

34
24
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**INVESTIGACION SOBRE LA PRESENCIA DE
Staphylococcus saprophyticus
EN MUESTRAS CLINICAS**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
CECILIA MEDINA GARCIA**

DIRECTOR: Q. B. P. JUSTINO F. VAZQUEZ FERNANDEZ

CUAUTITLAN, IZCALLI, EDO. DE MEX.

1 9 8 6



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
GENERALIDADES.....	5
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y METODOS.....	16
RESULTADOS.....	36
DISCUSION.....	51
CONCLUSIONES.....	55
RESUMEN.....	57
APENDICE.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	64

I N T R O D U C C I O N

Hoy en día, se observa mayor preocupación por las infecciones debidas a microorganismos endógenos del huésped. Bacterias antes consideradas saprófitas o de baja patogenicidad se encuentran ahora en situaciones donde son capaces de producir infecciones. Las especies coagulasa negativa de Staphylococcus endógenas del hombre son miembros de este grupo (1).

Las especies de estafilococos, las cuales no coagulan plasma, son frecuentemente identificadas en el laboratorio de microbiología clínica como Staphylococcus epidermidis. En realidad, estos microorganismos comúnmente aislados de seres humanos, constituyen un grupo heterogéneo compuesto de 15 especies por lo menos, actualmente reconocidas y siendo la mayoría de ellas raramente patógenas. A pesar de ser considerados como microorganismos no patógenos, estudios recientes han demostrado que los estafilococos coagulasa negativa pueden bajo condiciones apropiadas, producir serias enfermedades humanas, como son : infecciones del tracto urinario y endocarditis, incluyendo además infecciones en transplantes vasculares, infecciones por prótesis articulares, abscesos en piel, peritonitis en pacientes que han recibido diálisis peritoneal, infecciones en pacientes inmunosuprimidos, infecciones en ojos y oídos, infecciones en heridas postoperatorias y más recientemente se ha señalado su aislamiento de habitaciones hospitalarias (paredes y pisos) de recién nacidos y de la

sangre de niños y adultos con leucemia (3,5,18,20,24,26,27,30, 33,34).

Se ha observado que la mayoría de las infecciones estafilocócicas graves debidas a especies coagulasa negativa, se presentan en pacientes cuyas defensas normales están severamente alteradas. Los pacientes hospitalizados, debilitados, que presentan serias enfermedades subyacentes o que han sido sometidos a extensas intervenciones quirúrgicas, son especialmente susceptibles a la infección. Tales problemas surgen del estado comprometido del huésped más que de la virulencia del microorganismo y continuarán surgiendo en tanto y en cuanto los enfoques utilizados en el manejo de muchas enfermedades prolonguen la vida de individuos que son incapaces de manejar bien su flora nativa, como son los estafilococos coagulasa negativa (14).

De los estafilococos coagulasa negativa, el Staphylococcus epidermidis tiene especial importancia clínica en infecciones tales como la endocarditis bacteriana, sobre todo la consecutiva a cirugía cardíaca con reemplazo valvular. Además, a menudo es causa de una bacteremia persistente como consecuencia del "shunt" ventriculoauricular para controlar la hidrocefalia, y se le relaciona también con la infección vinculada con otras prótesis quirúrgicas (18). Asimismo, el Staphylococcus epidermidis y el Staphylococcus saprophyticus intervienen en las infecciones de vías urinarias (34,35).

Por otra parte, debido a que los laboratorios clínicos no

var. más allá de diferenciar al Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis, el presente trabajo se avoca a describir e identificar a otra especie importante de los estafilococos - coagulasa negativa : el Staphylococcus saprophyticus.

TABLA No. 1

ESPECIES DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVA Y SU SIGNIFICADO PATOGENO

PATOGENICIDAD	ESPECIES
PATOGENO COMUN :	<u>S. epidermidis</u> <u>S. saprophyticus</u>
PATOGENO CUESTIONABLE O POCO COMUN :	<u>S. haemolyticus</u> <u>S. hominis</u> <u>S. parneri</u> <u>S. saccharolyticus</u> <u>S. cohnii</u> <u>S. simulans</u>
PATOGENO NO DETERMINADO O RARO :	<u>S. capitis</u> <u>S. auricularis</u> <u>S. xylosum</u> <u>S. carnosus</u> <u>S. sciuri</u> <u>S. lentus</u> <u>S. caseolyticus</u>

Parisi TJ. Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of Staphylococcus epidermidis. Microbiol Rev 1985; 49:126-139.

GENERALIDADES

Hace más de cien años que Sir Alexander Ogston en 1883 introdujo el nombre de "staphylococcus", para describir a microorganismos en forma de grano y colocados en racimos, los cuales fueron observados como causa de ciertos abscesos piogénicos en humanos.

En 1884 Rosenbach adquirió el crédito del nombre genérico y de especie del Staphylococcus aureus, demostrando que dos colonias de diferente color fueron producidas por este mismo microorganismo por lo que nombró a dichas colonias blancas y anaranjadas como Staphylococcus pyogenes albus y Staphylococcus pyogenes aureus, respectivamente. Desafortunadamente, el nombre de Staphylococcus no fue fácilmente aceptado por otros investigadores, por lo que las clasificaciones más antiguas incluyeron a estos microorganismos dentro del género Micrococcus.

Con la publicación de la séptima edición del Manual de Bergey en 1957, la prueba de la coagulasa y la utilización del manitol en condiciones anaerobias, fueron aceptadas como características clave para diferenciar las especies Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis, entre sí (24).

Baird-Parker fue el primero en reconocer los tipos específicos dentro del grupo de los estafilococos coagulasa negativa. Tales especies fueron diferenciadas en base a la producción de fosfatasa y acetofina y en la capacidad para formar ácido aeróbi

camente a partir de lactosa, maltosa y manitol (4,32).

Actualmente el uso del ácido desoxirribonucleico (DNA), - composición básica, generalmente expresada como moles por ciento de guanina más citosina (G + C) en la taxonomía de los estafilococos ha demostrado que las cepas del Staphylococcus aureus y del Staphylococcus epidermidis tienen un valor inferior de G + C (30 a 40 mol%); mientras que las cepas de Micrococcus tienen un valor elevado de G + C (64 a 74 mol%). Otra prueba que se realiza es la de la lisostafina, en la que se observa que el Staphylococcus aureus es muy susceptible a la lisis por la lisostafina, el Staphylococcus epidermidis es menos susceptible y el Micrococcus es resistente (12,29).

La octava y actual edición del Manual de Bergey, publicado en 1974, reconoce ya una tercera especie, el Staphylococcus saprophyticus. Este microorganismo coagulasa negativa fue originalmente clasificado como un Micrococcus, sin embargo, su capacidad para crecer en condiciones anaerobias en el medio semisólido de bioglicolato, su composición base de DNA, su susceptibilidad a la lisostafina, su peptidoglican de la membrana celular demuestran su relación tan estrecha con los estafilococos (32).

En 1975, Schleifer y Kloos publicaron una serie de artículos donde redefinían al Staphylococcus epidermidis y Staphylococcus saprophyticus. De los cuatro biotipos del Staphylococcus epidermidis y del Staphylococcus saprophyticus identificados anteriormente en la octava edición del Manual de Bergey y por -

Baird-Parker, solamente el biotipo 1 (formalmente llamado sub-grupo II) fue nombrado Staphylococcus epidermidis y el biotipo 3 fue designado como Staphylococcus saprophyticus (6,32). Además, identificaron nuevas especies de estafilococos coagulasa negativa : Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus hominis, Staphylococcus warneri, Staphylococcus capitis, Staphylococcus cohnii, Staphylococcus xylosus y Staphylococcus simulans.

En 1982, seis nuevas especies de estafilococos coagulasa negativa fueron identificadas : Staphylococcus auricularis, Staphylococcus lentus, Staphylococcus sciuri, Staphylococcus caseolyticus, Staphylococcus carnosus, y Staphylococcus saccharolyticus, aumentando a 15 el número de estafilococos coagulasa negativa propuestos por Kloos y Schleifer (23,24).

Cabe señalar que Kloos, Schleifer y colaboradores conformaron su esquema de clasificación para el uso de métodos taxonómicos modernos como es la determinación de la composición de la pared celular, la comparación electroforética de enzimas isofuncionales, y reacción inmunológica de proteínas (1,10,11,24).

Staphylococcus saprophyticus.

MORFOLOGIA Y ASPECTOS BIOQUIMICOS :

El nombre dado como "saprophyticus" define a microorganismos que se establecen en tejidos muertos.

Estos microorganismos son cocos de 0.5-1.5 μm de diámetro, se presentan en forma individual, en pares y ocasionalmente en tétradas o paquetes cúbicos, pero normalmente forman racimos compactos o racimos libres en forma irregular. No son móviles.

La pared celular contiene fósforo orgánico, glucosamina, ácido murámico, lisina, alanina, ácido glutámico, serina, glicina, ribitol y/o glicerol. El ácido teicoico de muchas cepas saprofiticas, contiene ribitol el cual está B-enlazado a un N-acetil glucosamina.

Son colonias uniformes, convexas, con bordes irregulares o ligeramente irregulares. En su mayor parte son colonias blancas, pero ocasionalmente pueden ser de color amarillo intenso o anaranjadas.

En caldo, presentan una turbidez uniforme con un depósito fino o algunas veces granular o mucoso.

Son quimioorganotróficos, de metabolismo principalmente respiratorio. Las menaquinonas y citocromos forman el sistema de transporte de electrones. Crecen ligeramente en condiciones anaerobias en ciertos medios, y fermentan débilmente la glucosa,

sin embargo, producen ácido a partir de glucosa, glicerol, lactosa y sacarosa. Algunas cepas forman ácido a partir de maltosa y manitol (32). No producen comúnmente ácido a partir de arabinosa, celobiosa, dextrina, inositol, rafinosa, ramnosa, salicina o xilosa. Producen acetoina como producto final del metabolismo de la glucosa. El pH final en caldo glucosado (no amortiguado) es de 4.4-5.8 (pH promedio, 4.9).

