo planteado por Planet PJ, et al,⁷ Atshan SS, et al,⁸ quienes expresan que estas dolencias, diabetes mellitus y nefropatías, prevalecen más en estas edades y que el número de personas tiende a aumentar debido al envejecimiento de la población, factores socioeconómicos y antecedentes familiares; estos padecimientos se consideran factores de riesgo ya que los pacientes son propensos a contraer enfermedades infecciosas relacionadas con la atención sanitaria.

En relación a los gérmenes asociados se asumió lo planteado por Atshan SS, et al,⁸ quienes opinan que estas infecciones pueden ser polimi-

crobianas, que los gérmenes asociados a estafilococo coagulasa negativa en muestras de catéter y hemocultivos son los gramnegativos y bacilos no fermentadores.

Con respecto a la relación entre los servicios de procedencia de las muestras y el número de aislamientos, se corresponde con las bibliografías internacionales exploradas,^{9,10} cuando plantean la alta incidencia de este microorganismo, ya que la patogenia de la infección relacionada con catéter es multifactorial y compleja, y se involucra en la infección relacionada con catéteres de larga duración, la colonización endoluminal y los gérmenes grampositivos como los *staphylococcus aureus* y los estafilococos coagulasa negativa son los más frecuente en estos servicios.¹¹

En relación a la efectividad de la técnica de mucus, es inferior a la de agar rojo congo; pues depende de la persona que realiza el diagnóstico, de condiciones ambientales adecuadas y de que la cristalería para la realización del diagnóstico se encuentre en óptimas condiciones de limpieza.

Referente a la utilidad de la técnica del agar rojo congo, es fácil constatar como se desprende del análisis realizado y de que no depende de la experiencia y habilidad de la persona para interpretarla. A ello se le puede añadir su mayor reproducibilidad. Según Yousefi M, et al¹² Pascual A, et al,¹³ Chao JO, et al,¹⁴ Boase S, et al,¹⁵ las colonias mantienen su viabilidad, a diferencia de la prueba de mucus donde las colonias mueren después de agregar la safranina al 2 %.

La concentración del indicador rojo congo tiene también una influencia, se manifiesta en el cambio de tonalidad y se observó que a mayor concentración del mismo se evidencia mejor el cambio de color hacia el negro; se presume que debido a la presencia de compuestos ácidos y a la disminución consiguiente del pH que provoca el biofilm, las colonias que no producen el mismo se mantienen de color rosa, porque el pH del medio se mantiene básico sin importar que las bacterias utilicen la sacarosa en su metabolismo. Esta hipótesis debe comprobarse con otras investigaciones dirigidas en específico a este objetivo.

CONCLUSIONES

Las infecciones por el estafilococo coagulasa negativo son frecuentes en ancianos portadores de enfermedades crónicas no transmisibles y que el procedimiento diagnóstico agar rojo congo, es una herramienta de trabajo de gran valor para la determinación del biofilm producido por este germen, por su alta sensibilidad y especificidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grzebyk M, Brzychczy WM, Piotrowska A, Krzyściak P, Heczko PB, Bulanda M. Phenotypic evaluation of hydrophobicity and the ability to produce biofilm in coagulase-negative staphylococci isolated from infected very-low-birthweight newborns. *Med Dosw Mikrobiol*. 2013;65(3):149-59.
2. Blackledge MS, Worthington RJ, Melander C. Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms. *Curr Opin Pharmacol*. 2013 Oct;13(5):699-706.
3. França A, Carvalhais V, Maira-Litrán T, Vilanova M, Cerca N, Pier G. Alterations in the *Staphylococcus epidermidis* biofilm transcriptome following interaction with whole human blood. *Pathog Dis*. 2014 Apr;70(3):444-8.
4. Salas-Sánchez OA, Rivera Morales I. Incidencia de infecciones relacionadas a catéteres venosos centrales (CVC) en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de un hospital universitario. *Rev médica universitaria*. 2010;12(47):91-95.
5. Rivera Castrillón LE, Ramos Palma A, Desgarrones Padilla MC. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Rev Mex Dermatología [Internet]*. 2010 [citado 2 May 2013];54(1):[aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com>
6. Silva Ferrera J, Rizo Rodríguez R, Castañeda Márquez V, Hing León JR. Prevalencia y causas de la insuficiencia renal crónica en 2 áreas de salud de Santiago de Cuba. *MEDISAN [Internet]*. 2013 [citado 2 May 2013]; 12(2): [aprox. 10 p.]. Disponible en: [http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?](http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?met-hod=showDetail&id_articulo=54450&id_seccion=636&id_ejemplar=5518&id_revista=80)
7. Planet PJ, Larussa SJ, Dana A, Smith H, Xu A, Ryan C, et al. Emergence of the Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain USA300 Coincides with Horizontal Transfer of the Arginine Catabolic Mobile Element and *speG*-mediated Adaptations for Survival on Skin. *MBio*. 2013 Dec 17;4(6):e00889-13.
8. Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:417247.
9. Haniagua-Contreras G, Monroy-Pérez E, Gutiérrez-Lucas R, Sainz-Espuñes T, Bustos-Martínez J, Vaca S. Genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and catheter of ambulatory hemodialysis patients in Mexico. *Folia Microbiol (Praha)*. 2014 Jul;59(4):295-302.
10. Babra C, Tiwari J, Costantino P, Sunagar R, Isloor S, Hegde N, et al. Human methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* biofilms: potential associations with antibiotic resistance persistence and surface polysaccharide antigens. *J Basic Microbiol*. 2014 Jul;54(7):721-8.
11. Guembe Ramírez M. Diagnóstico Microbiológico de la Infección relacionada con el Catéter [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense; 2010.
12. Yousefi M, Pourmand MR, Fallah F, Hashemi A, Mashhadi R, Nazari-Alam A. Characterization of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation in Urinary Tract Infection. *Iran J Public Health*. 2016 Apr;45(4):485-93.
13. Pascual A, Cercenado E, Salavert M, Elías García-Sánchez J, Eiros JM, Liñares J, et al. Update on pathogenesis and diagnosis of intravascular catheter-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Mar;29 Suppl 4:16-21.

14. Cha JO, Yoo JI, Yoo JS, Chung HS, Park SH, Kim HS, et al. Investigation of Biofilm Formation and its Association with the Molecular and Clinical Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Health Res Perspect*. 2013 Oct;4(5):225-32.
15. Boase S, Foreman A, Cleland E, Tan L, Melton-Kreft R, Pant H, et al. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. *BMC Infect Dis*. 2013 May 8;13:210.

Recibido: 6 de febrero de 2016

Aprobado: 13 de mayo de 2016

Msc. Leonor Aties López. Licenciada en Tecnología de la Salud en Microbiología Clínica. Máster en Medios Diagnósticos. Profesor Asistente. Facultad de Enfermería Tecnología Dr. Juan Manuel Páez Inchausti. Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Santiago de Cuba, Cuba.