



40
2-9
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVA
EN UROCULTIVOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A:

ENRIQUE ANTONIO MORAN ROSAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1986



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.
Resumen	1
Introducción	1
Objetivos	10
Material y Métodos	11
Resultados	28
Discusión	36
Conclusiones	44
Bibliografía	46

R E S U M E N .

Fueron analizados cien aislamientos de estafilococos coagulasa negativa, provenientes del cultivo de las muestras de orina de pacientes internos y de consulta externa de los Hospitales de Infectología y Especialidades del Centro Médico "La Raza". Se determinó la frecuencia de especies dentro de ese grupo de microorganismos, encontrándose el predominio del Staphylococcus hominis (31%), el Staphylococcus epidermidis (23%), el Staphylococcus haemolyticus (14%) y una especie no registrada en esta frecuencia hasta antes de este trabajo, el Staphylococcus auricularis. La especie reportada en la literatura con una alta incidencia en infecciones del tracto urinario, el Staphylococcus saprophyticus, fue encontrada con un bajo porcentaje (4%), sin embargo coincidió con la población que presenta la mayor frecuencia para dicha afección (pacientes femeninos ambulatorios). El método de clasificación empleado (Kloos W.B., 1982), ofreció una aceptable accesibilidad de substratos. Los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa fueron evaluados en su patrón de sensibilidad contra diez antimicrobianos, obteniéndose un alto porcentaje de susceptibilidad para la Furadantina (100%), Amikacina (87%) y la Dicloxacilina (71%). El mayor esquema de resistencia fue observado para el Acido Nalidíxico.

INTRODUCCION.

El género Staphylococcus, pertenece a la familia Micrococcaceae la cual se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza como saprófitos de vida libre, parásitos y formas patógenas. Como grupo estos microorganismos son cocos gram positivo, esféricos, que se presentan aislados, en pares, tétradas, grupos, o racimos irregulares (4). Dentro del género Staphylococcus, el Staphylococcus aureus ha sido el patógeno reconocido y se ha distinguido bioquímicamente del resto del género en base a la producción de coagulasa, fermentación del manitol y la presencia de la proteína A en la pared celular (33). Subsecuentemente, los estafilococos que no son identificados dentro de la especie del S. aureus, se les ha designado a groso modo como estafilococos coagulasa negativa (38).

En ocasiones, los estafilococos coagulasa negativa son agrupados incorrectamente, en forma general, dentro de la especie del S. epidermidis. En la octava edición del Manual Bergey's, se encuentran clasificadas tres especies dentro del género Staphylococcus: S. aureus, S. epidermidis y S. saprophyticus, diferenciados principalmente por la producción de coagulasa, endonucleasa termolabile, presencia de glicerol, ribitol y proteína A en la pared celular y la resistencia a la novobiocina. También son mencionados cuatro biotipos para el S. epidermidis (12).

Hoy en día, como resultado de amplios análisis fenotípicos y estudios de hibridización del DNA (24), han sido reconocidas aproximadamente veinte especies dentro del género Staphylococcus (14) doce de las cuales son comúnmente encontradas dentro de la flora mucocutánea del humano (31). Estas especies presentan ciertas características comunes al género: Cocos gram positivo, agrupados en racimo, inmóviles, anaerobios facultativos y producen catalasa (38) y una considerable diversidad bioquímica que los hace relativamente fácil de diferenciar en el laboratorio (11, 15, 19, 28, 48).

Con el sistema de clasificación trabajado por Kloos (31), los estafilococos coagulasa negativa pueden ser diferenciados en una variedad de especies. Este esquema, el cual utiliza las pruebas de fermentación de carbohidratos, distingue cinco especies novobiocina-resistentes: Staphylococcus cohnii, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus lentus, Staphylococcus sciuri, y Staphylococcus xylosus, así como siete especies novobiocina sensibles: Staphylococcus simulans, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus warneri, Staphylococcus auricularis, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus capitis y Staphylococcus hominis.

El aislamiento de los estafilococos coagulasa negativa de las diferentes muestras clínicas humanas remitidas a los laboratorios para su cultivo, es generalmente considerado de poca o ninguna -- significancia clínica, por lo cual la identificación del género -- hasta el nivel de especie no se lleva a cabo de rutina. Esto es -- debido en gran medida a que los estafilococos coagulasa negativa -- han sido históricamente registrados como saprófitos y su desarrollo en el cultivo de productos humanos es frecuentemente considerado como el de contaminante o evidencia de una errónea colección de la muestra (4).

Sin embargo, ahora los estafilococos coagulasa negativa son -- reconocidos con mayor frecuencia como patógenos oportunistas (14, 31), implicados frecuentemente en septicemias (7, 43), infecciones en válvulas cardíacas artificiales (53), endocarditis bacteriana subaguda (3, 8, 30), infecciones en prótesis vasculares y articulares (23, 40), peritonitis en pacientes que se someten a continuas diálisis peritoneales (21, 32), e infecciones del tracto urinario (25, 27, 29), ojos (49), oídos (17) y heridas (57).

Por otra parte, los aislamientos de la familia Micrococcaceae desarrollados en cultivos procesados en los laboratorios clínicos de las diferentes instituciones de salud y asistencia pública del país, no son diferenciados como género dentro de la familia y por ende, tampoco son identificados en su especie dentro del grupo -- de estafilococos coagulasa negativa, únicamente son reportados --

bajo la rúbrica de este último grupo, lo cual les resta la importancia clínica que pueden llegar a tener en un momento dado dentro de la epidemiología y terapéutica infecciosas.

Evidentemente, es importante la distinción de los géneros Staphylococcus y Micrococcus, dada la mencionada implicación patogénica del primero y la inocuidad del segundo, siendo éste a su vez de gran utilidad como indicador de contaminación (13).

Dentro de las especies de estafilococos coagulasa negativa, el Staphylococcus saprophyticus ha sido documentado en varios reportes (26, 27, 45) como causante de infecciones agudas del tracto urinario, llegando a ser considerado como el segundo agente etiológico, después de la Escherichia coli, en pacientes jóvenes del sexo femenino con este tipo de padecimiento (29, 60).

Cabe mencionar, que las infecciones en el tracto urinario se encuentran entre las infecciones humanas más comunes, siendo responsables de una considerable morbilidad (34). Este padecimiento, se presenta a cualquier edad, desde los infantes, hasta las personas de edad madura o senil. Entre los más pequeños de edad, incluyendo los recién nacidos y lactantes, el predominio de esta enfermedad se nota en el sexo masculino; en la edad escolar y madura, la frecuencia es mayor en el sexo femenino, llegando hasta un 10 y 15% en las mujeres mayores de 60 años. También se nota con alguna frecuencia (hasta del 1%) en ancianos del sexo masculino, debido a la hipertrofia prostática; las mujeres grávidas están a su vez incluidas con una frecuencia que va del 4 al 10% (34).

Es importante referir, que en el Laboratorio Clínico del Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza", los estafilococos coagulasa negativa representan el 9.63% de los aislamientos positivos en los cultivos de orina procesados en dicho laboratorio (incluyendo las muestras de pacientes internos y externos del mismo hospital y las del Hospital de Especialidades del mismo centro médico). Este porcentaje sólo es superado por la frecuencia de aislamientos de la familia Enterobacteriaceae, con el 77.5% para tales muestras.

En este aspecto, resulta necesario conocer las principales características de la afección urinaria de tipo infeccioso, para tomar las medidas necesarias en el establecimiento de un diagnóstico certero.

La infección del tracto urinario, se define como la presencia de microorganismos en una muestra de orina correctamente colectada, pudiendo localizarse en alguna de las porciones del tracto urinario y ser sintomática o asintomática (10). En base a esto, las infecciones en las vías urinarias se han clasificado, en términos generales, en tres grupos: Uretritis, Cistitis y Pielonefritis. Aunque útil, desde el punto de vista clínico, esta clasificación no es aplicable a todos los casos, pues con frecuencia se ven pacientes con infección que abarca varias porciones del tracto urinario (34).

Los síntomas predominantes y por lo regular exclusivos en la uretritis, son la disuria (dificultad para la micción) y odinuria (dolor o ardor al orinar); en la cistitis, además de los síntomas anteriores, se agregan otros, tales como la enuresis, dolor supra púbico y fiebre generalmente elevada. Para la pielonefritis, pueden presentarse los mismos datos observados en las infecciones del tracto urinario bajo, cuando las lesiones son extensas, pero no es situación frecuente. Los síntomas varían de acuerdo con la edad, pero predominan la fiebre, dolor abdominal y lumbar, la pérdida de peso y el ataque al estado general en los casos graves (10).

Las vías de acceso de los gérmenes al tracto urinario son dos: Hematógena y Ascendente (61). La primera constituye el mecanismo habitual en el recién nacido durante episodios septicémicos, en individuos mayores con infecciones sistémicas graves y en pacientes inmunocomprometidos (34). La vía ascendente es el mecanismo más frecuentemente observado. En las mujeres, el meato uretral y la uretra normalmente albergan Lactobacillus spp., Staphylococcus epidermidis, Corynebacterium spp., y algunos anaerobios, pero no flora aeróbica gram negativa, la cual cuando no se practican ade-

cuados hábitos de higiene puede encontrarse en el vestibulo vaginal e invadir la uretra y porciones superiores del tracto urinario. En el hombre, existe la evidencia de que el saco prepucial y posiblemente la uretra jueguen un papel importante en la patogenia (10).

Como ya se había comentado, la mayoría de las infecciones en las vías urinarias son causadas por bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, siendo la Escherichia coli el representante principal de este grupo como agente causal (34). Para este organismo, el tubo digestivo es el principal reservorio y en condiciones favorables puede desarrollarse la infección. Se han descrito algunos factores de virulencia para la invasividad de la Escherichia coli en el tracto urinario, como son: la frecuencia y cantidad del antígeno capsular K y la adherencia a las células -- uroteliales mediada por la presencia de pilis en la superficie celular de la bacteria (10, 61).