Reducen el nitrato a nitrito o amoníaco. Hidrolizan la caseína, gelatina, yema de huevo, grasas, Tweens y urea. Algunas cepas producen muramidasa y/o nucleasa.

Las cepas son anaerobias facultativas y muestran un ligero crecimiento en condiciones anaerobias y en medios apropiados. - La temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C; sin embargo, muchas cepas crecen a 10°C y algunas lo hacen a 45°C. Crecen en medios que contienen concentraciones de más de 5% de NaCl.

Son resistentes a la novobiocina (CONCENTRACION INHIBIDORA MINIMA, M.I.C. > 2.0 µg/ml) y a la lisozima (CONCENTRACION INHIBIDORA MINIMA, M.I.C. > 300 µg/ml). Las cepas son susceptibles a la lisostafina (1 unidad/ml).

Se consideran estas cepas generalmente como no patógenas, pero algunas cepas causan infecciones en el tracto urinario.

Son microorganismos aislados de orina, comunes en aire, - tierra, polvo, productos lácteos y piel de reses muertas.

La cantidad de G + C del DNA es de 30-37 moles por ciento.

Cepa neotipo propuesta : S.41; NCTC 7292; ATCC 15305 (Shaw, Stitt y Cowan, 1951) (6).

ASPECTOS CLINICOS :

El S. saprophyticus, se parece al S. epidermidis pero se afirma que se diferencia de éste por su resistencia a la novobiocina (1.6 µg/ml) (2,13). En un estudio realizado por Mardh y Hovelius, observaron que en un medio de caldo triptona conteniendo 5 µg de novobiocina y 150 µg de ácido nalidixico/ml, de 120 muestras uretrales femeninas analizadas; 14 cepas estafilocócicas coagulasa negativa y novobiocina resistentes fueron aisladas, mientras que sólo 2 de esas cepas fueron detectadas cuando se inocularon las mismas muestras directamente sobre placas de agar sangre. Siete de las 14 cepas reconocidas fueron S. saprophyticus, el resto de las cepas fueron S. cohnii y S. xylosum.

Sin embargo, estos mismos investigadores observaron que la prueba de difusión del disco de ácido nalidixico, era más segura que la resistencia a la novobiocina para diferenciar el S. saprophyticus de otros estafilococos coagulasa negativa, debido a que el S. saprophyticus es muy resistente al ácido nalidixico.

Por otra parte, hasta hace pocos años se consideraba a los estafilococos coagulasa negativa aislados de las vías urinarias como "contaminantes" o, a veces, patógenos oportunistas. Sin embargo, el S. saprophyticus pocas veces se presenta en muestras

urinarias como un contaminante, además cuando se establece en dichas muestras en cantidades mayores de 1×10^4 /ml, los resultados generalmente son de importancia clínica. Es por ello, que varios informes incriminan a este microorganismo como el agente etiológico en un número apreciable de infecciones urinarias en hombres y mujeres. En el hombre provoca uretritis no gonocócica y en la mujer, es causa ocasional de un síndrome uretral agudo (30,34). Asimismo, se ha establecido que cerca de la mitad de todos los pacientes con infecciones en el tracto urinario, causadas por este microorganismo, presentan síntomas de acuerdo con una infección localizada en la parte superior del tracto urinario. Esas infecciones son, frecuentemente inadvertidas debido a que la condición general de los pacientes es mucho menos afectada a diferencia de una infección con bacilos gram-negativos. Los pacientes presentan características subfebriles, experimentan un dolor en la región afectada y un dolor ligero sobre uno o ambos riñones (7).

Debido a la predilección de este microorganismo por las células epiteliales del tracto urinario, a las que se adhiere, se puede advertir un aspecto característico de los sedimentos de la orina en pacientes con infección de las vías urinarias. Se observan agregados de células estafilocócicas adheridas a células epiteliales. En un estudio realizado, de 787 cultivos el 22% fueron positivos a S. saprophyticus, predominando los cultivos puros y en recuentos elevados (el estudio se llevo a cabo en pacientes

externas del sexo femenino, atendidas en forma consecutiva con signos de bacteriuria). Se halló este microorganismo en el 42% en el grupo de edad de 16 hasta los 25 años. Por otro lado, es un hallazgo relativamente raro en pacientes femeninas hospitalizadas y en hombres con bacteriuria.

El origen de estas infecciones es aún desconocido. Se ha sugerido al recto como un reservorio de este microorganismo. Sin embargo, en un estudio realizado se aislaron sólo 10 cepas de 156 muestras rectales de mujeres saludables; otro reporte señala sólo una cepa de S. saprophyticus de 206 muestras rectales analizadas (34).

Por otra parte, se ha establecido al S. saprophyticus como flora normal de la piel de muchos animales domésticos, y se han aislado también de heridas de personas que tuvieron contacto con animales (7).

Asimismo, se ha publicado un estudio sobre la importancia de los estafilococos coagulasa negativa, aislados en muestras urinarias. De 16,347 cultivos de orina realizados en el laboratorio, únicamente 68 muestras (0.4%) dieron más de 1×10^4 estafilococos coagulasa negativa por mililitro en cultivos puros. De los cuales, sólo 62 muestras pudieron clasificarse de la siguiente manera: 45 S. epidermidis, 15 S. saprophyticus y 2 S. hominis. Nueve de los 15 S. saprophyticus aislados (60%), que eran resistentes a la novobiocina, provenían de pacientes con probable infección urinaria. Ocho de ellos eran mujeres jóvenes

que presentaban síntomas agudos y piuria. Lamentablemente, la prueba de resistencia a la novobiocina (para diferenciar los aislamientos S. saprophyticus del S. epidermidis) no fue confiable debido a que dos de las 15 cepas de S. saprophyticus eran sensibles (2,13,35).

ASPECTOS TERAPEUTICOS :

El S. saprophyticus al contrario de los demás estafilococos, es muy susceptible a casi todos los agentes antimicrobianos con excepción del ácido nalidíxico (25,28). Clínicamente, a veces no responde a este agente antimicrobiano por lo que no se aconseja como antibiótico de primera elección en el tratamiento de infecciones del tracto urinario (22).

Otras drogas comúnmente utilizadas en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, poseen un buen efecto terapéutico. Sin embargo, el tratamiento con sulfonamidas es todo un fracaso con el S. saprophyticus (34).

En general, el manejo de las infecciones estafilocócicas localizadas, tiene como principio básico de tratamiento un drenaje adecuado (22).

Por otra parte, las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos son importantes en la selección del antibiótico apropiado y en la evaluación de su efectividad durante el curso de la infección. Si luego de la prueba de susceptibilidad, el est

filococo aislado demuestra ser sensible a la penicilina, ésta será la droga de elección para el tratamiento continuado. Generalmente un microorganismo sensible a la penicilina no adquiere resistencia a esta droga durante el curso del tratamiento (14, 15, 17, 31).

CUADRO No. 1

Agentes antimicrobianos sugeridos para ser probados contra aislamientos estafilocócicos de muestras clínicas.

- Cefalotina
- Clindamicina
- Eritromicina
- Gentamicina
- Nafcilina
- Oxacilina
- Penicilina G

CUADRO No. 2

Agentes antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones estafilocócicas.

Agentes primarios :

- Penicilina G
- Penicilinas penicilinasas resistentes

Agentes secundarios :

- Cefalosporinas
- Eritromicina
- Vancomicina (31)

The biologic and clinical basis of infectious diseases
Youmans P.G., Paterson Y.P., Sommers M.H., 1975.

OBJETIVOS

1. Determinar la frecuencia de estafilococos coagulasa negativa en aislamientos clínicos.
2. Identificar al Staphylococcus saprophyticus en el laboratorio clínico.
3. Determinar la concentración inhibidora mínima (M.I.C.) de dicloxacilina y clindamicina para las especies Staphylococcus saprophyticus y Staphylococcus epidermidis.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Durante un período de seis meses (mayo a octubre de 1985), se trabajaron un total de 12 060 muestras en todo el laboratorio de microbiología, de donde sólo se reportaron 886 aislamientos de estafilococos coagulasa negativa. De estos 886 aislamientos, se eligieron al azar sólo 100 para ser analizados. Estos 100 - aislamientos procedían de distintos productos patológicos (sangre, heridas, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, exudados cervico vaginales, esperma, catéteres, faríngeos, muestras nasales y óticas) de pacientes hospitalizados y de consulta externa del Hospital General Centro Médico La Raza.

OBSERVACION DIRECTA :

Los aislamientos reportados como estafilococos coagulasa - negativa, utilizados en este estudio, se encontraban en cultivos abundantes y generalmente puros. El color predominante de las colonias fue el blanco y en menor proporción se manejaron cepas de color amarillo y blanco mate.

OBSERVACION MICROSCOPICA :

Se llevó a cabo por medio de la tinción de Gram y observando con el objetivo de 100X. Se buscaron cocos Gram-positivos y agrupados en racimos, individualmente y/o tétradas.

CULTIVO :

Las 100 muestras recolectadas, fueron aisladas y puestas a crecer sólo 5 colonias en tubos de ensayo conteniendo caldo Mue

ller-Hinton con glicerol, durante 3 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente, los tubos fueron congelados a -70°C.

La resiembra de las cepas se realizó en el medio selectivo de agar para estafilococos #110.

