

870127

13
2ej

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Actividad Hemolítica de Cepas de
Estafilococos Aislados a partir de Absesos en
Inspección de Carnes.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
GABRIELA GARCIA VARGAS

Asesor: Q.F.B. María del Socorro Pulido García
GUADALAJARA, JALISCO

1987



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

	Pag.
I.- INTRODUCCION	1
II.- GENERALIDADES	4
II.1.- Morfología.	4
II.2.- Fisiología.	5
II.3.- Características de cultivos.	5
II.4.- Toxinas.	7
II.4.1.- Exfoliativa.	7
II.4.2.- Alfa.	8
II.4.3.- Beta.	9
II.4.4.- Delta.	10
II.4.5.- Gama.	11
II.4.6.- Epsilon.	11
II.4.7.- Leucocidina.	12
II.4.8.- Enterotoxina.	12
II.5.- Enzimas extracelulares.	12
II.5.1.- Coagulasa.	12
II.5.2.- Hialuronidasa.	14
II.5.3.- Estafilocinasas.	14
II.6.- Patogenicidad.	15
II.6.1.- Poder patógeno.	15
II.6.2.- Mastitis estafilocócica.	16
II.6.3.- Intoxicación alimenticia.	17

III.- MATERIAL Y METODOS.	20
IV.- DISCUSION Y RESULTADOS.	37
V.- CONCLUSIONES.	40
VI.- BIBLIOGRAFIA.	42

1.- INTRODUCCION

Las carnes que se expenden para el consumo público las suministran diferentes especies animales como: - equinos, bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y aves domésticas. En algunos países se consume la carne de perro (Alemania, China), de búfalo (Italia, Bulgaria), de cebú (Brasil, India), de camello (Africa del norte) de reno (Noruega, Finlandia). También son comestibles muchos peces, crustáceos, moluscos, etc.

La inspección de carnes es muy importante en la sanidad pública: tienen que examinarse desde el punto de vista de su aprovechamiento como materia comestible y en caso de que contenga gérmenes de las infecciones e intoxicaciones que puedan provocar al hombre.

En el animal vivo el pH del músculo es aproximadamente de 7. Después de la muerte, el pH empieza a bajar hasta alcanzar un valor promedio de 5.7 en 24 horas, para después subir nuevamente hasta 6.3 mientras se produce la maduración. La carne debe utilizarse antes de que el pH haya alcanzado el valor de 6.2 porque los cambios bioquímicos provocados por las enzimas, su elevado contenido hídrico y su abundancia de nutrientes proporcionan

el ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos.

Los estafilococos constituyen un grupo de gérmenes de la mayor importancia en la inspección sanitaria de alimentos porque pueden producir intoxicaciones por la ingestión de su enterotoxina. Además, cuando en un producto alimenticio se encuentran muchos estafilococos, indican que el tratamiento higiénico que se le dio no fue el correcto o que contiene gérmenes que en determinadas circunstancias lo pueden hacer tóxico.

En los animales los estafilococos se han comprobado en varios procesos: mastitis de la vaca y de la oveja, dermatitis pustulosa del perro, abscesos en todas las especies incluidas las aves, artritis del ganado, piemia en corderos y en la mama bovina.

También se han encontrado estos gérmenes en la leche y productos lácteos procedentes directamente de la ubre enferma o indirectamente a través de excreciones que pueden salpicar o rociar la misma, o por personas que recogen y manipulan la leche.

Los animales para consumo humano pueden llegar al rastro con lesiones o abscesos antes de ser sacrificados y después del sacrificio puede haber una contaminación a

través de cuchillos, sierras, machetes, paños, aire, ma-
nos y ropa del personal, encontrando un excelente medio
para su crecimiento.

En este trabajo se le van a hacer diferentes prue-
bas a los estafilococos aislados de abscesos en inspec-
ción de carnes como son la coagulasa, DNasa, fermenta-
ción del manitol y producción de hemolisinas para deter-
minar la patogenicidad de los mismos.

II.- GENERALIDADES

Los estafilococos son cocos grampositivos que crecen agrupándose en racimos (griego staphyle "racimo de uvas"). Son microorganismos patógenos identificados desde hace mucho tiempo, se descubrieron al comenzar la década de 1880 en gran parte por trabajos que efectuó -- Rosenbach; se encuentran en todas partes y son la causa más importante de infecciones supuradas. Una vez que el estafilococo consigue penetrar en los tejidos del cuerpo, su multiplicación causa necrosis y formación de abscesos.

II.1.- Morfología.

Los estafilococos son organismos inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados y la gran mayoría no capsulados.

A diferencia de otros cocos, en su forma esférica son casi perfectos. Sus diámetros varían entre 0.7 y -- 1.2 micras y tienden a presentarse como masas de células en acúmulos que semejan racimos de uvas. Todos son Gram (+), pero en los cultivos algunos gérmenes pueden volverse individualmente Gram(-).

II.2.- Fisiología.

Los estafilococos son uno de los gérmenes más resistentes de entre las bacterias no esporuladas; pueden cultivarse a partir de muestras de pus después de varias semanas de su obtención y pueden vivir también durante meses en condiciones favorables en el polvo o en otras partes fuera del cuerpo. Mientras casi todas las bacterias mueren en 30 min. a 60°, los estafilococos necesitan temperaturas mayores por más tiempo, como 80°C por una hora; también son capaces de crecer en concentraciones relativamente altas (arriba del 15%) de cloruro de sodio por lo que en alimentos que contengan sal suficiente como conservador, los estafilococos pueden crecer y formar toxinas; esta propiedad también se aprovecha para preparar medios selectivos para su aislamiento.

III.3.- Características de cultivo.

