

## LOS BACTERIOFAGOS, SU IMPORTANCIA EN ENCUESTAS DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS \*

Prof E. BOQUET JIMENEZ

(de Barcelona)

Los virus son partículas ultramicroscópicas que para vivir necesitan células vivas. Aquellos que precisan de células bacterianas se denominan bacteriófagos y poseen una gran especificidad sobre la célula hospedadora, produciéndole lisis.

Además de la importancia que actualmente se les concede en encuestas epidemiológicas de aguas residuales, queremos poner de manifiesto la ayuda que representan en estudios intrahospitalarios, lo cual, hemos podido constatar en nuestras experiencias realizadas en el Centro Hospitalario de Manresa.

El mencionado Hospital posee algo menos de 300 camas, y el Servicio que predomina por volumen de trabajo, es el de Traumatología, por lo tanto, el microorganismo que más nos preocupa es *Staphylococcus aureus* por su reconocida afinidad por el tejido óseo.

El tipaje de estafilococos por fagos se remonta al año 1922 en que

Callow aisló un grupo de estos virus, sin embargo, no se pudieron utilizar en clínica humana por proceder de muy diversas fuentes. Hacia mediados de siglo, el tema interesó a muchos investigadores que lo trataron profundamente, lográndose un set de bacteriófagos que actuaban específicamente sobre estafilococos aislados de la especie humana.

En 1954 se creó el Subcomité para Tipaje de *Staphylococcus*, integrado en el Comité Internacional de Nomenclatura bacteriana. Dicho Subcomité tiene como cabeza rectora, el Centro Internacional para el Tipaje de *Staphylococcus* por Fagos, localizado en el Laboratorio Central de Salud Pública de Londres. Tiene por misión el análisis de las variaciones del set en activo, así como el estudio de nuevos fagos y de sus respectivas cepas propagadoras. Además, actúa de intermediario entre los representantes de los distintos países miembros, a los cuales aloc-

\* Sesión del 8-III-77

ciona y envía periódicamente cada cuatro años, nuevos sets liofilizados, para que los propaguen y repartan por todo el territorio nacional. El representante para España es el Dr. Luis Arcalis Arce, Jefe del Departamento de Bacteriología de la Residencia Francisco Franco de la Seguridad Social de Barcelona.

En el año 1970 el Subcomité propuso la introducción de siete nuevos bacteriófagos. El Centro Internacional, los probó hasta 1974 y aceptó tres de ellos; el fago WH-1 aislado

en USA por L. Blouse y al que se dio el número oficial de 94, y los fagos DU-1 y DU-2 aislados en Nueva Zelanda por J. Markham y a los que se ha codificado con los números 95 y 96 respectivamente. Los cuatro restantes no fueron incluidos en el set por tener un ámbito de tipificación demasiado localizado, es decir, circunscrito a un territorio geográfico demasiado concreto.

El set básico utilizado actualmente (desde enero de 1975) consta de 23 fagos incluidos en cuatro grupos.

Grupo I	29	52	52 A	79	80
Grupo II	3 A	3 C	55	71	
Grupo III	6	42 E	47	53	54
	75	77	83 A	84	85
Misceláneo	81	94	95	96	

Además, se está comprobando la eficacia de los fagos 88, 83 C y 90 entre otros; últimamente se han excluido del set básico al fago 42 D y al 187.

Cada fago se suministra acompañado de su correspondiente cepa propagadora de *Staph. aureus* sobre la que presenta un máximo de espectro lítico, y que sirve periódicamente para comprobar pureza y título.

Los laboratorios que trabajan con bacteriófagos incluyen, pues, en su trabajo cotidiano dos procesos distintos, el primero la propagación y mantenimiento de los virus a títulos suficientemente elevados y el segundo la tipificación lítica de los estafilococos.

La propagación de los fagos es un tema demasiado amplio y complejo para desarrollar aquí, pero que quizás abordemos en una próxima ocasión.

La tipificación consiste esencialmente en un test de susceptibilidad de un cultivo de *Staphylococcus aureus* a la batería de los 23 fagos que acabamos de reseñar.

Es condición indispensable que las cepas que pretendemos tipar sean puras y plasmó-coagulasa positivas.

Para la tipificación sirve cualquier buen medio nutritivo, si bien es aconsejable utilizar siempre el mismo.

El inóculo de la bacteria se prepara sembrando algunas colonias en

caldo nutritivo e incubando a 37°C durante 4-5 horas, o hasta que el cultivo adquiriera turbidez.

Con el cultivo se inunda una placa de Petri que contiene medio nutritivo poco consistente (1,1 % de agar), y se elimina el exceso. Se deja secar 30 minutos en estufa.