CONTROLES :

Para este estudio se trabajaron además de los 100 aislamientos, dos cepas control;

S. epidermidis ATCC 12228 (DIFCO LABORATORIES)

S. saprophyticus CCM 883 (ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN)

TABLA No. 2

PRODUCTOS PATOLOGICOS/ ENFERMEDADES DE BASE DE LAS 100 MUESTRAS
TRABAJADAS

PRODUCTOS PATOLOGICOS	PRINCIPALES ENFERMEDADES DE BASE
HEMOCULTIVOS	Septicemia, G.E.L.E., L.E.S., encefalitis bacteriana, problemas respiratorios (neumonía, hiperemia respiratoria), síndrome doloroso y febril, cirrosis hepática y biliar, infección.
LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO	Hidrocefalia, septicemia, neuroinfección, abscesos.
UROCULTIVOS	I.V.U., enterocolitis.
FARINGEOS	Problemas respiratorios (asma bronquial, bronquiectasia), faringitis, amigdalitis crónica.
NASAL	Control sanidad, sinusitis.
OTICO	Otitis.
PUNTA DE CATETER	Septicemia, postoperatorio, I.R.C., bronconeumonía, diabetes mellitus.
LIQUIDO DUODENAL Y PERITONEAL	G.E.L.E., peritonitis, I.R.C.
EXUDADO CERVICO VAGINAL Y ESPERMOCULTIVO	I.V.U., cervico vaginitis.
OTRAS SECRECIONES	Septicemia, infección, apendicectomía

G.E.L.E. = Gastroenteritis de lenta evolución
L.E.S. = Lupus eritematoso sistémico
I.V.U. = Infección vías urinarias
I.R.C. = Insuficiencia renal crónica

MATERIAL :

- Tubos de ensayo
- Tubos con tapón de rosca
- Probetas de 10 y 100 ml
- Matraces Erlenmeyer de 100 y 250 ml
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 250 ml
- Pipetas graduadas de 0.1, 0.5, 1, 2, 5 y 10 ml
- Cajas de Petri (vidrio y desechables)
- Filtros de 0.45 μ m
- Jeringas desechables
- Asa de inoculación
- Hisopos estériles
- Pipetas Pasteur
- Portaobjetos
- Bulbo para pipeta
- Microscopio compuesto
- Replicador de Steers

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO :

a. Caldo Mueller-Hinton (BIOXON DE MEXICO)

Se disuelven 21 gramos en un litro de agua destilada por calentamiento y se esteriliza 15 minutos a 116-121°C (12 a 15 -

libras de presión). Se vacían 3 mililitros en tubos de ensayo - con tapón de rosca. Se refrigeran a una temperatura de 4-10°C.

b. Agar de Mueller-Hinton (BIOXON DE MEXICO)

Se disuelven 38 gramos del polvo en un litro de agua destilada por calentamiento y se esteriliza 15 minutos a 116-121°C - (12 a 15 libras de presión). Se vacían 20 mililitros en cajas - de petri. Se refrigeran a una temperatura de 4-10°C.

c. Agar para estafilococos #110 (BIOXON DE MEXICO)

Se disuelven 149 gramos del polvo en un litro de agua destilada por calentamiento y se esteriliza 15 minutos a 116-121°C (12 a 15 libras de presión). Se distribuyen 20 mililitros en cajas de Petri. Se refrigeran a una temperatura de 4-10°C.

d. Aceite de inmersión

e. Equipo de Gram (cristal violeta, lugol, alcohol-acetona, safranina).

f. Peróxido de hidrógeno al 30% (MERCK)

g. Plasma humano

h. Agua destilada

i. Caldo rojo fenol y maltosa (BIOXON DE MEXICO)

Se disuelven 20 gramos del polvo en un litro de agua destilada y se esteriliza 15 minutos a 116-118°C (12 libras de presión). Se vacía 3 mililitros en tubos de ensayo. Se refrigeran a una temperatura de 4-10°C.

j. Caldo rojo fenol y manitol (BIOXON DE MEXICO)

Se disuelven 20 gramos del polvo en un litro de agua destilada y se esteriliza 15 minutos a 116-118°C (12 libras de presión). Se vacía 3 mililitros en tubos de ensayo. Se refrigeran a una temperatura de 4-10°C.

k. Base de caldo rojo fenol (BIOXON DE MEXICO)

Se disuelven 15 gramos del polvo en un litro de agua destilada y se le adiciona 5-10 gramos del carbohidrato requerido. Se esteriliza 15 minutos a 116-118°C (12 libras de presión). Se vacía 3 mililitros en tubos de ensayo. Se refrigeran a una temperatura de 4-10°C.

l. Carbohidrato D-Xilosa (BIOXON DE MEXICO)

m. Carbohidrato Lactosa (BIOXON DE MEXICO)

n. Medio básico para O/F (BIOXON DE MEXICO)

Se disuelven 10 gramos del carbohidrato glucosa por litro de medio básico para una concentración final del 1%. Se esteriliza 15 minutos a 116-118°C (12 libras de presión). Se vacía 5 mililitros en tubos con tapón de rosca. Se refrigeran a una temperatura de 4-10°C.

o. Carbohidrato Glucosa (BIOXON DE MEXICO)

p. Vaselina estéril

q. Etanol absoluto (MERCK)

r. Discos de novobiocina de 5 µg

- s. Discos de ácido nalidíxico de 30 µg
- t. Clindamicina (sal) (LABORATORIOS UPJOHN)
- u. Dicloxacilina (sal) (LABORATORIOS BRISTOL)

MÉTODOS :

PRUEBA DE LA CATALASA.

PRINCIPIO.- La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los carbohidratos. Si se deja acumular, el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas. La catalasa transforma al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

TECNICA.

Prueba en portaobjeto :

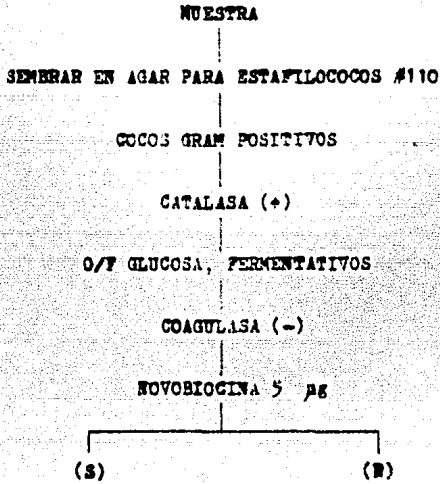
1. Con una aguja de punción o un palillo aplicador con la punta aguzada transferir células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjeto.
2. Añadir 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%.

INTERPRETACION.

1. Prueba positiva : aparición rápida y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia.
2. Prueba negativa : no hay formación de burbujas (no se forma O_2).

- s. Discos de ácido nalidixico de 30 µg
- t. Clindamicina (sal) (LABORATORIOS UPJOHN)
- u. Dicloxacilina (sal) (LABORATORIOS BRISTOL)

ESQUEMA DE IDENTIFICACION UTILIZADO



	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
MANITOL	-	◊ > -
MALTOZA	+	◊
LACTOSA	+	+
XILOSA	-	-
ACIDO HALIDIXICO (30 µg)	S	R

MÉTODOS :

PRUEBA DE LA CATALASA.

PRINCIPIO.- La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los carbohidratos. Si se deja acumular, el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas. La catalasa transforma al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

TECNICA.

Prueba en portaobjeto :

1. Con una aguja de punción o un palillo aplicador con la punta aguzada transferir células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjeto.
2. Añadir 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%.

INTERPRETACION.

1. Prueba positiva : aparición rápida y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia.
2. Prueba negativa : no hay formación de burbujas (no se forma O_2).

PRUEBA DE LA COAGULASA.

PRINCIPIO.- La coagulasa se halla presente en dos formas, "libre" y "fija", cada una de las cuales posee diferentes propiedades que requieren el uso de técnicas separadas : prueba en portaobjetos y prueba en tubos.

Coagulasa libre (prueba en tubos) : la coagulasa libre es una sustancia semejante a la trombina, que se halla presente en los filtrados de cultivos. Cuando una suspensión de bacterias - productoras de coagulasa se mezcla en partes iguales con una pequeña cantidad de plasma en un tubo de ensayo, se forma un coágulo visible como consecuencia de la utilización de los factores de coagulación del plasma de manera similar a cuando se añade trombina.

TECNICA.

Prueba en tubos (coagulasa libre) :

1. Colocar asépticamente 0.5 ml de plasma (humano) en el fondo de un tubo estéril.
2. Añadir 0.5 ml de un cultivo puro de 18 a 24 horas en caldo del microorganismo por investigar.
3. Mezclar por rotación suave del tubo, evitando remover o agitar el contenido.
4. Incubar el tubo a 37°C. Observar la formación de un coágulo visible.

INTERPRETACION.

La reacción se considera positiva ante cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo. La reacción se observa mejor inclinando el tubo. Si es positiva, el coagulo o gel permanece en el fondo del tubo.

Se recomienda observar el tubo a intervalos de 30 minutos durante las primeras 4 horas de la prueba.

PRUEBA DE OXIDACION-FERMENTACION.

PRINCIPIO.- Determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un carbohidrato.

TECNICA.

1. Crecimiento de un cultivo puro de 18 a 24 horas.
2. Inocular un par de tubos O-F para cada microorganismo en estudio.
3. Con una aguja de inoculación transferir por picadura un inóculo denso a ambos tubos, aproximadamente hasta 0.3 mm del fondo.
4. Cubrir uno de los tubos con 1 a 2 mililitros de vaselina estéril, para excluir el oxígeno.
5. Incubar ambos tubos a 37°C durante 48 horas o más.

INTERPRETACION.

	Tubo abierto	Tubo sellado
1. Oxidación (O)	Amarillo (A)	Verde (-)
2. Fermentación (F)	Amarillo (A)	Amarillo (A)
3. Ni fermentación ni oxidación (-)	Verde (-)	Verde (-)
4. Fermentación y oxidación (O+F)	Amarillo (A)	Amarillo (A)

A= ácido ; -- sin cambio o reacción alcalina

PRUEBAS DE FERMENTACION DE LOS CARBOHIDRATOS

PRINCIPIO.- Determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar (degradar) un carbohidrato específico incorporado a un medio base, produciendo ácido, o ácido con gas visible.

TECNICA.

1. Pasar la aguja o el asa sobre el crecimiento de un cultivo puro.
2. Asépticamente, introducir la aguja o el asa en cada uno de los medios que contienen el carbohidrato.
3. Agitar suavemente cada tubo. No dejar que el líquido salpi que la tapa del tubo.
4. Incubar a 37°C durante 18 a 24 horas.

INTERPRETACION.