En este contexto, del Staphylococcus saprophyticus aun no se tiene la certeza de la existencia de un reservorio endógeno. En un estudio realizado en la población de mayor incidencia para este germen en infecciones del tracto urinario (mujeres jóvenes), el S. saprophyticus fue aislado con muy poca frecuencia de la uretra de dichos pacientes, solamente en el 2% de cien pacientes de quienes se cultivo la muestra de orina uretral (45). En otro trabajo, Wallmark y col. (60), en el cultivo de muestras uretrales de 100 pacientes (44 hombres y 66 mujeres), no encontraron S. saprophyticus. Estos mismos investigadores, analizando un elevado número de muestras rectales, obtuvieron estafilococos en 206 de estas muestras y sólo en una se demostró la presencia del S. saprophyticus. Sin embargo, Hovelius y Mard (25), reportaron un 7% de aislamientos de S. saprophyticus en muestras uretrales de 56 hombres sanos y un 6% del mismo organismo en muestras periuretrales de 80 mujeres jóvenes sanas. En vista de estos datos poco análogos, es aún prematuro establecer el origen endógeno de la infección en el tracto urinario causada por el S. saprophyticus.

En relación al tropismo de dicho organismo por el tracto urinario, el cual es el único sistema en el que se sabe causa enfermedad, se intenta explicar por la capacidad de adherencia que -- presenta este organismo a las células uretrales y periuretrales, la cual ha mostrado ser aún mayor que la de patógenos establecidos del tracto urinario, como la E. coli (25). Dicha capacidad, que en la E. coli está mediada por fimbrias, al parecer está mediada por un oligosacárido presente en la membrana celular del S. saprophyticus (25).

El diagnóstico de las infecciones en vías urinarias puede hacerse por el hallazgo y cuantificación de las bacterias en el cultivo de la orina, el cual a la vez establecerá el diagnóstico diferencial de la uretritis causada por agentes no infecciosos, tales como traumatismos, jabón y drogas. La ausencia de gérmenes en el urocultivo y los datos obtenidos en el interrogatorio del paciente, permiten establecer la causa en la mayoría de los casos (34). Por tanto, se aprecia claramente la importancia del cultivo de la orina en el diagnóstico de dicha afección, de aquí que la realización en forma adecuada de la secuencia del mismo, desde la toma de muestra hasta la interpretación del resultado, sea requerida para la elaboración de un diagnóstico confiable.

Debido a que la orina puede ser contaminada por la microflora residente de la uretra y la vagina, la colección del producto debe ser realizada con la debida asepsia. En el hombre, la glándula del pene puede ser aseada con jabón y agua, y secada con gasas estériles. En la mujer, separando los pliegues de la vagina se realiza una limpieza cuidadosa del meato uretral de adelante hacia atrás con gasas y jabón. No se deben emplear desinfectantes para el aseo debido a que pueden disminuir la cuenta bacteriana en el caso de que existan bacterias en la muestra de orina. Una vez realizada la asepsia, se deja pasar la primera parte de la micción (10 a 20 ml de orina, "muestra uretral") y la orina que se emite a continuación se recoge directamente en un frasco esterilizado (muestra del "flujo medio") (4).

Cuando se carece de la cooperación del paciente, puede ser necesaria la cateterización o la aspiración suprapúbica. En esta última se omite la contaminación uretral o vaginal. La orina normal de la vejiga es estéril y cuando una muestra de orina tomada directamente de la vejiga presenta microorganismos, la infección es evidente aún si se presentan en una baja concentración (10).

Dado que la orina es un medio favorable para la mayoría de los gérmenes patógenos urinarios, es muy importante que el cultivo se efectúe dentro de la hora que sigue a su recolección, o que se mantenga en refrigeración a cuatro grados centígrados hasta el momento de realizarlo.

La determinación cuantitativa de las bacterias en el urocultivo, ha establecido un parámetro de significancia clínica en las infecciones del tracto urinario. Para determinar una bacteriuria como significativa, el criterio más aceptado es que el conteo en el cultivo produzca 100,000 (10^5) o más bacterias por mililitro de orina de una muestra colectada asépticamente (3, 8, 48). Este elevado número es debido en parte a la multiplicación bacteriana en la orina de la vejiga hasta que es evacuada.

Una muestra obtenida adecuadamente que produzca un conteo de 10^5 unidades formadoras de colonia por mililitro de orina en el cultivo, en el 80% de los casos tiene un diagnóstico real de infección en vías urinarias; si dos muestras consecutivas contienen el mismo organismo en concentraciones de al menos 10^5 unidades formadoras de colonia por mililitro, existe un 95% de probabilidad de que este presente la infección (10). Sin embargo, Glieckman y col. (20), afirman que en hombres asintomáticos, una sola muestra de orina evacuada asépticamente con un conteo bacteriano de 10^5 por mililitro se puede considerar como diagnóstico de infección en el tracto urinario. Stamm y col. (54), sugieren que el cultivo con cantidades mayores o iguales a 10^2 bacterias coliformes por mililitro, puede ser considerado como el criterio para la infección urinaria en mujeres sintomáticas, con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 85% para dicho criterio.

Por todo esto, la interpretación del conteo colonial debe hacerse cuidadosamente tomando en cuenta todas las variables que pueden alterar tal determinación (flujo rápido de la orina, terapéutica supresora, pH de la orina, colección de la muestra, etc.) para llegar a una conclusión real a través de dicho parámetro.

Existen varios métodos cuantitativos para el cultivo de las muestras de orina: método de estriación directa con asa calibrada método de la placa fraccionada, y algunos métodos comerciales en placas de plástico cubiertas con medio de cultivo y substratos para tal efecto (10).

El método más comúnmente utilizado por la mayoría de los Laboratorios de Microbiología Clínica para el cultivo de la orina, es el de estriación directa con asa calibrada. Este método se basa en el empleo de un asa de las que se utilizan comúnmente en bacteriología para inocular y estriar placas con medio de cultivo, con la diferencia de que el asa empleada en urocultivos tiene un diámetro calculado para inocular 0.001 o 0.01 ml de la muestra: el asa se introduce en la orina bien mezclada y se inoculara sobre la superficie del medio de cultivo, trazando una línea recta en el centro, efectuando después varias estriaciones muy próximas entre sí formando un ángulo de 90° con la línea original, las placas son incubadas por 24 horas a 35°C y el recuento de las colonias, si es que hubo desarrollo, se multiplica por 1,000 o por 100 dependiendo del asa utilizada, con lo que se determina la cantidad de unidades formadoras de colonia por mililitro de la muestra de orina (4).

El método de la placa fraccionada, aunque más sensible, es menos utilizado (por el exceso de tiempo y material empleados), se realiza con la inoculación seriada de varias diluciones de la muestra (inóculo de 1 ml, diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) sobre cajas de petri esterilizadas a las que posteriormente se agrega el medio de cultivo fundido y enfriado a 50°C , realizando la homogenización del inóculo y el medio por agitación leve de las cajas. Después de solidificado el medio, las placas se incuban a 35°C --

por 24 horas. El número total de unidades formadoras de colonia - por mililitro de muestra se obtiene multiplicando la cantidad de colonias por la dilución empleada (4).

Una vez obtenido el diagnóstico de una infección en el tracto urinario, el paso a seguir es contrarrestar tal anomalía a través de un tratamiento medicamentoso. La terapia de elección inicial - se basa principalmente en el conocimiento general de los microorganismos de mayor incidencia en tal afección (18), en los patrones de susceptibilidad o resistencia adquirida vigentes en el momento de escoger el antimicrobiano (dados los constantes cambios en tales patrones, debido al uso generalizado de algunos antimicrobianos y a los mecanismos de transmisión de resistencia entre los microorganismos)(51) y en el grado de severidad clínica de la infección (34).

La valoración de la respuesta terapéutica casi siempre es posible realizarla en forma clínica, sin embargo, cuando esto no es factible, es necesario practicar un nuevo cultivo y si hay desarrollo de gérmenes, cambiar la terapéutica a la luz del organismo identificado y de su sensibilidad antibiótica.

En el caso de los estafilococos coagulasa negativa, por ser de reciente atención, los antecedentes acerca de su esquema de sensibilidad no son extensos (9) y la determinación de tal característica in vitro puede ser de utilidad en la integración de un criterio terapéutico futuro.

O B J E T I V O S .

1. Identificar las especies de estafilococos coagulasa negativa aislados en cultivos de orina de las muestras remitidas al Laboratorio Clínico del Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza".
2. Establecer la frecuencia de especie de los estafilococos -- coagulasa negativa en urocultivos, con atención especial al Staphylococcus saprophyticus.
3. Determinar la utilidad del esquema de identificación empleado, tomando en cuenta principalmente su accesibilidad comercial y las aportaciones clínicas del mismo.
4. Realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa.

MATERIAL Y METODOS.

Las cien cepas de estafilococos coagulasa negativa empleadas - en el presente estudio fueron aisladas de las muestras de orina - remitidas al Laboratorio Clínico del Hospital de Infectología pa - ra su cultivo, provenientes de pacientes internos y de consulta - externa del mismo Hospital y del Hospital de Especialidades del - Centro Médico "La Raza" I.M.S.S.

1. Cultivo de las Muestras.

Las muestras de orina fueron cultivadas sobre placas de agar - Soya-Trypticasa* (Bioxon) como medio nutritivo, en el cual se -- apreció el desarrollo de los estafilococos coagulasa negativa, y en placas de agar Eosina-Azul de Metileno* (Bioxon) como medio se - lectivo y solo de importancia para los aislamientos pertencien - tes a la familia Enterobacteriaceae, aunque en ocasiones también - se observó desarrollo de estafilococos sobre éste.

El método de siembra empleado fue el de estriación directa - con asa calibrada; con un inóculo de 0.01 ml (diámetro interno -- del asa 0.4 cm). La incubación se realizó por 18 a 24 h a 35°C y al término de ésta las colonias desarrolladas se contaron y multi - plicaron por 100 para estimar el número de unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra.

2. Cuantificación de Leucocitos.

Los leucocitos en la muestra de orina fueron cuantificados -- utilizando una cámara de Neubauer, reportando el resultado en can - tidad de leucocitos por milímetro cúbico de orina.

Técnica:

- a) La cámara fue llenada con la muestra de orina bien mezclada y los leucocitos fueron contados dentro de los cuatro cuadros de los extremos de la cuadrícula.