Los fagos se mantienen preparados a la dilución del test de rutina (DTR o RTD, como dicen los anglosajones), que es la mayor dilución que produce lisis confluyente de su correspondiente cepa propagadora. Esta DTR se guarda a + 4°C en nevera y se debe comprobar semanalmente para todos y cada uno de los integrantes del set.

A las placas sembradas por disseminación en superficie y secadas en estufa, se les aplica una gota de cada uno de los fagos. Para ello se pueden utilizar pipetas de punta muy fina, o aplicadores múltiples que fabrican algunas casas comerciales.

Después de secar las gotas a temperatura ambiente, se incuban las placas a 30°C durante toda la noche, o a 37°C durante 5-6 horas y luego a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

En la lectura, las placas se examinan con luz transmitida indirectamente, sobre fondo oscuro, con ayuda de una lupa de mediano aumento.

El resultado de las reacciones líticas se expresa semicuantitativamente de la siguiente manera: dos signos más (++) cuando se observan más de 50 placas o calvas líti-

cas, un signo más (+) cuando hay entre 20 y 50 placas, y un signo más - menos ( $\pm$ ) cuando hay entre 20 y 50 placas, y un signo más - menos ( $\pm$ ) cuando el número es inferior a 20.

Una placa o calva lítica se produce cuando un bacteriófago se fija sobre una célula, le introduce su material genético, con lo cual le obliga a procrear nuevas partículas víricas, y después la lisa, dejando libres a los nuevos fagos, que podrán continuar el proceso, hasta que el agar por efecto mecánico impida su desplazamiento. Se supone que cada calva está iniciada por un solo virus.

A la dilución del test de rutina se puede tipar aproximadamente el 60 % de las cepas de *Staphylococcus humanus*. Con el 40 % de las cepas no afectadas a la DTR se repite el test utilizando una suspensión de fagos más concentrada. Antes se usaba la 1000  $\times$  DTR y actualmente la 100  $\times$  DTR.

En la lectura del tipaje a esta concentración (100 DTR), se suelen añadir dos nuevos signos en la interpretación de los resultados: CL para aquellos casos en que hay lisis confluyente y O que se emplea cuando hay inhibición del cultivo debido a las altas concentraciones de fago empleadas y que no se debe confundir con lisis total. En la inhibición se observa un completo aclaramiento en el área de la gota.

Está comprobado que utilizando ambas concentraciones de fagos

(DTR y 100 DTR), se puede tipar el 90 % de los *Staphylococcus aureus* humanos.

La interpretación de los resultados sólo la pueden efectuar los verdaderos especialistas, ya que hay ciertas matizaciones que sólo ellos son capaces de observar, sin embargo podemos considerar como norma general, que dos cepas son distintas cuando por lo menos presentan diferencias en dos reacciones fuertes (+ +) frente a dos fagos.

Una primera tentativa de tipificación de nuestros *Staphylococcus* por fagos, la hicimos en el Centro Nacional de Virología, Microbiología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda (Madrid), trabajando con el Dr. Julio Casal (noviembre y diciembre de 1974, y mayo de 1975).

Posteriormente, aprovechando una invitación del Laboratorio Central de Salud Pública de Londres, estuvimos parte de junio y julio del pasado año en el Centro Internacional de Referencia y Tipificación de *Staphylococcus* por fagos, estudiando y trabajando con el Dr. M. T. Parker y la Dra. Maureen de Saxe. Tipamos un gran número de cepas obtenidas durante un año y medio en nuestro Hospital, que habían sido aisladas durante un año y medio en nuestro Hospital, que habían sido aisladas de diversos procesos supurativos, de infecciones óseas, del ambiente y del personal sanitario, al cual se controla periódicamente.

Porcentualmente el encuadro de

los resultados obtenidos es el siguiente:

Grupo I: pertenece el 57 % de las cepas tipificadas.

Grupo II: pertenece el 15 % de las cepas tipificadas.

Grupo III: pertenece el 18 % de las cepas tipificadas.

Grupo misceláneo: pertenece el 10 % de las cepas tipificadas.

Hay cepas con idéntico espectro lítico que se aislaron durante todo el tiempo que duró el muestreo, por lo que las consideramos como integrantes de la flora endémica de nuestro Hospital. Otras por el contrario, sólo se aislaron en unos pocos casos y durante un período de tiempo corto, por lo que las creemos infecciones independientes y fugaces.

Entre las endémicas del Grupo I, cabe destacar las que hemos denominado respectivamente CHMA, CHMA 1 y CHMB y que poseen el siguiente fagotipo a la dosis de rutina.

CHMA (12,5 % del total): 52 ++ / 81 ++ / 29 ± / 79 ± / 80 ± / 6 ± / 75 ±.

CHMA 1 (7,5 % del total): 52 ++ / 80 ++ / 81 ++ / 52 A +.