1. Prueba positiva : Condiciones ácidas (pH = 6.8) con la aparición de un color amarillo en todo el medio.
2. Prueba negativa : Condiciones alcalinas del medio visualiza-

das por el color rosa-rojizo del mismo (19,21).

PRUEBA DE LA RESISTENCIA A LA NOVIOBIOCINA Y AL ACIDO NALIDIXICO.

PRINCIPIO.- Determinar la susceptibilidad a la novobiocina (16) y al ácido nalidixico (9,14,28), con el fin de diferenciar al Staphylococcus saprophyticus de otras especies coagulasa negativa clínicamente importantes.

TECNICA.

Método de Bauer-Kirby :

1. Se transfieren pocas colonias (3-8) bien aisladas del microorganismo a probar, del cultivo original, a un tubo de ensayo que contenga aproximadamente 4 mililitros de caldo Mueller-Hinton.
2. Incubar el tubo de 2 a 5 horas para producir una suspensión bacteriológica de opacidad moderada (estándar 0.5 de Mac Farland).
3. La suspensión del caldo bacteriano se aplica uniformemente en tres planos sobre la superficie del medio (agar Mueller-Hinton) con una torunda estéril de algodón. El exceso de suspensión se escurre de la torunda haciéndola girar contra la pared del tubo antes de inocular las placas.
4. Después que se ha secado el inóculo (2-3 minutos), se coloca el disco sobre el agar mediante pinzas expuestas a la llama y se presiona suavemente hacia abajo con objeto de asegurar

un buen contacto. Una vez colocado el disco sobre el agar, éste no debe moverse o colocarse en otro lugar.

5. Incubar 24 horas a 37°C. Debe evitarse el exceso de incubación.

INTERPRETACION.

Medir los halos de inhibición con compases de calibración, vernier, regla o plantilla diseñada para este propósito. El punto final de todos los sistemas de lectura será una completa -- inhibición del crecimiento determinada visualmente, ignorando -- colonias tenues, o muy pequeñas que pueden ser observadas con -- minuciosidad (8).

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.

PRINCIPIO.- Determinar la susceptibilidad de un microorganismo a los antibióticos, por medio de pruebas estandarizadas in vitro.

TECNICA.

Método de dilución en placa de agar :

Preparación de las diluciones de antibióticos.

Se preparan las diluciones del antibiótico a partir de la solución stock, calculando el volumen de antibiótico para agregar a 100 mililitros de agar y obtener las concentraciones deseadas en la placa.

Preparación de las diluciones en placa.

1. Se esteriliza una cantidad suficiente de matraces con agar - (Mueller-Hinton) según el número de placas que se preparen - (para una placa se precisan alrededor de 20 mililitros del - medio) y se mantienen en baño maria a 50°C antes de agregar la droga.
2. Se agrega la cantidad necesaria de las diferentes soluciones a cada matraz, se agitan y se vacían en las placas.
3. Se deja solidificar el agar y se guardan en el refrigerador a 5°C hasta el momento de su empleo.

Inoculación de las placas :

1. Cuatro o cinco colonias representativas de los microorganismos a probar se inoculan en 3 o 4 mililitros de un medio de caldo apropiado (caldo Mueller-Hinton, por ejemplo) y se ajustan al enturbiamiento del estándar 0.5 de Mac Farland - (esto se logra incubando los tubos de 2 a 5 horas) para asegurar el crecimiento denso, casi confluyente, en una placa de de control que no contenga antibiótico.
2. La superficie de agar de las placas que contienen las diluciones de antimicrobianos y la placa de control que no contiene antimicrobianos se inoculan en "gota" (sin extender) - con una asa calibrada para depositar 0.001 a 0.002 mililitros o con el aparato replicador de Steers. El replicador puede - adquirirse con una cabeza de aluminio que lleva 32 o 36 inoculadores, los cuales dejan salir alrededor de 0.01 milili -

tros de suspensión bacteriana.

3. Una parte de la suspensión en caldo ajustada se lleva por pipeta al pocito correspondiente de la placa de "inseminación" (contraparte de la cabeza de aluminio), y luego los inóculos se recogen y se transfieren suavemente a la superficie del agar.
4. Las placas que contienen la menor concentración de antimicrobiano deben sembrarse primero. Se recomienda destinar cuatro espacios de cada placa para cepas control.
5. Las placas de control deben sembrarse al último para asegurar que hubo microorganismos viables en todo el procedimiento.
6. Las placas de agar inoculadas se dejan reposar sin tocarlas hasta que las gotas de inóculo están completamente absorbidas.
7. Las placas se incuban a 35°C durante 16 a 20 horas.

INTERPRETACION.

La concentración inhibidora mínima (MIC) representa la menor concentración de antimicrobiano capaz de producir inhibición total de crecimiento. No se tendrá en cuenta un crecimiento demasiado escaso o cuando se observen solamente una o dos colonias (15, 16, 35).

CALCULOS :

Preparación de la solución stock de : DIGLOXACILINA

Datos:

Volumen requerido : 100 ml
Concentración : 1 000 µg/ml
Potencia biológica : 970 µg/mg

Peso (mg) = $\frac{\text{volumen (ml)} \times \text{concentración (µg/ml)}}{\text{potencia (µg/mg)}}$

$$\text{Peso} = \frac{100 \text{ ml} \times 1\,000 \text{ µg/ml}}{970 \text{ µg/mg}} = \frac{103.09}{0.103} \text{ mg} = 0.103 \text{ g}$$

Solvente : Agua

1 ml de solución stock + 7 ml de agua = 8 ml de solución stock
(1 000 µg/ml) (125 µg/ml)

Preparación de placas.

Concentraciones : 0.06 0.08 0.1 0.12 0.14 0.2
0.4 0.8 1.0 2.0 4.0

Cálculo del volumen para cada concentración :

$$V_1 = \frac{0.06 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \text{ µg/ml}} = 0.048 \text{ ml}$$

$$V_2 = \frac{0.08 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \text{ µg/ml}} = 0.064 \text{ ml}$$

$$V_3 = \frac{0.1 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.08 \text{ ml}$$

$$V_4 = \frac{0.12 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.09 \text{ ml}$$

$$V_5 = \frac{0.14 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.11 \text{ ml}$$

$$V_6 = \frac{0.2 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.16 \text{ ml}$$

$$V_7 = \frac{0.4 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.32 \text{ ml}$$

$$V_8 = \frac{0.8 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.64 \text{ ml}$$

$$V_9 = \frac{1.0 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.8 \text{ ml}$$

$$V_{10} = \frac{2.0 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 1.6 \text{ ml}$$

$$V_{11} = \frac{4.0 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 3.2 \text{ ml}$$

CALCULOS :

Preparación de la solución stock de : CLINDAMICINA

Datos :

Volumen requerido : 100 ml
Concentración : 1 000 µg/ml
Potencia biológica : 526 µg/mg

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{volumen (ml)} \times \text{concentración (µg/ml)}}{\text{potencia (µg/mg)}}$$

$$\text{Peso} = \frac{100 \text{ ml} \times 1\,000 \text{ µg/ml}}{526 \text{ µg/mg}} = \frac{190.11 \text{ mg}}{0.190 \text{ g}}$$

Solvente : Agua

1 ml de solución stock + 7 ml de agua = 8 ml de solución stock
(1 000 µg/ml) (125 µg/ml)

Preparación de placas.

Concentraciones :	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2
	0.4	0.8	1.0	2.0	4.0	

Cálculo del volumen para cada concentración :

$$V_1 = \frac{0.02 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \text{ µg/ml}} = 0.016 \text{ ml}$$

$$V_2 = \frac{0.04 \text{ µg/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \text{ µg/ml}} = 0.032 \text{ ml}$$

$$V_3 = \frac{0.06 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.048 \text{ ml}$$

$$V_4 = \frac{0.08 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.064 \text{ ml}$$

$$V_5 = \frac{0.1 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.08 \text{ ml}$$

$$V_6 = \frac{0.2 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.16 \text{ ml}$$

$$V_7 = \frac{0.4 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.32 \text{ ml}$$

$$V_8 = \frac{0.8 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.64 \text{ ml}$$

$$V_9 = \frac{1.0 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 0.8 \text{ ml}$$

$$V_{10} = \frac{2.0 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 1.6 \text{ ml}$$

$$V_{11} = \frac{4.0 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ ml}}{125 \mu\text{g/ml}} = 3.2 \text{ ml}$$

RESULTADOS

Durante un periodo de seis meses (mayo a octubre de 1965), se trabajaron un total de 12 060 muestras en todo el laboratorio de microbiología, de donde se reportaron 886 aislamientos de estafilococos coagulasa negativa provenientes la mayoría de ellos de secreciones. Esto, sin dejar de observar aislamientos de productos importantes como lo es la sangre, líquido cefalorraquídeo y orina (Tabla No. 3, Gráfica 1).

De los 886 aislamientos detectados como estafilococos coagulasa negativa, se eligieron al azar sólo 100 cepas para ser trabajadas, por lo que la determinación del sexo y del tipo de pacientes no influyó en gran medida sobre los resultados obtenidos (Figuras 1 y 2).

Dentro de los resultados que se obtuvieron a partir de las primeras determinaciones (Tabla No.4), se observa que el 100% de las cepas fueron negativas a la coagulasa, lógicamente; el 100% fueron positivas a la prueba de la catalasa; 13% de las cepas produjeron ácido a partir de manitol, 97% a partir de maltosa y 95% produjeron ácido a partir de lactosa, mientras que el 1% de las cepas estudiadas produjeron ácido a partir de xilosa.

Por otra parte, en la determinación de oxidación-fermentación de glucosa (O/F), 7 cepas fueron oxidativas, 90 cepas fermentativas, y 3 fueron inertes.