3. Identificación del Género Staphylococcus.

Inicialmente, los aislamientos fueron identificados como miembros de la familia Micrococcaceae, por su apariencia colonial, tinción de Gram (morfología y agrupamiento celular) y producción de catalasa. Haciendo la diferenciación principalmente con el género Streptococcus

	<u>Staphylococcus</u>	<u>Micrococcus</u>	<u>Streptococcus</u>
Tinción de Gram	+	+	+
Agrupamiento	cocos aislados, racimos de uvas característicos	cocos aislados racimos irregulares, conglomerados cubicos.	diplococos, - cocos aislados, en pares o cadenas características
Catalasa	+	+	-
Pigmentación Colonial	blanco, amarillo, dorado	blanco, amarillo, rosa	Translúcidas
Tamaño de la Colonia (24 h)	2 - 3 mm	2 - 3 mm	< 2 mm (puntiformes)

Características diferenciales de la familia Micrococcaceae y el género Streptococcus (42).

A) Prueba de la Catalasa. Esta prueba se utiliza para determinar la presencia de la enzima catalasa en los microorganismos. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y -- agua. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los hidratos de carbono, el cual si se deja acumular, es letal para las células bacterianas (33).

Reactivo:

- Peróxido de Hidrógeno al 30%.

Técnica:

- a) Con un asa de inoculación se recogió el centro de una colonia pura de 18 a 24 h de cultivo y se transfirió a un portaobjetos de vidrio.
- b) Fue agregada una gota del reactivo sobre el organismo del - portaobjetos.
- c) La formación inmediata de burbujas visibles (O_2) se interpretó como una prueba positiva.
- d) Se emplearon controles durante la realización de la prueba.

Teniendo los organismos identificados como miembros de la familia Micrococcaceae, fueron diferenciados como género por medio de las siguientes pruebas: óxido-fermentación de la glucosa (O/F glucosa), presencia de la enzima oxidasa y características coloniales y de agrupamiento celular.

	<u>Staphylococcus</u>	<u>Micrococcus</u>
O/F Glucosa	Fermentación	Oxidación
Pigmentación colonial	blanco, amarillo dorado.	blanco, amarillo rosa.
Oxidasa	-	+
Agrupamiento celular	cocos aislados, en pares, racimos de uvas característicos	cocos aislados, en racimos irregulares conglomerados cúbicos característicos

Características diferenciales de la familia Micrococcaceae (5,16,42)

B) Oxido-Fermentación de la Glucosa. Esta prueba se emplea para determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de la glucosa. El ciclo fermentativo principal es el de Ender-Meyerhof, requiriendo la fosforilación de la glucosa como paso inicial. En el proceso de oxidación se hace necesaria la presencia de oxígeno o un compuesto inorgánico como aceptor terminal de electrones (42).

Medio empleado:

- O/F Basal Medium*. Difco Laboratories, Detroit Michigan USA.
- Dextrosa. J.T. Baker S.A.

Técnica:

- a) De un cultivo puro de 18 a 24 h fue tomado un inóculo y se picaron con él los dos tubos de O/F hasta el fondo. Uno de los tubos estaba sellado con una capa de aceite mineral.
- b) Se incubaron a 35°C por 24 a 48 horas.
- c) La producción de ácido se observó por la formación de una coloración amarilla mediada por el vire del indicador azul de bromotimol presente en el medio.

- d) La acidez únicamente en el tubo no cubierto se interpretó - como oxidación del carbohidrato.
- e) La acidez en el tubo sellado o en ambos se interpretó como fermentación del carbohidrato.
- f) Se corrieron controles durante la realización de la prueba.

C) Prueba de la Oxidasa. Esta reacción está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. El mecanismo está formado por una serie de reacciones en las que un componente autooxidable del sistema citocromo bacteriano es el catalizador final. Pueden substituirse los receptores electrónicos finales por substratos artificiales en cualquier sitio de la cadena de transporte de -- electrones donde actúan como reductantes del sistema c-citocromo-oxidasa. Estos substratos artificiales son incoloros o coloreados según el estado en el que se encuentren. La reacción oxidasa positiva muestra un producto coloreado (42).

Reactivo:

- N-N-Dimetil-p-fenilendiamina. Al 1% en solución acuosa.

Técnica:

- a) Se colocó un trozo de 6 cm² de papel filtro en una caja de petri.
- b) Fueron agregadas dos a tres gotas del reactivo en el centro del papel.
- c) Sobre el papel impregnado se hizo un extendido, de una colonia aislada de un cultivo de 18 a 24 horas.
- d) La reacción positiva se interpretó por la formación de un color que iba de lavanda a púrpura negruzco intenso, en el termino de 5 a 10 segundos.
- e) Fueron utilizados controles durante la prueba.

Una vez identificados los aislamientos dentro del género Staphylococcus, únicamente se consideraron las cepas coagulasa negativa, determinadas por la técnica de coagulasa en tubo.

D) Prueba de la Coagulasa. Esta prueba se utiliza para comprobar la facultad de un organismo de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa. Tal enzima, es producida por el Staphylococcus aureus, presentandola en dos formas: coagulasa fija y coagulasa libre, cada una de las cuales posee diferentes propiedades que requieren el uso de técnicas separadas para su determinación.

Coagulasa Fija (prueba en portaobjetos). También conocida como "factor de aglutinación", está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivos. Los hilos de fibrina formados entre las células bacterianas suspendidas en plasma, provocan su aglutinación, indicada por la presencia de agregados visibles en el portaobjetos.

Coagulasa libre (prueba en tubo). Esta substancia, semejante a la trombina, sí se encuentra 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 la coagulación del plasma de manera similar a cuando se añade trombina (33).

Reactivo:

- Plasma Humano.

Técnica:

- a) Se colocaron en un tubo de ensayo 0.5 mililitros de plasma, y una buena cantidad de una colonia pura le fue agregada.
- b) Sin agitar, se suspendió suavemente el organismo en el plasma.

- d) El tubo fue incubado a 35°C por cuatro horas, observando cada 30 minutos si se producía la coagulación.
- e) La observación se efectuaba inclinando con cuidado el tubo sin agitarlo ni sacudirlo.
- f) Si después de cuatro horas no había coágulo visible se dejaba incubando hasta el día siguiente.
- g) Cualquier grado de coagulación se consideró como prueba positiva.
- h) Se emplearon controles durante la realización de la prueba.

4. Caracterización de los estafilococos coagulasa negativa.

Los aislamientos identificados como estafilococos coagulasa negativa, fueron diferenciados en su especie siguiendo el criterio propuesto por Kloos (31), en el cual se emplean las pruebas de fermentación de carbohidratos, hemólisis, reducción del nitrato, presencia de la enzima ureasa y susceptibilidad a la novobiocina.