CHMB (15 % del total): 80 ++.

Entre las endémicas del Grupo II, la CHMG con el fagotipo 3 A ++ / 3 C ++ / 71 +, también a la DTR (10 % total).

Ni en el grupo III, ni en el Misceláneo, hemos incluido ninguno.

Intentamos traducir toda esta nebulosa teorizante y numérica en hechos concretos y reacciones prácticas, que es lo que interesa.

Introduciendo los datos obtenidos en el cuadro epidemiológico del Hospital, hemos llegado a considerar cuatro puntos, veamos cuáles son, y como hemos actuado ante ellos.

*Punto I.* — Hay una gran relación entre el fagotipo de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes con heridas infectadas que han estado encamados en una misma habitación, aunque haya un lapso de tiempo de unas semanas entre la estancia de unos y otros. Esto demuestra una contaminación ambiental. Nuestra actuación en este caso ha consistido en precintar durante unos días la sala y efectuar desinfecciones diarias por métodos gaseosos y por desinfectantes líquidos en suelo y paredes.

*Punto II.* — Observamos el mismo fagotipo en *Staphylococcus* aislados de infecciones producidas en uno de los pisos, y en el aislado de una enfermera que era portadora nasal. Aquí se nos presentó el dilema de la génesis del huevo y la gallina, ¿quién fue primero?, ¿quién introdujo la cepa en el Hospital?, ¿la enfermera?, o bien ésta se contaminó con alguno de los pacientes; esto no lo sabemos, ni tampoco pudimos actuar, pues al conocer la susceptibilidad de las cepas a los fagos, la

citada enfermera hacía dos meses que había dejado de trabajar en el Hospital por motivos familiares.

*Punto III.* — Constatamos que se infectaban muchas de las operaciones traumatológicas efectuadas por un mismo especialista. De la mayoría de los infectados se aisló *Staphylococcus aureus* con un mismo fagotipo. Comprobamos también que el médico era portador nasal y aunque todavía no hemos podido analizar su fagotipo, sospechamos casi con seguridad que se trata del mismo. Realizamos un estudio de sensibilidad del germen a los antibióticos y se efectuó el oportuno tratamiento del clínico.

*Punto IV.* — La eficacia de la tipificación por fagos se puso una vez más de manifiesto en el siguiente caso. Hacia mediados de abril del año pasado ingresaron en nuestro Centro Hospitalario, más de veinte personas con síntomas de intoxicación alimentario, que tenían como factor común el haber ingerido las típicas monas de Pascua, fabricadas en una pastelería de la localidad. A todos los pacientes se les practicó coprocultivo, y en todos los casos a excepción de uno aislamos *Staphylococcus aureus*.

Familiares de los intoxicados nos suministraron pedazos de los pasteles que motivaron la intoxicación. De ellos aislamos tres cepas de *Staphylococcus aureus*.

Nos llevamos las estirpes aisladas al Laboratorio Central de Salud Pública de Londres y efectuamos el conveniente estudio de lisotipia.

Por fagotipo pudimos comprobar la estricta correlación de una de las tres cepas aisladas de los pasteles con las aisladas de heces.

Las otras dos cepas a pesar de pertenecer a la especie aureus, no habían intervenido en la intoxicación, pues no eran productoras de enterotoxina.

En nuestro estudio, no hemos encontrado relación entre el fagotipo y la resistencia específica a ciertos antibióticos (Penicilina, Cloxacilina, etcétera), probablemente debido a la poca extensión de nuestra casuística.

El otro gran problema bacteriano de toda Residencia Sanitaria es *Pseudomonas aeruginosa*. El encuadre de dicha especie en distintos grupos se realiza por reacciones de aglutinación según antígenos somáticos o por piocianotipia, si bien esta última prueba tiene poco valor debido a su gran subjetividad, es por esto,

que actualmente se está sustituyendo por la fagotipia que se efectúa a la par con las aglutinaciones somáticas.

Afortunadamente nuestro Hospital es muy joven (7 años de funcionamiento), y «todavía» estas infecciones representan una seria preocupación. Estuvimos tratando el tema con el Dr. Pitt en Colindale, pero el escaso número de cepas aisladas no nos permite efectuar ninguna conclusión.

El método de tipificación de *Pseudomonas* por bacteriófagos es parecido al que se sigue para los *Staphylococcus*, por lo que omitimos repetirlo.

Podríamos concluir añadiendo que aunque estas técnicas modernas, como el tipaje por fagos ayuden en los estudios epidemiológicos y por lo tanto en la profilaxis intrahospitalaria, de poco servirán si hemos olvidado las más elementales reglas del comportamiento sanitario, es decir, si no van precedidas de una correcta higiene personal y de las más extremadas condiciones de asepsia.