TABLA No. 3

FRECUENCIA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVA EN UN PERIODO DE SEIS MESES (MAYO-OCTUBRE) AISLADOS EN EL LABORATORIO CLINICO

PRODUCTO PATOLOGICO	No. DE MUESTRAS TRABAJADAS	ECN* AISLADOS	%
SANGRE	1 544	112	7.3
LCR*	696	22	3.2
SECRECIONES ¹	2 353	457	19.4
ORINA	5 447	58	1.0
PARINGEOS, NASALES Y OTICOS	2 020	237	11.7

* ECN = ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVA
LCR = LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

¹ SECRECIONES : CATETERES, LIQUIDO PERITONEAL, LIQUIDO DUODENAL, ESPERMA, EXUDADO CERVICO VAGINAL Y OTRAS SECRECIONES

GRAFICA 1
FRECUENCIA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVA EN UN PERIODO DE
SEIS MESES (MAYO-OCTUBRE) AISLADOS EN EL LABORATORIO CLINICO

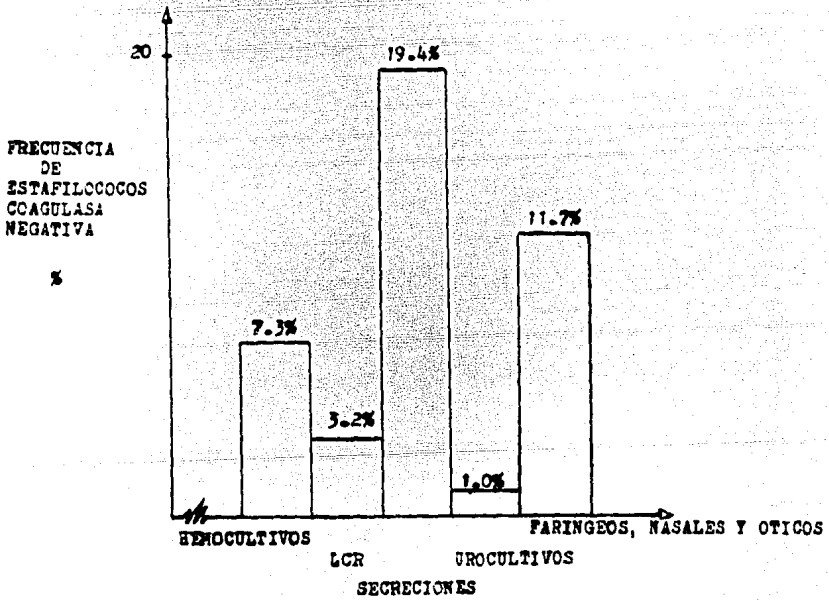


FIGURA 1 DETERMINACION DEL SEXO DE LOS PACIENTES EN LAS 100 MUESTRAS ANALIZADAS.

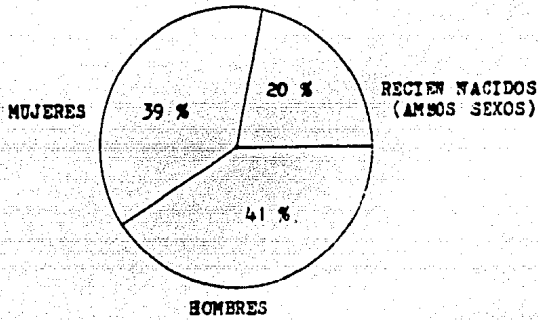


FIGURA 2 DETERMINACION DEL TIPO DE LOS PACIENTES EN LAS 100 MUESTRAS ANALIZADAS.

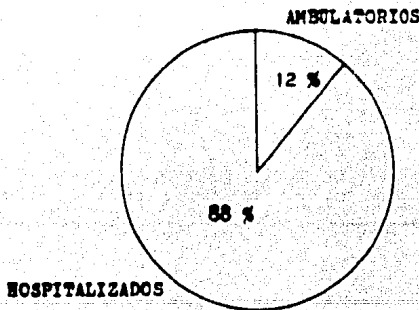


TABLA No. 4

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS
PARA LAS 100 MUESTRAS ANALIZADAS

DETERMINACION	RESULTADOS		
	POSITIVOS (+) %	NEGATIVOS (-) %	
COAGULASA	0	100	
CATALASA	100	0	
ACIDO, AEROBICAMENTE, A PARTIR DE :			
MANITOL	13	87	
MALTOSA	97	3	
LACTOSA	95	5	
XILOSA	1	99	
	(O) %	(F) %	(-) %
OXIDACION-FERMENTACION	7.0	90.0	3.0

(O)= OXIDACION; (F)= FERMENTACION; (-)= NI FERMENTACION NI OXIDACION

* Las pruebas anteriores se efectuaron en base a las tablas expuestas en el Apéndice que se presenta al final de este trabajo.

De acuerdo con la tabla anterior, se reconocieron 90 microorganismos del género Staphylococcus, 7 Micrococcus y 3 que no pudieron ser identificados, por lo que sólo se trabajaron 90 cepas (Staphylococcus) para la prueba de resistencia a la novobiocina (5 µg).

Por otra parte, debido a que no se disponían de datos bibliográficos sobre el diámetro de zona de inhibición de la novobiocina para la especie S. saprophyticus y del ácido nalidíxico para la especie S. epidermidis, la siguiente tabla revela datos obtenidos por el presente trabajo para la prueba de resistencia a la novobiocina y al ácido nalidíxico. Estos datos fueron obtenidos probando las cepas tipo S. epidermidis ATCC 12228 y S. saprophyticus CCM 883.

DIAMETRO DE ZONA (mm)		
	Novobiocina (5 µg)	Acido nalidíxico (30 µg)
<u>S. epidermidis</u>	22-36	8-15
<u>S. saprophyticus</u>	0-21	0

DETERMINACION	DIAMETRO DE ZONA	
	0-21 mm	22-36 mm
RESISTENCIA A LA NOVOBIOCINA	30 cepas	60 cepas

Después de realizadas todas las pruebas, a excepción de la resistencia al ácido nalidíxico, los probables S. saprophyticus identificados correspondieron a 30 muestras. Para verificar esta identificación y al mismo tiempo introducir otra prueba taxonómica, sólo a estas 30 muestras se les aplicó la prueba de resistencia al ácido nalidíxico. Se comprobó que sólo 24 cepas, efectivamente eran S. saprophyticus.

La siguiente tabla expresa los resultados de esta prueba, en comparación con la de la resistencia a la novobiocina.

TABLA No. 5

S. saprophyticus IDENTIFICADOS POR MEDIO DE SU RESISTENCIA A LA NOVOSIOCINA Y ACIDO NALIDIXICO

NUMERO DE CEPAS	SUSCEPTIBILIDAD A DISCO (DIAMETRO DE ZONA)	
	NOVOSIOCINA 5 µg	AC. NALIDIXICO 30 µg
4/30	0	0
*1/30	11	12
1/30	13	0
4/30	15	0
*1/30	15	16
1/30	16	0
4/30	17	0
2/30	18	0
7/30	20	0
*4/30	20	12-14
1/30	21	0

* Cepas consideradas como S. epidermidis por su susceptibilidad al ácido nalidixico.

TABLA No. 6

ORIGEN DE AISLAMIENTO DE LOS S. saprophyticus IDENTIFICADOS
A PARTIR DE LAS 100 MUESTRAS ANALIZADAS

PRODUCTO PATOLOGICO	TOTAL DE MUESTRAS TRABAJADAS	<u>S.</u> <u>saprophyticus</u>
SANGRE	52	9
LCS*	12	2
ORINA	6	3
SECRECIONES (CATETERES, LIQUIDO PERITONEAL, LI- QUIDO DUODENAL, ESPERMA, EXUDADO CERVICO VAGINAL Y OTRAS SECRECIONES)	18	7
FARINGEOS, NASALES Y OTI COS	12	3

* LCS = LIQUIDO CEPALORRAQUIDEO

TABLA No. 7

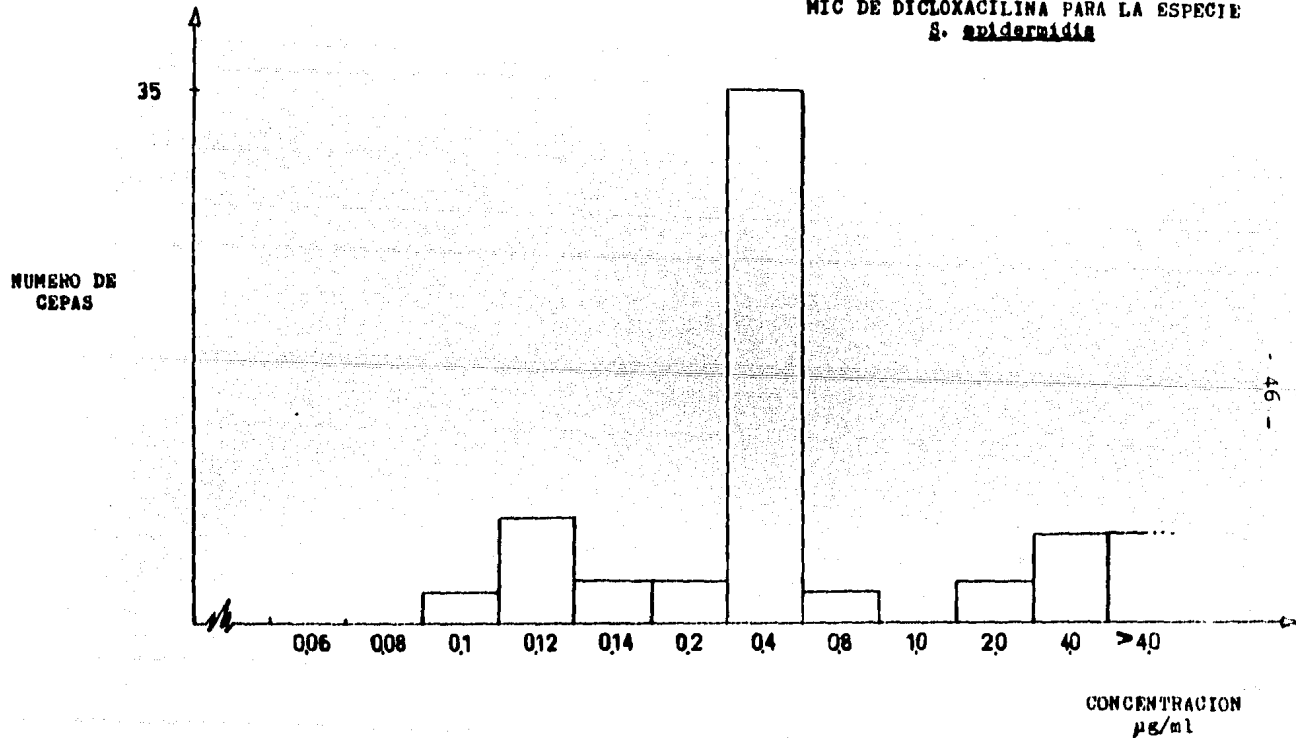
CONCENTRACION INHIBIDORA MINIMA (MIC) DE DICLOXACTINA