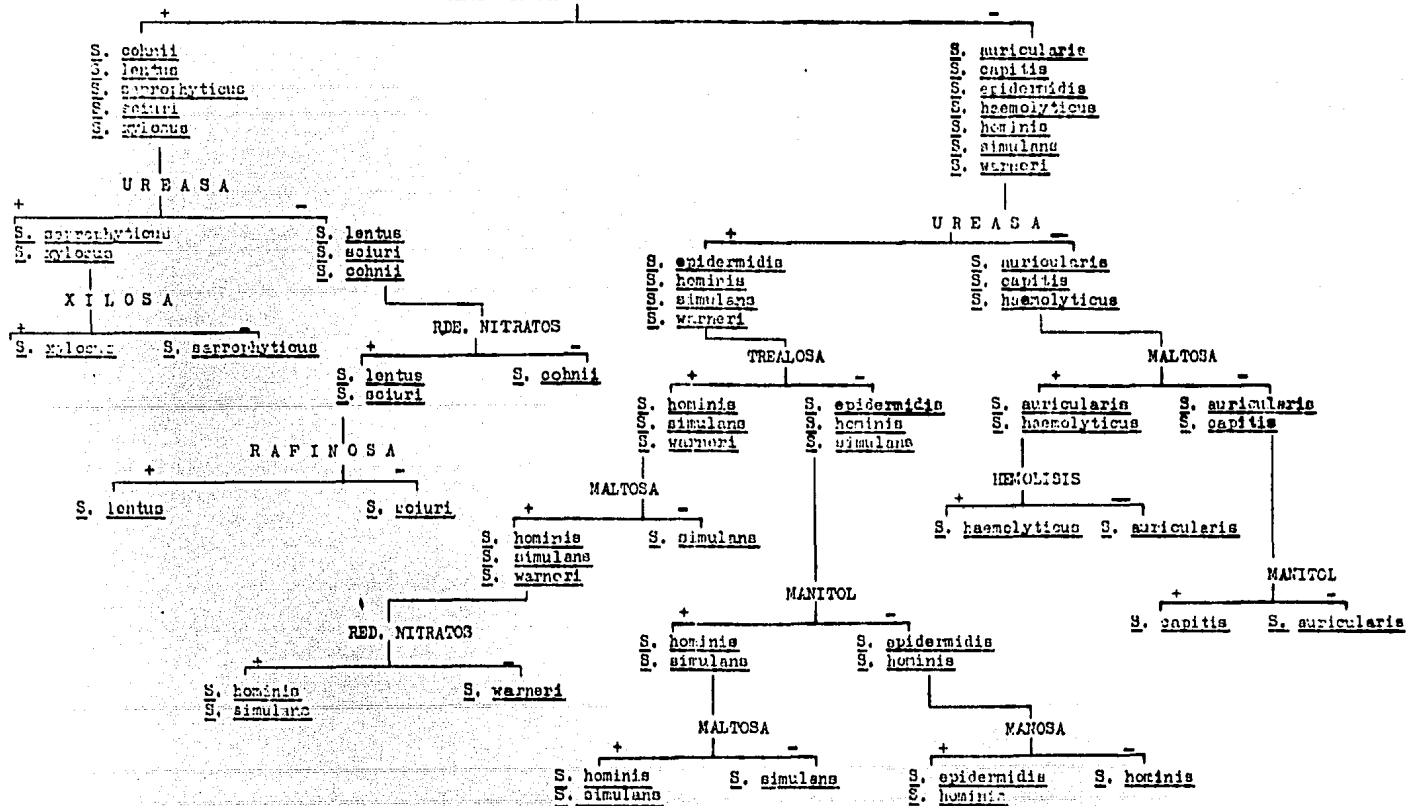
DIFFERENCIACION DE ESPECIES DE ESTAFILOCOCCOS COAGULASA NEGATIVA

	Reduc. Nitrate	PICTIEMO	FOSFATA. ALCALINA	UREASA	HEMOLISE	RESISTEN. NOVOBIO.	MALTOZA	TREALOSA	MANITOL	XILOSA	CELOBIOSA	SACAROSA	RAFINOSA	MANNOSA
<u>S. auricularis</u>	+ / -	-	-	-	-	-	+ / -	+ / ±	-	-	-	- / +	-	- / +
<u>S. cerevitia</u>	+ / -	-	-	-	- / ±	-	-	-	+	-	-	+ / -	-	+ / ±
<u>S. cohnii</u>	-	- / +	- / ±	- / ±	- / ±	+	± / +	+	+ / ±	-	-	-	-	+ / ±
<u>S. epidermidis</u>	+ / ±	-	+	+	- / ±	-	+	-	-	-	-	+	-	+ / ±
<u>S. haemolyticus</u>	+ / -	- / +	-	-	+ / ±	-	+	+	+ / -	-	-	+	-	-
<u>S. hominis</u>	+ / ±	+ / -	-	+	- / ±	-	+	+ / -	- / +	-	-	+	-	- / +
<u>S. lentus</u>	+	+ / -	± / -	-	-	+	+ / -	+ / ±	+	- / ±	+	+	+	+ / ±
<u>S. parrophyticus</u>	-	+ / -	-	+	-	+	+	+ / -	+ / -	-	-	+	-	-
<u>S. gelarii</u>	+	+ / -	+ / ±	-	-	+	± / -	+ / -	+	- / ±	+	+	-	+ / -
<u>S. simulans</u>	+	-	± / -	+	± / -	-	- / ±	+ / -	+ / ±	-	-	+	-	+ / -
<u>S. warneri</u>	- / ±	+ / -	-	+	- / ±	-	+ / ±	+	+ / -	-	-	+	-	-
<u>S. xylopus</u>	+ / -	+ / -	+ / -	+	- / ±	+	+ / ±	+	+ / ±	+	-	+	-	+ / ±

Simbolos: reaccion + positiva; ± débil; - negativa; NR no registrada.

Producción aeróbica de ácido a partir de los carbohidratos.

RESISTENCIA A LA NOVOBIOCINA



ALGORITMO EMPLEADO PARA LA DIFERENCIACION DE ESPECIES DE ESTAFILOCOS COAGULASA NEGATIVA

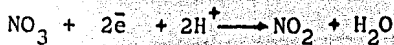
Medio empleado:

- Agar Christensen*. Difco Laboratories, Michigan U.S.A.
- Urea . Merck México.

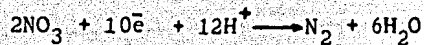
Técnica:

- a) Un inóculo denso del crecimiento de un cultivo puro de 18 a 24 horas fue estriado sobre la superficie del medio inclinado en tubo.
- b) La incubación se realizó a 35°C de 6 a 24 h.
- c) La formación de un color rojo rosado intenso dado por el vire del indicador presente en el medio, marcaba el índice de alcalinidad producida y la positividad del resultado.
- d) Ningún cambio de coloración (color ante-amarillo), se registró como negativo.
- e) Se emplearon controles durante la realización de la prueba.

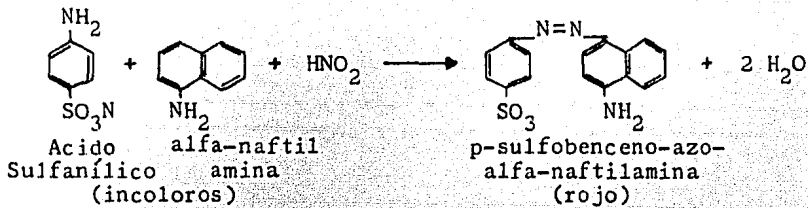
C) Prueba de la Reducción del Nitrato. Esta prueba se emplea para determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre. La reducción del nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) y en gas nitrógeno (N_2) tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato. Esta respiración anaeróbica es un proceso de oxidación por el cual las sustancias inorgánicas, especialmente nitrato y sulfato, o raramente carbohidratos, proporcionan oxígeno para que sirva como aceptor de electrones y suministrar energía (42).



Reducción del nitrato a nitrito



Nitrato en nitrógeno molecular



Química de la acción de los reactivos.

Medio empleado:

- Tryptic Nitrate Medium. Difco Laboratories.

Reactivos:

- Alfa-Naftilamina al 5%.
- Acido Sulfanílico al 0.8%.

Técnica:

- Se llevó al tubo de prueba un inóculo denso de un cultivo puro de 18 a 24 horas.
- La incubación fue a 35^oC por 18 a 24 horas.
- Terminada la incubación se agregaron directamente al cultivo 1 mililitro de alfa-naftilamina y uno de ácido sulfanílico.
- La aparición de una coloración roja producida dentro de los 30 segundos, se consideró un resultado positivo.
- Se corrieron controles junto con los problema.

D) Hemólisis. La capacidad hemolítica de los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa fue evaluada creciendo los organismos sobre cajas de petri conteniendo agar sangre de carnero.

Medio empleado:

- Agar Soya Trypticasa*. Bioxon de México.
- Sangre de carnero. Al 5% en el medio base.

Técnica:

- Con el asa bacteriológica se tomo de un cultivo puro de 18 a 24 horas una colonia bien aislada.

- b) El inóculo fue estriado sobre la placa de agar sangre para obtener colonias aisladas.
- c) Se incubaron las placas a 35°C por 18 a 24 horas.
- d) La presencia o ausencia de hemólisis en el desarrollo obtenido fue determinada mediante observación directa.

E) Prueba de Fermentación de Carbohidratos. Esta prueba se utiliza para determinar la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio base, produciendo ácido o gas visible (42).

Medio empleado:

- Base de caldo Rojo de Fenol*. Bioxon de México S.A.

Carbohidratos:

- Maltosa . Bioxon de México S.A.
- Xilosa . "
- Manosa . B.B.L. Inc. Baltimore.
- Manitol . "
- Rafinosa. Difco Laboratories. U.S.A.
- Sacarosa. "
- Trealosa. Merck.

Incorporados al medio base en una concentración del 1%.

Técnica:

- a) Se tomo un inóculo denso de un cultivo puro de 18 a 24 horas y fue introducido asépticamente en cada uno de los tubos de prueba.
- b) La interpretación del resultado como positivo se dio por la acidez en el medio, representada por la formación de una coloración amarilla mediada por el vire del indicador rojo de fenol.
- c) La incubación se realizó por 24 a 48 horas a 35°C.
- d) Se corrieron simultáneamente controles para la batería montada.

5. Susceptibilidad a los Antimicrobianos.

Se determino el esquema de sensibilidad a los antimicrobianos para los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa, evaluandolos contra diez antibióticos. Para tal efecto, se empleó el método estandar de difusión de discos Kirby-Bauer (30). Con este método el tamaño de la zona de inhibición de una cepa bacteriana, es inversamente proporcional a la concentración mínima inhibitoria del antibiótico determinada por la prueba de dilución en tubo cuando las condiciones de trabajo son constantes (6).

Medio empleado:

- Agar de Mueller-Hinton*. Bioxon de México S.A.
- Caldo Soya Trypticasa* . "

Estandar de turbidez:

- MacFarland 0.5. BaCl_2 0.048 M (1.75 w/v, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.5 ml + 90.5 ml de H_2SO_4 0.36 N (1% v/v) equivalente aproximadamente a 1.5×10^8 microorganismos por mililitro.

Antimicrobianos:

- Acido Nalidíxico (30 mcg.). Productos Bioclin S.A.
- Amikacina (30 mcg.). "
- Dicloxacilina (1 mcg.). "
- Eritromicina (15 mcg.). "
- Gentamicina (10 mcg.). "
- Lincomicina (2 mcg.). "
- Furadantina (300 mcg.). "
- Penicilina (10 U.I.). "
- Tetraciclina (10 mcg.). "
- Trimetoprim-Sulfametoxazol (25 mcg.). "

Técnica:

- a) Con un asa de inoculación se tomaron de cuatro a cinco colonias bien aisladas y de la misma morfología de un cultivo de 18 a 24 horas.

- b) El inóculo fue llevado a un tubo de ensayo con 4 mililitros de caldo soya tripticasa, el cual se incubo a 35°C hasta -- que apareciera una turbidez visible (2 a 5 horas).
- c) La turbidez fue ajustada con el mismo caldo o con solución salina fisiológica para obtener una turbidez comparable visualmente a la del estandar 0.5 de MacFarland.
- d) Se introdujo un hisopo estéril en la suspensión estandarizada, eliminando el exceso de caldo presionando firmemente y rotando el hisopo contra el interior del tubo por encima -- del nivel del líquido.
- e) Se paso el hisopo sobre toda la superficie del agar en tres direcciones para obtener un inóculo uniforme.
- f) Con unas pinzas se aplicaron los discos impregnados de antibióticos sobre la superficie del medio inoculado de tal manera que no se encontraran más cercanos uno del otro, de -- centro a centro a una distancia menor de 24 milímetros.
- g) Se aseguro un contacto directo del disco sobre el agar, presionando levemente con las pinzas.
- h) Las placas fueron incubadas a 35°C durante 16 a 18 horas.
- i) Se examinaron y midieron los diámetros de la zona de inhibición del desarrollo en milímetros, interpretandolos con el cuadro especialmente preparado para este procedimiento, calificando las cepas como susceptibles o resistentes de -- acuerdo al resultado obtenido.