CONCENTRACION (µg/ml)	<i>S. epidermidis</i> *		<i>S. saprophyticus</i> *	
	No. de cepas inhibidas	% de inhibición	No. de cepas inhibidas	% de inhibición
0.06	0/67	0	1/25	4
0.08	0/67	0	0/25	0
0.10	2/67	2.9	1/25	4
0.12	7/67	10.4	3/25	12
0.14	3/67	4.4	3/25	12
0.2	3/67	4.4	0/25	0
0.4	35/67	52.2	12/25	48
0.8	2/67	2.9	0/25	0
1.0	0/67	0	0/25	0
2.0	3/67	4.4	1/25	4
4.0	6/67	8.9	0/25	0
8.0	6/67	8.9	4/25	16

* Incluidas cepas tipo : *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus* CCM 883

GRAFICA 2

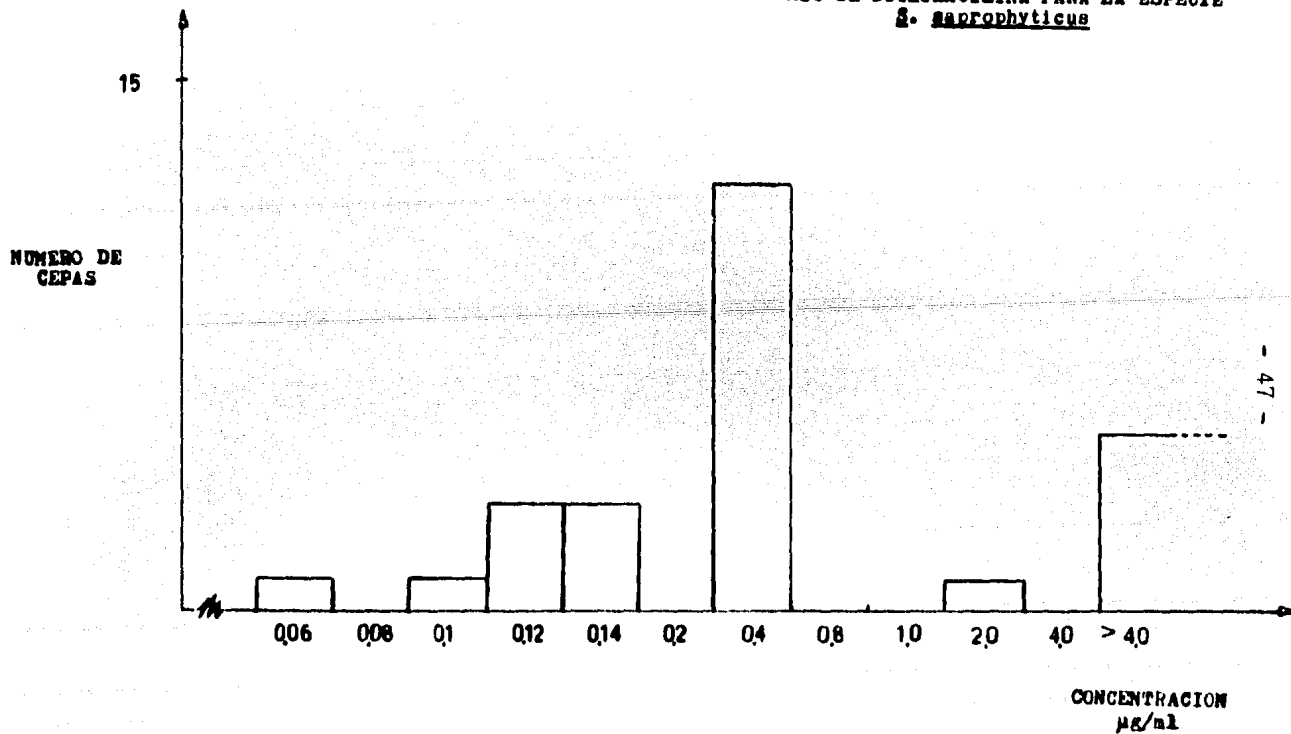
MIC DE DICLOXACILINA PARA LA ESPECIE
S. epidermidis



MIC : CONCENTRACION INHIBIDORA MINIMA

GRAFICA 3

MIC DE DICLOXACILINA PARA LA ESPECIE
S. saprophyticus



- 47 -

MIC : CONCENTRACION INHIBIDORA MINIMA

TABLA No. 8

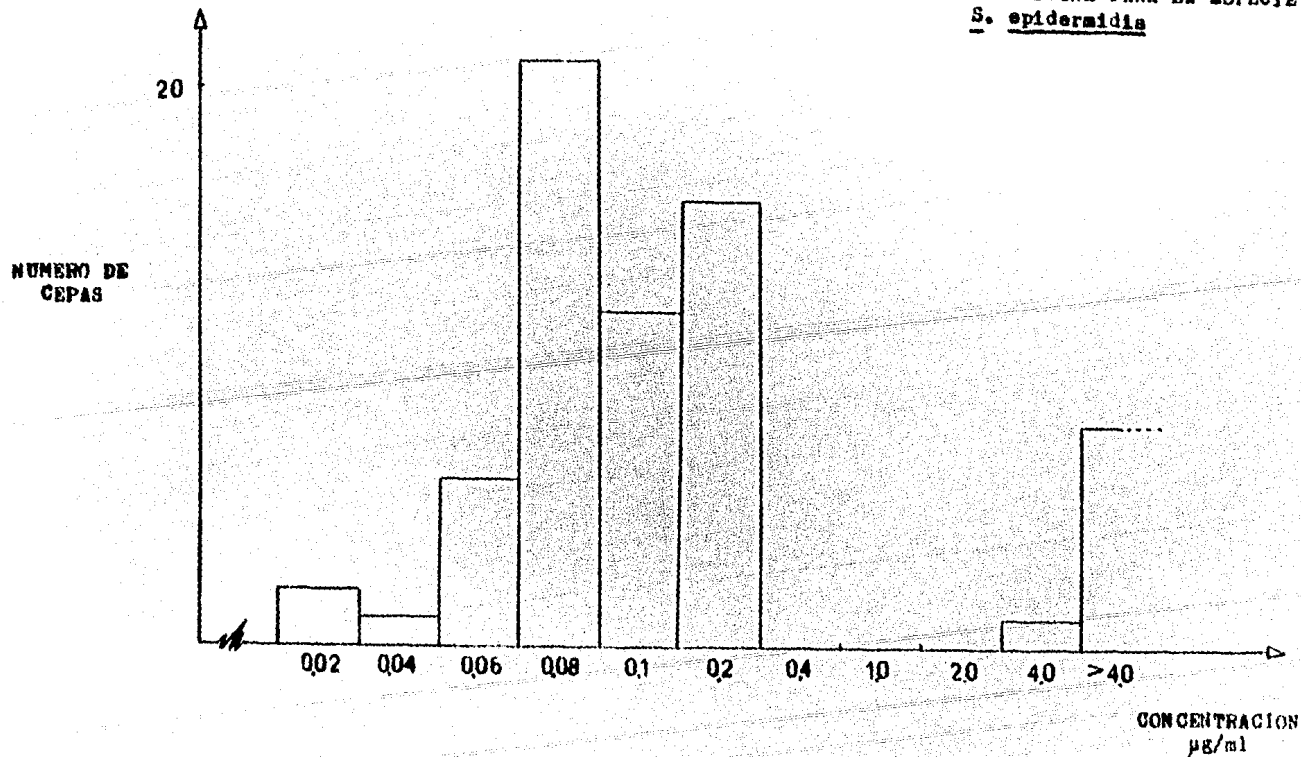
CONCENTRACION INHIBIDORA MINIMA (MIC) DE CLINDAMICINA

CONCENTRACION (µg/ml)	<i>S. epidermidis</i> *		<i>S. saprophyticus</i> *	
	No. de cepas inhibidas	% de inhibición	No. de cepas inhibidas	% de inhibición
0.02	2/67	2.9	1/25	4
0.04	1/67	1.5	0/25	0
0.06	6/67	8.9	3/25	12
0.08	21/67	31.3	13/25	52
0.1	12/67	17.9	3/25	12
0.2	16/67	23.8	2/25	8
0.4	0/67	0	0/25	0
1.0	0/67	0	0/25	0
2.0	0/67	0	0/25	0
4.0	1/67	1.5	0/25	0
4.0	8/67	11.9	3/25	12

*Incluidas cepas tipo : *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus* CCM 383