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	Diámetro de zona (milímetro en tero más cercano)		
		RESIS- TENTES	INTER- MEDIOS	SUSCEP TIBLES
Acido Nalídixico	30 mcg.	13	14 - 18	19
Amikacina	30 mcg.	11	12 - 13	14
Dicloxacilina	1 mcg.	9	10 - 13	14
Eritromicina	15 mcg.	13	14 - 17	18
Gentamicina	10 mcg.	12	13 - 14	15
Lincomicina	2 mcg.	9	10 - 14	15
Furadantina	300 mcg.	14	15 - 18	19
Penicilina	10 U.I.	20	21 - 28	29
Tetraciclina	10 mcg.	14	15 - 18	19
Trimetoprim - Sulfametoxasol	25 mcg.	10	11 - 15	16

Cuadro de interpretación para el tamaño de zona de inhibición (38).

6. Control de Calidad.

Como se habra notado, en la mayoría de las pruebas empleadas se menciona la utilización de "controles". Esto se refiere principalmente a la evaluación de los substratos y reactivos inmersos - en el estudio, a través del empleo de cepas de referencia, para - obtener un nivel de confiabilidad aceptable en los resultados obtenidos por medio de tales materiales. Las cepas tipo utilizadas fueron:

- Staphylococcus aureus ATCC 25923
- Staphylococcus epidermidis ENCB 1267
- Staphylococcus saprophyticus ENCB 1279
- Escherichia coli ATCC 11279
- Proteus vulgaris ATCC 13315
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

* NOTA: Todos los medios de cultivo fueron preparados de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

RESULTADOS.

De las cien cepas de estafilococos coagulasa negativa (ECN) - aisladas en urocultivos, fueron identificadas un total de diez especies dentro de dicho grupo, representando el Staphylococcus hominis, el Staphylococcus epidermidis y el Staphylococcus haemolyticus el 68% de las cien cepas, con un porcentaje del 31, 23 y -- 14% respectivamente. Los organismos restantes fueron identificados como: S. auricularis (13%), S. simulans (8%), S. saprophyticus (4%), S. capitis (4%), S. warneri (1%), S. cohnii (1%), y -- S. xylosus (1%) (Cuadro 1).

Los pacientes de quienes fueron aislados los ECN de la orina, eran tanto pacientes hospitalizados (47%) como ambulatorios (53%) y el sexo de la población total incluida presentó semejante variación: femenino 54%, masculino 46%. Las especies aisladas en cada uno de estos cuatro grupos de pacientes se presentan en los cuadros 2 y 3. La variación interespecie de los organismos con mayor número de aislamientos fue muy similar entre los pacientes internos y externos, a diferencia del sexo, donde se aprecia una marcada frecuencia del S. haemolyticus en pacientes del sexo masculino así como el S. saprophyticus y el S. auricularis en pacientes del sexo femenino.

Unicamente ocho del total de las muestras de orina en las que fueron aislados los ECN, presentaron leucocitos. La cantidad de éstos y la especie identificada en la muestra así como las unidades formadoras de colonia por mililitro de la misma se describen en el cuadro 4.

Las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) en las muestras de orina tuvieron una amplia variación y fueron divididas en tres grupos: los cultivos con menos de 10,000 UFC/ml, -- cultivos entre 10,000 y 100,000 UFC/ml y cultivos con más de 100,000 UFC/ml. El mayor porcentaje de aislamientos se observó en -- aquellos cultivos que presentaron entre 10^4 y 10^5 UFC/ml (cuadro 5). La variación de especie en base a las UFC/ml se muestra en --

los cuadros 6, 7 y 8, en los cuales se observa la mayor frecuencia en los tres grupos de UFC/ml, para las especies de S. hominis y el S. epidermidis.

Dentro del esquema de susceptibilidad a los antimicrobianos para el total de las cepas de ECN, el 67.6% fueron susceptibles a todos los antibióticos analizados. La incidencia de la sensibilidad fue mayor para la Furadantina (100%), Amikacina (87%) y Dicloxacilina (71%) (Cuadro 9).

En el patrón de susceptibilidad por especie, se observó el mismo modelo para la Furadantina con el 100% de sensibilidad para todas las especies de ECN identificadas, seguida de la amikacina con la que el S. hominis (80.6%), el S. epidermidis (86.9%) y el S. haemolyticus (92.8%) fueron los únicos con menos del 100% de sensibilidad. Los demás antimicrobianos presentaron mayores variaciones en la susceptibilidad interespecie (Cuadro 10).

ORGANISMOS	NO. DE AISLAMIENTOS	%
<u>S. hominis</u>	31	31
<u>S. epidermidis</u>	23	23
<u>S. haemolyticus</u>	14	14
<u>S. auricularis</u>	13	13
<u>S. simulans</u>	8	8
<u>S. saprophyticus</u>	4	4
<u>S. capitis</u>	4	4
<u>S. cohnii</u>	1	1
<u>S. warneri</u>	1	1
<u>S. xylosus</u>	1	1
TOTAL	100	100

Cuadro 1. Especies identificadas de los aislamientos de ECN.

7

ORGANISMO	Pacientes: No. aislamientos (%)	
	Internos	Externos
<u>S. hominis</u>	17 (54.8)	14 (45.2)
<u>S. epidermidis</u>	12 (52.2)	11 (47.8)
<u>S. haemolyticus</u>	7 (50.0)	7 (50.0)
<u>S. auricularis</u>	4 (30.8)	9 (69.2)
<u>S. simulans</u>	3 (37.5)	5 (62.5)
<u>S. saprophyticus</u>	0	4 (100)
<u>S. capitis</u>	2 (50.0)	2 (50.0)
<u>S. cohnii</u>	0	1 (100)
<u>S. warneri</u>	1 (100)	0
<u>S. xylosus</u>	1 (100)	0
TOTAL	47	53

Cuadro 2. Especies de ECN en los pacientes hospitalizados y ambulatorios.

ORGANISMO	SEXO: No. DE AISLAMIENTOS (%)	
	FEMENINO	MASCULINO
<u>S. hominis</u>	13 (41.9)	18 (58.1)
<u>S. epidermidis</u>	15 (65.2)	8 (34.8)
<u>S. haemolyticus</u>	1 (7.1)	13 (92.9)
<u>S. auricularis</u>	11 (84.6)	2 (15.4)
<u>S. simulans</u>	6 (75.0)	2 (25.0)
<u>S. saprophyticus</u>	4 (100)	0
<u>S. capitis</u>	3 (75.0)	1 (25.0)
<u>S. cohnii</u>	1 (100)	0
<u>S. warneri</u>	0	1 (100)
<u>S. xylosum</u>	0	1 (100)
TOTAL	54	46

Cuadro 3. ECN aislados en los pacientes femeninos y masculinos.

ORGANISMO	LEUC./mm ³	UFC/ ml
<u>S. hominis</u>	1,075	5,400
<u>S. hominis</u>	750	>10 ⁵
<u>S. haemolyticus</u>	650	31,100
<u>S. hominis</u>	380	>10 ⁵
<u>S. hominis</u>	87	>10 ⁵
<u>S. epidermidis</u>	22	58,000
<u>S. epidermidis</u>	5	17,400
<u>S. epidermidis</u>	5	1,800

Cuadro 4. Cuento leucocitario en las muestras de orina de las que fueron aislados los ECN.

UFC/ml	NO. DE AISLAMIENTOS	%
>10 ⁵	30	30.0
>10 ⁴ < 10 ⁵	48	48.0
< 10 ⁴	22	22.0
TOTAL	100	100

Cuadro 5. Unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) en el total de aislamientos de ECN.

ORGANISMO	NO. DE AISLAMIENTOS	%
<u>S. hominis</u>	11	36.6
<u>S. epidermidis</u>	7	23.3
<u>S. haemolyticus</u>	4	13.3
<u>S. saprophyticus</u>	3	10.0
<u>S. capitis</u>	2	6.6
<u>S. simulans</u>	1	3.3
<u>S. cohnii</u>	1	3.3
<u>S. auricularis</u>	1	3.3
TOTAL	30	100

CUADRO 6. Especies de ECN presentes en cultivos con un conteo mayor de 10^5 UFC/ml .

ORGANISMO	NO. DE AISLAMIENTOS	%
<u>S. hominis</u>	14	29.1
<u>S. epidermidis</u>	10	20.8
<u>S. auricularis</u>	9	18.7
<u>S. haemolyticus</u>	8	16.6
<u>S. simulans</u>	4	8.3
<u>S. capitis</u>	2	4.1
<u>S. saprophyticus</u>	1	2.0
TOTAL	48	100

CUADRO 7. Especies de ECN presentes en cultivos con un conteo entre 10^4 y 10^5 UFC/ml.

CUADRO 10. Esquema de sensibilidad por especies de los aislamientos de ECN.

ORGANISMO	NO. DE AISLAMIENTOS	PORCENTAJE DE CEPAS SENSIBLES A*:									
		FD	AK	DX	PE	TE	GE	ER	TS	AN	LI
<i>S. hominis</i>	31	100	80.6	51.6	41.9	35.4	61.2	32.2	25.8	51.6	51.6
<i>S. epidermidis</i>	23	100	86.9	73.9	73.9	69.5	65.2	60.8	52.1	39.1	60.8
<i>S. haemolyticus</i>	14	100	92.8	85.7	57.1	42.8	50.0	50.0	42.8	57.1	50.0
<i>S. auricularis</i>	13	100	100	92.3	84.6	30.7	69.2	46.1	53.8	38.4	61.5
<i>S. simulans</i>	8	100	100	87.5	77.7	50.0	87.5	77.7	77.7	12.5	50.0
<i>S. saprophyticus</i>	4	100	100	25.0	100	75.0	75.0	50.0	75.0	0	0
<i>S. capitis</i>	4	100	100	100	100	50.0	100	50.0	75.0	50.0	75.0
<i>S. cohnii</i>	1	100	100	0	100	100	100	100	100	0	0
<i>S. warneri</i>	1	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
<i>S. xylosus</i>	1	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100

* FD: Furadantina; AK: Amikacina; DX: Dicloxacilina; TE: Tetraciclina; GE: Gentamicina; -- ER: Eritromicina; TS: Trimetoprim-Sulfametoxazol; AN: Acido Nalidixico; LI: Lincomicina.

ORGANISMO	NO. DE AISLAMIENTOS	%
<u>S. hominis</u>	6	27.2
<u>S. epidermidis</u>	6	27.2
<u>S. simulans</u>	3	13.6
<u>S. auricularis</u>	3	13.6
<u>S. haemolyticus</u>	2	9.09
<u>S. warneri</u>	1	4.54
<u>S. xylosum</u>	1	4.54
TOTAL	22	100

Cuadro 8. Especies de ECN aislados en cultivos con un conteo menor de 10^4 UFC/ml.

ANTIMICROBIANO	NO. DE AISLAMIENTOS	%
PURADANTINA	100	100
AMIKACINA	87	87.0
DICLOXACILINA	71	71.0
PENICILINA	66	66.0
GENTAMICINA	62	62.0
LINCOMICINA	53	53.0
TETRACICLINA	50	50.0
ERITROMICINA	49	49.0
TRIMETOPRIM-SULFAMETOXASOL	48	48.0
ACIDO NALIDIXICO	40	40.0

Cuadro 9. Susceptibilidad antimicrobiana del total de aislamientos de ECN.

CUADRO 10. Esquema de sensibilidad por especies de los aislamientos de ECN.

ORGANISMO	NO. DE AISLAMIENTOS	PORCENTAJE DE CEPAS SENSIBLES A*:									
		FD	AK	DX	PE	TE	GE	ER	TS	AN	LI
<u>S. hominis</u>	31	100	80.6	51.6	41.9	35.4	61.2	32.2	25.8	51.6	51.6
<u>S. epidermidis</u>	23	100	86.9	73.9	73.9	69.5	65.2	60.8	52.1	39.1	60.8
<u>S. haemolyticus</u>	14	100	92.8	85.7	57.1	42.8	50.0	50.0	42.8	57.1	50.0
<u>S. auricularis</u>	13	100	100	92.3	84.6	30.7	69.2	46.1	53.8	38.4	61.5
<u>S. simulans</u>	8	100	100	87.5	77.7	50.0	87.5	77.7	77.7	12.5	50.0
<u>S. saprophyticus</u>	4	100	100	25.0	100	75.0	75.0	50.0	75.0	0	0
<u>S. capitis</u>	4	100	100	100	100	50.0	100	50.0	75.0	50.0	75.0
<u>S. cohnii</u>	1	100	100	0	100	100	100	100	100	0	0
<u>S. warneri</u>	1	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0
<u>S. xyloso</u>	1	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100

* FD: Furadantina; AK: Amikacina; DX: Dicloxacilina; TE: Tetraciclina; GE: Gentamicina; -- ER: Eritromicina; TS: Trimetoprim-Sulfametoxazol; AN: Acido Nalidixico; LI: Lincomicina.

DISCUSION.

El aislamiento de los estafilococos coagulasa negativa (ECN) de las muestras de orina, es por lo regular considerado como producto de contaminación de la muestra por la flora bacteriana normal y por lo tanto su significancia clínica se consideraba nula o muy pobre. Sin embargo, recientemente se ha tomado interés en este grupo de microorganismos dado su constante aislamiento en diferentes muestras clínicas (14, 15, 31), y su posible participación como agente etiológico oportunista o primario en diversas infecciones (17, 23, 25, 30, 43, 49).

En una revisión retrospectiva de 10,000 urocultivos, en el Laboratorio Clínico del Hospital de Infectología, Centro Médico "La Raza", se encontró que el 77.5% de los cultivos positivos produjeron aislamientos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, seguidos por los aislamientos de ECN con un 9.63%. También se vieron incluidos otros microorganismos dentro de dicho análisis: Streptococcus spp. (7.85%), Levaduras (4.05%) y Staphylococcus coagulasa positiva (0.69%).

Es considerable el porcentaje de aislamientos de ECN, y con acuerdo con el reportado por Marrie y col. (45) quienes en un análisis de 14,835 cultivos de orina encontraron el 9.11% de aislamientos para tales organismos, así como también observaron el predominio de la familia Enterobacteriaceae con el 66.3%. En cuanto a los organismos restantes, la concordancia no fue tan precisa pero casi se mantuvo el orden decreciente en el porcentaje.

Dentro de los propósitos de este trabajo, se encontraba el determinar la frecuencia de especies de los estafilococos coagulasa negativa en urocultivos. Se lograron identificar diez especies, de las cuales las de mayor predominio fueron el Staphylococcus hominis (31%), el S. epidermidis (23%), y el S. haemolyticus (14%). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por John y col. (28), quienes también reportan estas tres especies como las más frecuentes en cultivos de orina, con la excepción de que el S. epi

dermidis fue el que tuvo el mayor porcentaje de aislamientos (53%) seguido por el S. hominis (12%) y el S. haemolyticus (10%). Sin embargo, en la mayoría de los estudios publicados acerca de esta frecuencia (1, 19, 46, 48), reportan al S. epidermidis como el más -- frecuentemente aislado, seguido por el S. saprophyticus y el S. haemolyticus. Estas diferencias con los resultados obtenidos aquí, pueden ser debidas fundamentalmente a los criterios de exclusión -- empleados para las muestras incluidas en tales investigaciones -- (conteos coloniales mayores de 10^4 o 10^5 UFC/ml, edad y sexo de la población muestreada), los cuales al diferir de los empleados -- aquí, alteran en gran medida los resultados obtenidos. No obstante al menos dos de las tres especies mencionadas en todos los trabajos referidos, como especies predominantes (S. epidermidis y S. haemolyticus) concuerdan con las obtenidas en este trabajo. Las especies de S. simulans, S. capitis, S. cohnii, S. warneri y S. xylosum son reportadas con una baja frecuencia (1, 19, 46, 48) similar a la obtenida en este estudio.

En ningún trabajo se encontro reportado el S. auricularis como aislamiento del tracto urinario, sino que únicamente se encontro reportado dentro de su habitat normal, el oido externo humano (31). La ausencia de esta especie en los diferentes estudios de especiación de los ECN en muestras de orina, puede deberse a que en todos estos trabajos el método empleado para la clasificación de los ECN fue el que propusieron Kloos y Schleifer en 1975, y en éste aún -- no se incluía dicha especie. Así mismo, el método utilizado en este trabajo para la especiación de los estafilococos coagulasa negativa es el referido por Kloos en 1982 (31), estando ya incluida en éste la especie de S. auricularis. Por lo tanto, es muy probable, -- por la similitud en algunas pruebas bioquímicas, que tal especie -- se haya incluido dentro del S. epidermidis y/o el S. hominis al -- ser diferenciados con dicho método.

La frecuencia obtenida para el S. saprophyticus fue muy baja -- (4%) comparada con la reportada en la literatura: 88.5% (41), 51.5% (37), 26% (46), 24.5% (19), 20% (29), aunque fue muy aproximada --

a la reportada por John (28), con un resultado del 5%. Esta disimilitud con los resultados de la mayoría de los estudios relacionados, se debe principalmente al tipo de población muestreada, que en casi todos fueron sino totalmente, la mayoría pacientes ambulatorios jóvenes del sexo femenino, siendo esta población portadora de una alta incidencia de infección en vías urinarias causada por el S. saprophyticus (36, 39). Sin embargo, los cuatro aislamientos de S. saprophyticus fueron obtenidos de las muestras de pacientes externos femeninos, lo cual concuerda con los datos de los estudios referidos.

La variación interespecie de los estafilococos coagulasa negativa considerando el sexo de los pacientes así como su estado ambulatorio u hospitalizado, fue semejante para la mayoría de los microorganismos (cuadros 2 y 3) a excepción del S. saprophyticus (ya comentado), el S. haemolyticus, el cual fue encontrado con mayor frecuencia en pacientes del sexo masculino, y el S. auricularis presente principalmente en pacientes del sexo femenino. Los datos reportados por Lighton (37), concuerdan con la mayoría de las especies en esta relación, aunque en este trabajo no hay predominio de un sexo en la especie del S. haemolyticus, pero se debe tomar en cuenta que el grueso de la población estudiada estaba compuesta por pacientes del sexo femenino. Subsecuentemente, el determinar la mayor incidencia de algunas especies de estafilococos coagulasa negativa en algún grupo poblacional en especial, requiere de estudios adicionales.

El criterio de significancia clínica para un aislamiento en el cultivo de una muestra de orina, se basa principalmente en la cantidad de unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra (UFC/ml) que se obtenga en dicho cultivo. Este criterio, en adición a los síntomas del paciente y otros hallazgos del laboratorio (leucocituria, proteinuria, capacidad de concentración renal, etc) dan la pauta para el diagnóstico de una infección en vías urinarias (10). El criterio de significancia clínica generalmente aceptado es de un cultivo con una cantidad igual o mayor a 10^5 UFC/ml (4, 61). Aunque recientemente, Stamm y col. (55), han encontrado -

en mujeres con síndrome uretral agudo y en su mayoría presentando piuria anormal (más de 8 leucocitos por mm^3 de orina) menos de 10^4 UFC/ml de bacterias coliformes y Staphylococcus saprophyticus en muestras de orina obtenidas por aspiración suprapúbica. Estos mismos autores en otro estudio (54), definieron un criterio de una cantidad mayor o igual a 10^2 UFC/ml en muestras de orina de flujo medio en mujeres con infección sintomática por coliformes.

Aun cuando en el presente trabajo no se tuvo acceso a los registros médicos de los pacientes incluidos en el mismo, se pueden hacer algunas inferencias con los datos de UFC/ml y leucocituria para las diferentes especies identificadas. De las ocho muestras que presentaron leucocituria, solamente seis se pueden considerar con piuria anormal (más de 8 leucocitos/ mm^3), dentro de éstas, 4 fueron aislamientos de S. hominis, 1 de S. haemolyticus y uno de S. epidermidis. Un conteo mayor de 10^5 UFC/ml se observó en tres de estas seis especies, las tres de S. hominis, y las tres restantes S. epidermidis, S. haemolyticus y S. hominis tuvieron 58,000, 31,600 y 5,400 UFC/ml respectivamente. Estos hallazgos de piuria consistente y conteos mayores de 5×10^3 UFC/ml, en base a los criterios arriba mencionados, son bastante sugestivos de una infección en vías urinarias causada por tales especies de ECN.