GRAFICA 4

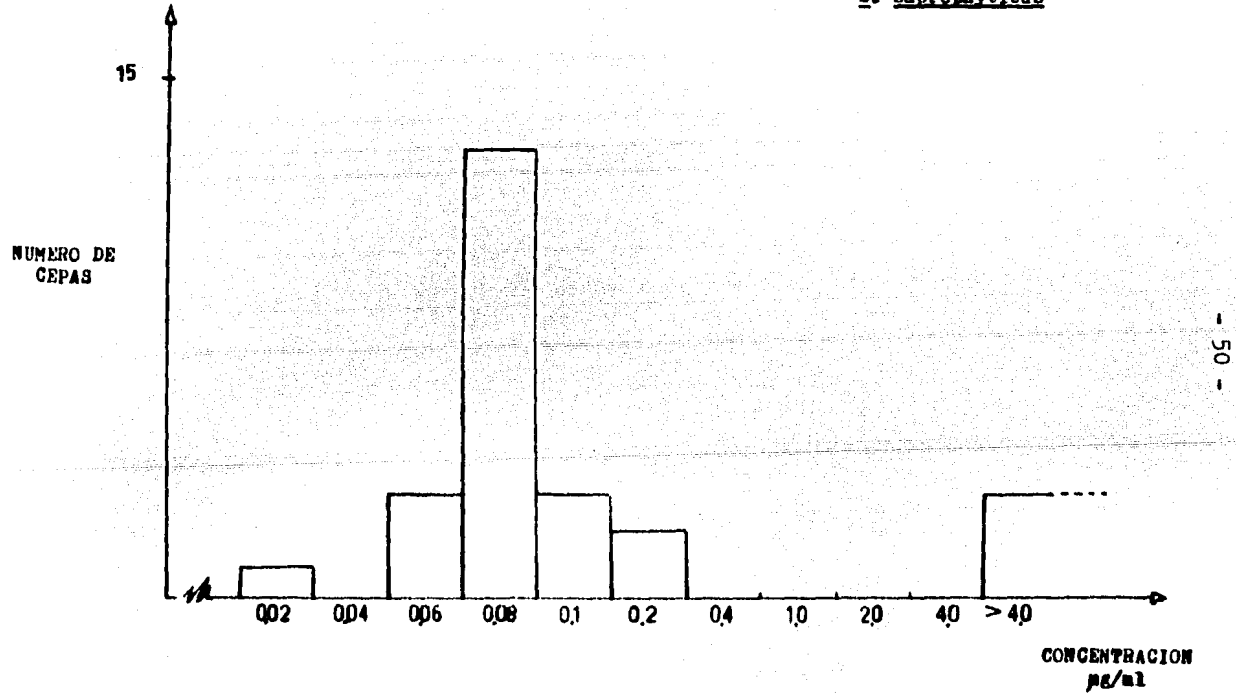
MIC DE CLINDAMICINA PARA LA ESPECIE
S. epidermidis



MIC : CONCENTRACION INHIBIDORA MINIMA

GRAFICA 5

MIC DE CLINDAMICINA PARA LA ESPECIE
S. saprophyticus



MIC : CONCENTRACION INHIBIDORA MINIMA

D I S C U S I O N

Racientemente, se ha demostrado que estafilococos coagulasa negativa (*S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, principalmente) han sido aislados como agentes causales de infecciones, especialmente del tracto urinario y no se descarta su papel patógeno en otras partes del organismo humano. Fundamentalmente se les ha relacionado con varias infecciones, como por ejemplo :

- a) Septicemias posteriores a canulación, incluyendo nutrición parenteral.
- b) Endocarditis en pacientes con enfermedad reumática y/o cirugía cardíaca.
- c) Infecciones urinarias especialmente en mujeres jóvenes. Manipulaciones urinarias : citoscopia, caterizaciones.
- d) Infecciones de heridas incluso postoperatorias. Otitis media y otras infecciones (23).

Con respecto al presente trabajo, la frecuencia de aislamientos de estafilococos coagulasa negativa en el laboratorio clínico se observó en mayor cantidad en las muestras de secreción : catéteres, líquido peritoneal, líquido duodenal, espermatozoides, exudado cervicovaginal y secreciones en general (Table No. 3).

Por otra parte, las muestras escogidas para este estudio provenían principalmente de hemocultivos (52 cepas) y secrecio

nes (18 cepas) de pacientes hospitalizados (88%) y de consulta externa (12%). Dichas muestras pertenecían a pacientes femeninos (39%), masculinos (41%) y recién nacidos de ambos sexos (20%).

El análisis de conjunto llevado a cabo : coagulasa, catalasa, fermentación de glucosa (O/F), utilización de carbohidratos (manitol, maltosa, lactosa y xilosa), resistencia a la novobiocina y ácido nalidíxico, permitió diferenciar en este grupo de 100 cepas a 66 Staphylococcus epidermidis, 24 Staphylococcus saprophyticus, 7 Micrococcus spp y 3 cepas que no pudieron ser identificadas.

Cabe señalar, que en la prueba de resistencia a la novobiocina y al ácido nalidíxico debido a que no se disponían de datos bibliográficos sobre la zona de inhibición para ambas especies (S. epidermidis y S. saprophyticus), fue necesario ensayar varias veces con las cepas control (S. epidermidis ATCC 12228 y S. saprophyticus CCM 883) para tener un criterio y poder establecer el diámetro de zona de inhibición a cada especie (ver resultados de la prueba de resistencia a la novobiocina y al ácido nalidíxico).

De los 24 S. saprophyticus el 75% de las cepas provenían de pacientes hospitalizados, mientras que el 25% restante correspondió a pacientes de consulta externa.

Con lo que respecta a la determinación de la concentración

oillas y fáciles de realizar en un laboratorio clínico, es posible llevar a cabo la diferenciación de un microorganismo - importante como lo es el Staphylococcus saprophyticus.

inhibidora mínima (MIC) de dicloxacilina y clindamicina para las especies coagulasa negativa S. epidermidis y S. saprophyticus, además de ser una fase complementaria del presente trabajo, por sí solo representa un informe de laboratorio que indica la susceptibilidad de un microorganismo hacia un agente antimicrobiano en especial y esto de antemano es un gran apoyo que se le brinda al médico y por supuesto al mismo paciente en su recuperación.

En los resultados que se obtuvieron en esta fase, se observó que la MIC de dicloxacilina tanto para el S. epidermidis y S. saprophyticus, se encuentra a una concentración menor de 0.3 µg/ml, inhibiéndose la mayor parte de las cepas a la concentración de 0.4 µg/ml con porcentajes de 52.2% y 48%, respectivamente (Tabla No. 7).

Asimismo, la MIC de clindamicina para la especie S. epidermidis y S. saprophyticus se encuentra a una concentración menor de 0.2 µg/ml, inhibiéndose la mayor parte de las cepas a la concentración de 0.08 µg/ml con porcentajes de 31.3% y 52%, respectivamente (Tabla No. 8).

Por otra parte, las cepas que no se inhibieron a la concentración más alta con la que se trabajó (4 µg/ml) posiblemente sean cepas resistentes cuya inhibición se encuentre a una concentración elevada.

Por lo tanto, sólo resta afirmar que a base de pruebas sen

C O N C L U S I O N E S

- (1) La mayor frecuencia de aislamientos de estafilococos coagulasa negativa se observó en las muestras provenientes de secreciones (catéteres, líquido peritoneal, líquido duodenal, esperma, exudado cervico vaginal y secreciones en general).
- (2) La mayor parte de los estafilococos coagulasa negativa están representados por el Staphylococcus epidermidis.
- (3) Las pruebas de resistencia a la novobiocina y al ácido nalidixico deben considerarse como pruebas importantes de rutina para diferenciar el Staphylococcus saprophyticus del Staphylococcus epidermidis.
- (4) El Staphylococcus epidermidis y Staphylococcus saprophyticus deben aislarse por lo menos dos veces en hemocultivos para poder ser considerados como agentes etiológicos de la enfermedad.
- (5) La concentración inhibidora mínima (MIC) de dicloxacilina y clindamicina para las especies Staphylococcus epidermidis y Staphylococcus saprophyticus se encuentra a concentraciones bajas.

(6) El Staphylococcus epidermidis y Staphylococcus saprophyti-
qua son las especies coagulasa negativa implicadas en varios
procesos infecciosos, por lo que su identificación es impor-
tante para establecer la epidemiología y patogenicidad de -
las mismas.

R E S U M E N

Se estudiaron 100 aislamientos de estafilococos coagulasa negativa, procedentes de distintos productos patológicos (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido duodenal, catéteres, esperma, exudado cervico vaginal y secreciones en general), de pacientes hospitalizados y de consulta externa del Hospital General Centro Médico La Raza durante un período de seis meses, con el fin de determinar la frecuencia de aislamientos de estafilococos coagulasa negativa en muestras clínicas, así como el diferenciar al Staphylococcus saprophyticus del Staphylococcus epidermidis en el laboratorio clínico.

Por medio del análisis de conjunto (coagulasa, catalasa, fermentación de glucosa, utilización de carbohidratos, resistencia a la novobiocina y al ácido nalidixico) fue posible diferenciar en este grupo de 100 cepas : 66 Staphylococcus epidermidis, 24 Staphylococcus saprophyticus, 7 Micrococcus spp y 3 cepas que no pudieron ser identificadas con las pruebas efectuadas.

Asimismo, se observó que el mayor número de aislamientos de estafilococos coagulasa negativa provienen de muestras de secreciones.

Por otra parte, se determinó la concentración inhibitoria mínima (MIC) para las especies Staphylococcus epidermidis y

Staphylococcus saprophyticus, observándose que la MIC de dicloxacilina para ambas especies se encuentra a una concentración menor de 0.8 µg/ml, mientras que la MIC de clindamicina también para ambas especies, está a una concentración menor de 0.2 µg/ml.

A P E N D I C E

TABLAS DE IDENTIFICACION

TABLA No. 9

PROPIEDADES DIFERENCIALES DEL GENERO DE LA FAMILIA
MICROCOCCACEAE

	Micrococcus	Staphylococcus	Planococcus
CELULAS ESFERICAS, GRAMPOSITIVAS	+	+	+
DISPOSICION: RACIMOS IRREGULARES	+	+	-
TETRADAS	v	-	+
FERMENTACION DE GLUCOSA *	-	+	-
CITOCROMOS	+	+	+
CATALASAS: HEMO	+	+	+
NO HEMO	-	-	-
FORMACION DE PEROXIDO DE HIDROGENO	-	-	-
MOVILIDAD	-	-	+
PIGMENTO AMARILLO-MARRON	-	-	+
CONTENIDO G + C DE DNA (MOL%)	66-75	30-40	39-52

- +, mayoría (90% o más) de cepas positivas; -, mayoría (90% o más) de cepas negativas; v, inconstante (en una cepa puede ser algunas veces positivo y otras negativo).