Por otra parte, las muestras en las que se aislaron la mayor parte de las cepas de ECN no presentaron leucocituria, pero la mayoría de las especies tuvieron entre 10^4 y 10^5 UFC/ml, con excepción del S. saprophyticus, en el que tres (75%) de cuatro aislamientos tuvieron más de 10^5 UFC/ml. Las especies de S. cohnii, S. warneri y S. xylosus, solamente presentaron un aislamiento, por lo que no se puede hacer una comparación en cuanto al grupo predominante de UFC/ml.

Es difícil establecer la significancia clínica de un aislamiento de ECN, basándose únicamente en las UFC/ml. Debido a esto y aunado a las discrepancias en los criterios de significancia y a la ausencia de datos adicionales de laboratorio y del paciente, la interpretación puede seguir dos caminos: por un lado existe la posibili

dad de la participación etiológica de algunas especies en la infección del tracto urinario, tomando en cuenta el carácter patogénico reportado para algunas de ellas, S. saprophyticus (25, 26, 29, 45) S. xylosum (58) y la patogenicidad oportunista de otras (31); el otro camino puede ser la ausencia total de un papel patogénico en estos microorganismos, dado que se han reportado las especies de S. epidermidis, S. hominis, S. haemolyticus, S. simulans y S. warneri con un porcentaje considerable dentro de la flora bacteriana uretral en individuos sanos (45), con lo que caerían en un papel de contaminación con flora normal en una muestra tomada incorrectamente.

Todas estas aseveraciones, son totalmente dependientes de los criterios adicionales para el establecimiento del diagnóstico de una infección en vías urinarias. La confirmación de la participación o no de alguna especie en particular, fuera del S. saprophyticus, de los ECN en la patogenia de una infección en el tracto urinario necesita de estudios adicionales, en los cuales se manejen los parámetros reportados aquí, así como las pruebas adicionales de laboratorio y los datos generales del paciente.

El ya mencionado reciente interés en los estafilococos coagulasa negativa, ha motivado el desarrollo de métodos rápidos y confiables para la identificación de las especies de este particular grupo de microorganismos. Dentro de esta carrera científica han aparecido pruebas comerciales miniaturizadas (1, 11) en la forma de placas de plástico impregnadas con el substrato indicador. Sin embargo, estos micrométodos no son siempre accesibles a todos los laboratorios de Microbiología Clínica, por lo que es necesario adecuar de la mejor manera posible y dentro de las posibilidades de cada laboratorio, los métodos y técnicas empleados en la identificación de dichos organismos. Estos sistemas comerciales están basados primordialmente en el método convencional descrito por Kloos y Schleifer en 1975. Esta clasificación, nuevamente reportada en esta década (31), fue la empleada en este trabajo.

No se requirió de la compra o adquisición de alguno de los me-

dios o substratos que integraban el mencionado esquema de identificación, la mayoría se encontraban dentro de las técnicas montadas en el laboratorio para la identificación de otro tipo de microorganismos (enterobacterias, estreptococos, anaerobios etc.), por lo que su accesibilidad fue muy elevada. Este método hace la diferenciación de doce especies de ECN, pero también se han propuesto métodos simplificados de identificación (47, 50), con los que se obtiene la identificación presuntiva de algunas especies de ECN o únicamente la diferenciación entre el Staphylococcus epidermidis y el Staphylococcus saprophyticus (35, 41, 56), pero tomando en cuenta los resultados de este trabajo, con la diversidad de especies que pueden ser identificadas y su posible participación patagénica es importante llevar la identificación más allá de únicamente esas dos especies.

Las posibilidades de error en la identificación de los estafilococos coagulasa negativa con el esquema utilizado, a reserva de -- errores manuales en el seguimiento de las técnicas, se pueden agrupar principalmente en las diferencias de los medios y substratos empleados por los autores y los que se utilizaron al aplicar el método. Esta desviación se pudo salvar mediante el empleo de controles, en este caso cepas de referencia, que confirmaron la seguridad de una identificación correctamente realizada. Con el empleo de tales cepas, únicamente se presentó una anomalía con un medio--substrato, el utilizado para determinar la actividad de la enzima ureasa. Inicialmente se aplicó el medio de urea-sacarosa (de uso común en este laboratorio), pero se observaron una gran cantidad de resultados falsos negativos al compararlo con las cepas control y un medio más sensible (urea de Christensen), siendo este último el adoptado para el sistema de clasificación. Con el resto de los substratos y medios no se presentó ningún problema, y se consideró confiable el algoritmo empleado para la especiación de los ECN.

El mencionado algoritmo de identificación fue elaborado en base al sistema de clasificación propuesto por Kloos (31), e involucra el empleo de diez substratos en una serie de pasos que hacen -

más sencillo el camino para obtener la especiación final de los estafilococos coagulasa negativa. En base a este sistema y a la baja o nula frecuencia de las especies novobiocina resistentes, diferentes del S. saprophyticus, en aislamientos del tracto urinario, es posible obtener una identificación presuntiva de este último (una vez identificado como ECN) empleando únicamente el resultado positivo de la prueba de resistencia a la novobiocina, o con un mayor porcentaje de confiabilidad en la identidad de dicho organismo, -- adicionando a la prueba de susceptibilidad a la novobiocina, las pruebas de ureasa y xilosa. Esta observación puede ser de utilidad en dado caso que un laboratorio no contara con la totalidad de los substratos y requiriera la confirmación en la identidad de una especie de ECN sugestiva de ser S. saprophyticus.

El tratamiento de las infecciones en vías urinarias está dirigido de manera general contra bacterias coliformes, por ser estas las de mayor incidencia en la etiología de tales infecciones. En base a esto los antimicrobianos de uso común en dicha terapéutica incluyen la Furadantina, el Acido Nalidíxico, y el Trimetoprim-Sulfametoxazol (34).

El esquema de sensibilidad obtenido para el total de los aislamientos de ECN con un bajo o nulo porcentaje de resistencia para la Furadantina y la Amikacina, concuerda con el reportado por Mar-sik (46) en donde también encontro esta marcada sensibilidad a los antimicrobianos mencionados. En el otro extremo, el ácido nalidíxico presento el mayor porcentaje de resistencia, representada claramente por las cepas del S. saprophyticus que exhibieron un 100% de resistencia contra dicho antibiótico, estando de conformidad con los resultados de algunos autores (9, 44, 52, 59).

Es notable el hecho de que dos de los antimicrobianos de uso común en el tratamiento de infecciones en el tracto urinario, presentaron un bajo porcentaje de sensibilidad para los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa (Trimetoprim-Sulfametoxazol -- 48% y Acido Nalidíxico 40%). Estos datos pueden ser de gran utilidad cuando se presenta la necesidad de suministrar un tratamiento

empírico para las infecciones en vías urinarias y es importante -- también considerar que los modelos de susceptibilidad varían de -- una comunidad a otra debido al contacto frecuente con algunos anti microbianos en particular (51).

El resto de los antimicrobianos utilizados en la prueba de sensibilidad presentaron variaciones sin una tendencia tan marcada como la de los mencionados arriba, a excepción de la Dicloxacilina, en la que se observó también un considerable porcentaje de sensibilidad para los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa.

Es clara la importancia de los mencionados esquemas de susceptibilidad al involucrarlos en un momento dado en estudios epidemiológicos y terapéuticos, viéndose la necesidad de realizar trabajos adicionales para determinar si ocurren diferencias similares en -- los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa provenientes de otras instituciones.

CONCLUSIONES.

1. Las especies de estafilococos coagulasa negativa con mayor frecuencia de aislamientos en cultivos de orina fueron: Staphylococcus hominis, Staphylococcus epidermidis, y Staphylococcus haemolyticus, existiendo la posibilidad de que estén implicadas en la etiología de infecciones en vías urinarias.
2. Una cuarta especie, el Staphylococcus auricularis, también con un porcentaje considerable, sin olvidar el bajo número de cepas analizadas, merece especial atención, debido a que abre la posibilidad de que su habitat normal no solo se encuentre en el oído externo (del cual se deriva su nombre) y se requiera realizar la estimación, con una elevada población de muestreo, sobre la identidad de la flora bacteriana residente del tracto urinario.
3. La frecuencia obtenida para el Staphylococcus saprophyticus no fue tan alta como la reportada en la literatura, no obstante las cepas aisladas de dicho organismo provenían de pacientes ambulatorios del sexo femenino, siendo esta la población en la cual se ha reportado una alta incidencia del Staphylococcus saprophyticus como causante de infección en el tracto urinario.
4. El método de identificación empleado ofreció una aceptable accesibilidad en cuanto a la obtención de substratos y el algoritmo de identificación derivado de él, proporciona una especiación fácil y rápida de los estafilococos coagulasa negativa con un número considerable de pruebas.
5. En base al mencionado algoritmo, se sugiere una identificación presuntiva del S. saprophyticus aislado del tracto uri-

nario, utilizando únicamente tres pruebas: resistencia a la novobiocina, actividad de la enzima ureasa y fermentación de la xilosa.

6. Debido a la variedad de especies identificadas en este trabajo y al posible papel patogénico de algunas de ellas, se ve la necesidad de identificar los aislamientos del género Staphylococcus más allá de la especiación del Staphylococcus aureus y la incorrecta designación como Staphylococcus epidermidis a todas las cepas de estafilococos coagulasa negativa.
7. Los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa, presentaron una elevada sensibilidad a uno de los antimicrobianos de uso común en el tratamiento de infecciones en las vías urinarias, la Furadantina, pero a la vez manifiestan una relativamente elevada resistencia al Trimetoprim-Sulfametoxazol y al Acido Nalidíxico, antibióticos también de uso frecuente en la terapéutica de tal afección.
8. Deben realizarse estudios adicionales con una población de muestreo más amplia y heterogénea, para determinar el papel patogénico de los estafilococos coagulasa negativa en el tracto urinario y proponer también los criterios necesarios para evaluar la significancia clínica en este tipo de aislamientos.

10. BRAUDE A.I., DAVIS C.E., FIERER J. Infectious Diseases and - Medical Microbiology, Saunders Company, Philadelphia, U.S.A., 2nd edition, 1986. pág. 1009-1020.
11. BRUN Y.J., FLEURETTE J. AND FOREY J. Micromethod for Biochemical identification of Coagulase-Negative Staphylococci. - J. Clin. Microbiol. 1978; 8(5): 503-508.
12. BUCHANAN R.E., GIBBONS N.E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, 8th edition, Baltimore -- U.S.A. 1974. pág. 478-489.
13. COLLIN C.H. & LINE P.M. Microbiological Methods. Butler & Tanner Ltd., London, England. 1984. pág. 325-330.
14. DUNNE M.W.JR., FRANSON T.R. Coagulase-Negative Staphylococci: The Rodney Danger of Pathogens. Clin. Microbiol. Newsletter. 1986; 8(6): 37-42.
15. ENG R.H.K., WANG C., PERSON A., KIEHN T.E., AND ARMSTRONG D. Species Identification of Coagulase-Negative Staphylococcal Isolates from Blood Cultures. J. Clin. Microbiol. 1982; 15(3) 439-442.
16. FALLER A. & SCHLEIFER K.H. Modified Oxidase and Benzidine - Tests for Separation of Staphylococci from Micrococci. J.Clin. Microbiol. 1981; 13(6): 1031-1035.
17. FEIGIN R.D., SHACKELFORD P.G., CAMPBELL J., LYLES T.O., SCHE TCHER M. AND LINS R. Assessment of the role of Staphylococcus epidermidis as a cause of otitis media. Pediatrics. 1973 52(4): 569-576.
18. GAMES E.J. Uso de Antimicrobianos en infecciones de vías urinarias. Rev. Med. I.M.S.S. 1982; 20(2):1031-1035.
19. GEMELL C.G. & DAWSON J.E. Identification of Coagulase-Negative Staphylococci with the API Staph System. J. Clin. Microbiol. 1982; 16(5): 874-977.

20. GLECKMAN R., ESPOSITO A., CROWLEY M. AND NATSIOS G.A. Reliability of a Single Urine Culture in Establishing Diagnosis of Asymptomatic Bacteriuria in Adult Males. *J. Clin. Microbiol.* 1979; 9(5): 596-597.
21. GOKAL R, RAMOS J.M., FRANCIS D.M.A. Peritonitis in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *The Lancet.* 1982; 2(1388): 91.
22. GOLDSTEIN J., ROBIN S., KELLEY E., MCKINLEY G. AND FUNG J. - Effect of Different Media on Determination of Novobiocin Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 1979; 9(5): 596-597.
23. GOLDSTONE J., MOORE S.W. Infection in Vascular Prosthesis. - *Am. J. Surg.* 1974; 128(2): 225-233.
24. HOOVER D.G., TATINI S.R. AND MALTAIS J.B. Characterization of Staphylococci. *Appl. Environ Microbiol.* 1983; 46 (3): 649 - 660.
25. HOVELIUS B. & MARDH P.A. Staphylococcus saprophyticus as a Common Cause of Urinary Tract Infections. *Rev. Infect. Dis.* 1984; 6(3): 328-337.
26. HOVELIUS B, MARDH P.A, AND BYGREN P. Urinary Tract Infections caused by Staphylococcus saprophyticus: Recurrences and Complications. *J. Urol.* 1979; 122(5): 645-647.
27. HOVELIUS B., COLLEN S., MARDH P.A. Urinary Tract Infections in Men Caused by Staphylococcus saprophyticus. *Scand J. Infect. Dis.* 1984; 16(1): 37-41.
28. JOHN J.F. JR., GRAMLING P.K. AND O'DELL N.M. Species Identification of Coagulase-Negative Staphylococci from Urinary Tract Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1978; 8(4): 435-437.
29. JORDAN P.A., IRAVANI A., RICHARD G.A., AND BAER H. Urinary Tract Infection Caused by Staphylococcus saprophyticus. *J. Infect. Dis.* 1980; 142(2): 510-515.

30. KEYS T.F., HEWITT W.L. Endocarditis Due to Micrococci and -- Staphylococcus epidermidis. Arch. Intern. Med. 1973; 132 (2) 216-220.
31. KLOOS WESLEY E. Coagulase Negative Staphylococci. Clin. Microbiol. Newsletter. 1982; 4(11): 75-79.
32. KNIGHT K.R., POLAK A., CRUMP J., MASKELL R. Laboratory Diagnosis and oral Treatment of CAPD Peritonitis. The Lancet. -- 1982; 2(8311): 1301-1306.
33. KONEMAN W. ELMER. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1983. pág. 343-350.
34. KUMATE J., GUTIERREZ G. Manual de Infectología. Editorial Méndez-Cervantes, Undécima edición, 1986. pág. 343-350.
35. LATHAM R.H., GROOTES-REUVECAMP G.A., ZELESNIK D., AND STAMM W.E. Use of Novobiocin Containing Medium for Isolation of -- Staphylococcus saprophyticus from Urine. J. Clin. Microbiol. 1983; 17(6): 1161-1162.
36. LATHAM R.H., RUNNING K., STAMM W.E. Urinary Tract Infections in Young Adult Women Caused by Staphylococcus saprophyticus. J.A.M.A. 1983; 250(22): 3063-3066.
37. LEIGHTON P.M. & LITTLE J.A. Identification of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Urinary Tract Infections. -- Am. J. Clin. Pathol. 1986; 85(1): 92-95.
38. LENNETIE E.H., BALOWS A., HAUSLER W.J., TRUANT J.P. Manual de Microbiología. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 3a. edición, 1982. pág 119-124, 561-570.
39. LEWIS J.F., BRAKE S.R., ANDERSON D.J., AND UREDEVELD G.N. -- Urinary Tract Infections Due to Coagulase-Negative Staphylococcus. Am. J. Clin. Pathol. 1982; 77(6): 736-739.
40. LIEKWEIG W.G. & GREENFIELD L.J. Vascular Prosthetic Infections. Collected experience and results of treatment. Surgery. 1977; 31(3): 335-342.

41. LOO S.T., ADAM A.L., AND SCOTTOLINI A.G. Presumptive Identification of Staphylococcus saprophyticus from Urine Specimens by Colony Appearance and Coagulase Testing: An Evaluation. Am. J. Clin. Pathol. 1984; 81(5): 647-650.
42. MAC FADDIN JEAN F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica - Panamericana. México, D.F., 1984. pag. 27, 142, 154, 161, 183, 208.
43. MALES B.M., BARTHOLOMEW W.R., AND AMSTERDAN D. Staphylococcus simulans Septicemia in Patient with Chronic Osteomyelitis and Pyarthrosis. J. Clin. Microbiol. 1985; 21(2): 255 - 257.
44. MARRIÉ T.J. & KWAN C. Antimicrobial Susceptibility of Staphylococcus saprophyticus and Uretral Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 1982; 22(3): 395-397.
45. MARRIE T.J., KWAN C., NOBLE M.A., WEST A., AND DUFFIEL D. L. Staphylococcus saprophyticus as a Cause of Urinary Tract Infections. J. Clin. Microbiol. 1982; 16(3): 427-431.
46. MARSIK F.J. & BRAKE S. Species Identification and Susceptibility to 17 Antibiotics of Coagulase-Negative Staphylococci - Isolated from Clinical Specimens. J. Clin. Microbiol. 1982 ; 15(4): 640-645.
47. MORGAN JEEF W. Abbreviated Scheme from Presumptive Identification of Staphylococcus saprophyticus from urine Cultures. - J. Clin. Microbiol. 1983; 18(5): 1272-1274.
48. NICOLLE E.L., HOBAN S.A., AND HARDING K.M. Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci from Urinary Tract Specimens; J. Clin. Microbiol. 1983; 17(2): 267-271.
49. PACKER A.J., KOONTZ F.P. Ocular Staphylococcal Infections. - Am. J. Ophthalmol. 1984; 97(5): 645.
50. PAREDES L.P., VALENZUELA E.P., DEL CANTO E.H., Y ODDO D.B. - Estudio Bacteriológico de 160 cepas de Staphylococcus coagulasa negativa de origen humano. Rev. Latamer. Microbiol. - 1982; 24: 1-6.

51. PEREDO M.L.V., BARRIGA A.G., PEREZ R.C. Resistencia Microbiana en los Hospitales del Centro Médico La Raza. Rev. Med. - I.M.S.S. 1982; 20: 401-405.
52. PRICE S.B. & FLOURNOY D.J. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Patterns Among Coagulase-Negative Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 1982; 21(3): 436-440.
53. SPELLER D.C. & MITCHELL R.G. Coagulase-Negative Staphylococci causing endocarditis after cardiac surgery. J. Clin. Pathol. 1973; 26(7): 517-522.
54. STAMM W.E., COUNTS G.W., RUNNING K., FIHN S., TURCK M. AND HOLMES K.K. Diagnosis of Coliform Infection in Acutely Dysuric Women. N. Engl. J. Med. 1982; 307(8): 463-468.
55. STAMM W.E., COUNTS G.W., WAGNER K.F., AMSEL R., RUSSELLA A.E. TURCK M. AND HOLMES K.K. Causes of the Acute Urethral Syndrome in Women. N. Engl. J. Med. 1980; 303(8): 409-415.
56. STEVENS D.L. & 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(5): 970-980.
57. SEWELL C.M., CLARRIDGE J.E., YOUNG E.J., AND GUTHRIE R.K. - Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. - J. Clin. Microbiol. 1982; 16(2): 236-239.
58. TSELENIS-KOTSOWILIS A.D., KOLIOMICHALIS M.P., AND PAPAVALASSI-LIOU J.T. Acute Pyelonephritis Caused by Staphylococcus xylosum. J. Clin. Microbiol. 1982; 16(3): 593-594.
59. WATANAKUNAKORN CHATRCHAI. Antimicrobial Susceptibility of - 200 Blood Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci to 20 Antimicrobial Agents. Scand. J. Infect. Dis. 1978; 138 (6) : 791 - 797 .

60. WALLMARK G., ARREMARK I, AND TELANDER B. Staphylococcus saprophyticus: A frequent Cause of Acute Urinary Tract Infection among Female Outpatients. J.Infect. Dis. 1978; 138 (6) 791 - 797.
61. YOUMANS G.R., PATTERSON P.Y., SOMMERS H.M. Infectología Clínica. Editorial Interamericana, México D.F., 2a. edición , - 1982. pág. 504-515.