* Crecimiento y producción ácida anaeróbica de glucosa, con excepción - de cepas de Staphylococcus saprophyticus que fermentan la glucosa débilmente

TABLA No. 10

DIFERENCIACION DE STAPHYLOCOCCUS Y MICROCOCCUS

	Staphylococcus	Micrococcus
CRECIMIENTO ANAEROBICO, FERMENTACION DE GLUCOSA	♦♦	-
SENSIBILIDAD A LA LISOSTAFINA (200 µg/ml)	♦	-
PRODUCCION AEROBICA DE ACIDO A PARTIR DEL GLICEROL, EN PRESENCIA DE 0.4 µg/ml DE ERITROMICINA	♦	-
PARED CELULAR :		
PUNTES CRUZADOS PENTAPEPTIDICOS O HEXA - PEPTIDICOS CON CONTENIDO DE GLICINA	♦	-
ACIDOS RIBITOL O GLICEROL TRICOICO	♦	-
DNA : G + C CONTENIDO (MOL %)	30-40	66-75

♦, 90% o más de cepas positivas; -, 90% o más de cepas negativas.

TABLA No. 11
 CARACTERISTICAS QUE DISTINGUEN ESPECIES DEL GENERO STAPHYLOCOCCUS

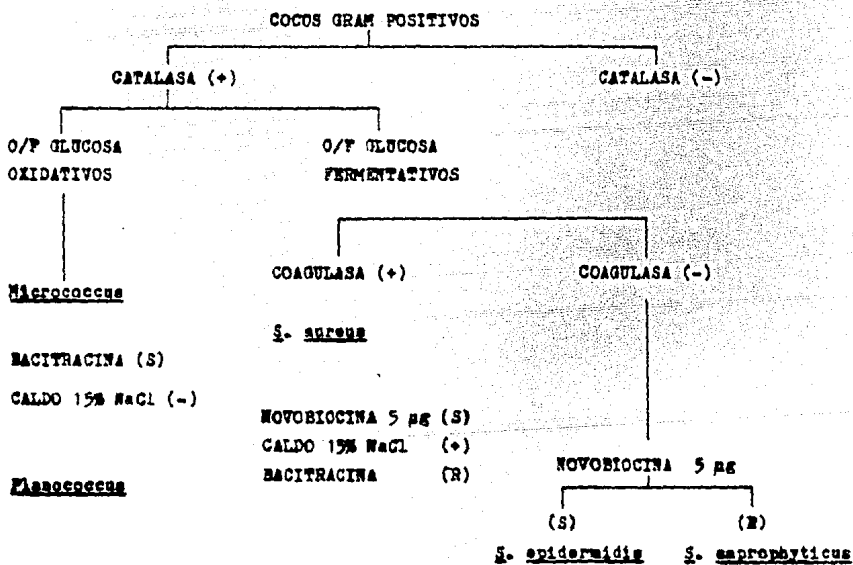
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
COAGULASA	+	-	-
CRECIMIENTO Y FERMENTACION ANAEROBICOS DE GLUCOSA	+	+	+
MANITOL:			
ACIDO AEROBICAMENTE	+	-	+/-
ACIDO ANAEROBICAMENTE	+	-	-
ALFA - TOXINA	+	-	-
ENDONUCLEASAS RESISTENTES AL CALOR	+	-	-
BIOTINA PARA EL CRECIMIENTO	-	+	NP
PARED CELULAR:			
MIBITOL	+	-	+
GLICEROL	-	+	+/-
PROTEINA A	+	-	-
SENSIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA ¹	S	S	R

• +, 90% o más de cepas positivas; -, 90% o más de cepas negativas;
 +/-, algunas cepas positivas, algunas negativas; NP, no probadas.

• R = MIC > 2.0 µg/ml; S = MIC < 0.6 µg/ml

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
 8th edition, 1974.

ESQUEMA DE IDENTIFICACION



B I B L I O G R A F I A

- (1) Aldrige KE, Wistratton C, Patterson LS, Evans ME, Hodges RL. Comparison of the STAPH-IDENT System with a conventional method for species identification of urine and blood isolates of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1983; 17:516-520.
- (2) Almeida RJ, Jorgensen JH. Rapid determination of Novobiocin resistance of coagulase-negative staphylococci with the MS-2 System. J Clin Microbiol 1983;17:558-560.
- (3) Archer LG, Karchmer AW, Vidhniavsky N, Johnston JL. Plasmid pattern analysis for the differentiation of infecting from noninfecting Staphylococcus epidermidis. J Infect Dis 1984; 149:913-920.
- (4) Baird-Parker. A classification of staphylococci and micrococci from world-wide sources. J General Microbiol 1963;38: 363-387.
- (5) Brooker BE, Fuller R. The adhesion of coagulase negative staphylococci to human skin and its relevance to the bacterial flora of milk. J Appl Bacteriol 1984;57:325-332.
- (6) Buchanan RE, and Gibbons NE (eds): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. 1974, Williams & Wilkins Co., Baltimore U.S.A.

- (7) Coagulase-negative staphylococci. Lancet 1981;1:139-140.
- (8) Davidsohn I, Henry JB. Todd-Sanford : Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Sexta edición 1983, Salvat Editores S. A., Barcelona España.
- (9) Fung CJ, McKinley G, Tyburski MB, Berman M, Goldstein J. Growth of coagulase-negative staphylococci on colistin-nalidixic acid agar and susceptibility to polymyxin. J Clin Microbiol 1984;19:714-716.
- (10) García MP, Martí C, De la Torre J, Fernández C, Marín P, - García HJ, Martínez PR. Interés clínico de los estafilococos coagulasa-negativa. Enf Infec y Microbiol Clin 1985;3: 105-109.
- (11) Giger O, Charilaou GC, Cundy KR. Comparison of the API Staph-Ident and DMS Staph-Trac Systems with conventional methods used for the identification of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1984;19:68-72.
- (12) Gutiérrez L, Menes I, García ML, Moreno B. Sensitivity to lysostaphin a criterion for the identification of staphylococci from animal origin. J Appl Bacteriol 1981;50:541-549.
- (13) Harrington BJ, Gaydos M. Five-hour Novobiocin Test for differentiation of coagulase negative staphylococci. J Clin Microbiol 1984;19:279-280.

- (14) Joklik WK, Willett HP, Amos DB. ZINSSER : Microbiología. - 17a edición 1983, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina.
- (15) Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. : Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas Color. Tercera edición 1983, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina.
- (16) Lennette EH, Balows A, Truant JP, Hausler WJ. : Manual de Microbiología Clínica. Tercera edición 1982, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina.
- (17) Litter M. : Farmacología Experimental y Clínica. Sexta edición 1980, Editorial El Ateneo, Buenos Aires Argentina.
- (18) Lowy FD, Hammer SM. Staphylococcus epidermidis infections. Ann Intern Med 1983;99:834-839.
- (19) Mac Fadin JF. : Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. Williams & Wilkins Co., Baltimore U.S.A., 1980.
- (20) Meales BM, Bartholomew WR, Amsterdam D. Staphylococcus simulans septicemia in a patient with chronic osteomyelitis and pyarthrosis. J Clin Microbiol 1985;21:255-257.
- (21) Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos BBL. Primera edición en español 1974, Editores Asociados S.A., México D. F.

- (22) Mersik FJ, Brake S. Species Identification and Susceptibility to 17 antibiotics of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from clinical Specimens. J Clin Microbiol 1982; 15:640-645.
- (23) Paredes PL, Valenzuela PE, Del Canto EH, Oddo BD. Estudio bacteriológico de 160 cepas de Staphylococcus coagulasa negativo de origen humano. Rev Lat-amer Microbiol 1982;24: 1-6.
- (24) Parisi TJ. Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of Staphylococcus epidermidis. Microbiol Rev 1985;49:126-139.
- (25) Paulson FD. Comparison of Cinoxacin and Nalidixic acid in patients with cystitis. Urol 1982;20:138-140.
- (26) Pitlik SD, Rios A, Hersh EM, Bolivar R, Mansell PWA. Polymicrobial brain abscess in a homosexual man with Kaposi's sarcoma. South Med J 1984;77:271-272.
- (27) Placzek M, Whitelaw A. Early and late neonatal septicemia. Arch Dis Child 1983;58:728-731.
- (28) Preiksaitis JK, Thompson L, Hardeng GKM, Marrie TJ, Hoban S, Ronald AR. A comparison of the efficacy of nalidixic acid and cephalexin in bacteriuric women and their effect on fecal and periurethral carriage of Enterobacteriaceae. J Infect Dis 1981;143:603-608.

- (29) Pruzanski W, Saito S, Nitzan DW. The influence of lysostaphin on phagocytosis, intracellular bactericidal activity, and chemotaxis of human polymorphonuclear cells. J Lab Clin Med 1983;102:298-305.
- (30) Shrestha TL, Darrell JH. Urinary infection with coagulase-negative staphylococci in a teaching hospital. J Clin Pathol 1979;32:299-302.
- (31) Siebert WT, Moreland N, Williams TW. Sinergy of Vancomycin plus Cefazolin or Cephalotin against Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis. J Infect Dis 1979;139:452-457.
- (32) Stevens DL, Jones C. Use of trehalose-manitol-phosphatase agar to differentiate Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus from other coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1984;20:977-980.
- (33) Tuazon CU, Miller, Reather. Clinical and microbiologic aspects of serious infections caused by Staphylococcus epidermidis. Scand J Infect Dis 1983;15:347-360.
- (34) Wallmark G, Arremark I, Telander B. Staphylococcus saprophyticus a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatient. J Infect Dis 1978;138:791-797.
- (35) William JM, Sydney MF. BAILEY-SCOTT : Diagnóstico Microbiológico. Sexta edición 1983, Editorial Médica Panamericana,

Buenos Aires Argentina.

- (36) Youmans PG, Paterson YP, Sommers MH. The biologic and clinical basis of infectious diseases, 1975, W.B. Saunders Company, Philadelphia U.S.A.