En medios de agar algunos estafilococos forman pigmentos carotenoides (delta-caroteno y rubixantina) que dan a las colonias un color amarillo oro (S. aureus), limón (S. citreus) y otras que no lo forman y son blancas yesosas (S. albus). La mayoría de las cepas patógenas forman colonias doradas que en agar sangre presentan he-

mólisis, elaboran además una enzima llamada coagulasa y fermentan el manitol. La mayoría de las cepas patógenas de S. aureus y algunas de S. epidermidis producen desoxirribonucleasa extracelular que puede detectarse con cultivos en medios con DNA.

En el cuadro # 1 se muestran las características - de mayor valor para diferenciar las dos especies principales de Staphylococcus.

CUADRO # 1

Caracteres diferenciales ordinarios
de los estafilococos

	S. aureus	S. epidermidis
Pigmentación (colonia)	amarilla dorada	blanca
Coagulasas	positiva	negativa
Fermentación del manitol	ácida	negativa
Hemólisis	h-hemolítica	negativa
Lipasa	positiva	negativa
Desoxirribonucleasa	positiva	negativa
Proteína A	presente	ausente
Ácidos teicoicos de la pared celular	tipo ribitol	tipo glicerol

II.4.- Toxinas.

Las bacterias dan lugar a productos extracelulares que tienen diferente actividad biológica. Muchos de éstos son toxinas. Es difícil dar una definición clara de toxina bacteriana ya que varían mucho en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

Bonventre definió una toxina como una proteína de alto peso molecular de origen microbiológico la cual es antigénica y causa rompimiento de los procesos normales fisiológicos en un animal sensible.

Por el año de 1928 se comprobó la existencia de cuatro agentes hemolíticos (toxina alfa, beta, delta, -- gama) a los que llamaron hemolisinas y las cuales fueron diferenciadas por su actividad lítica en eritrocitos de diferentes especies.

II.4.1.- Toxina exfoliativa.

Kapral y Milles descubrieron que cierta clase de S. aureus producía una proteína distinta de las toxinas alfa y delta y que era responsable de la exfoliación de ratones recién nacidos y del síndrome de la piel escaldada en humanos a la cual se le llamó toxina exfolia-

tiva (ET), toxina epidermolítica, exfoliatina y epidermolisina.

ET es una proteína simple con peso molecular de 24,000 daltones, es antigénica e induce la formación de anticuerpos neutralizantes y precipitantes.

II.4.2.- Toxina alfa.

Algunas veces se le llama hemolisina por su intenso efecto hemolítico sobre eritrocitos de conejo, pero es citolítica y citotóxica para otras células y además es dermonecrótica, neurotóxica y mata animales de experimentación. Por lo que se ha sugerido que en lugar de hemolisina se le llame citolisina o toxina que daña la membrana.

Antes se creía que la toxina alfa consistía de dos componentes distintos: alfa-1 y alfa-2, pero trabajos posteriores indicaron que alfa-2 y la toxina-delta son idénticas.

Es una proteína y se han detectado como aminoácidos terminales: histidina, arginina y alanina.

Su peso molecular varía de 10^4 a 4.5×10^4 .

La mayoría de los investigadores consideran que - el primer sitio de acción de la hemolisina es la membrana celular y se cree que el receptor de membrana sea una proteína o contenga un componente de proteína. Son sensibles a esta hemolisina animales de sangre fría y caliente y la severidad de los efectos depende de la dosis.

II.4.3.- Toxina beta.

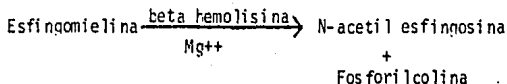
Esta toxina (esfingomielinasa C) y la toxina alfa (fosfolipasa C) de Clostridium perfringens tipo A son las únicas que se conoce su modo de acción enzimático. Es una proteína cuyos aminoácidos se conocen, algunos -- son: ácido aspártico, serina, ácido glutámico, glicina y lisina.

Es una esfingomielinasa, por lo tanto, la susceptibilidad de la célula a la toxina beta está relacionada directamente con la cantidad de esfingomielina de la membrana, la presencia de iones como Mg^{++} , Co^{++} y Mn^{++} aumentan la hemólisis de los eritrocitos. Puede dañar la membrana de eritrocitos, leucocitos y macrófagos.

Los eritrocitos más sensibles en orden decreciente son: carnero, hombre y rata.

Los productos de degradación de la esfingomielina

se han identificado por cromatografía de capa fina; Dogry et al supirieron la siguiente reacción de degradación:



II.4.4.- Toxina delta:

Es una protefna que carece de los aminoácidos - histidina, arginina, prolina, tirosina y cisteina.

Su actividad enzimática no es afectada por cationes.

Eritrocitos de varias especies (humanos, ovejas, conejos y monos) son más uniformemente sensibles a la hemolisina delta que a las hemolisinas alfa, beta o gama.

Su amplia actividad citolítica, su estructura química y su alta actividad superficial dan evidencias para indicar que la toxina lisa las células por un mecanismo de acción como un detergente. El sitio receptor en la membrana para la toxina delta se cree que es un ácido de cadena lineal con 13 a 18 carbonos.

Algunas características de esta toxina indicadas por Bernheimer son: 1) su relativa naturaleza hidrofóbi-

ca, ii) termoestabilidad, iii) un bajo grado de especificidad celular, iv) inhibición por fosfolípidos y v) alto grado de actividad superficial.

II.4.5.- Toxina gama.

La toxina gama lisa eritrocitos de conejo, humanos, oveja, cabra, perros y aves de corral pero no los de caballos. También lisa leucocitos humanos.

No se conoce su modo de acción.

II.4.6.- Hemolisina epsilon.

Muchos investigadores sugirieron que los estafilococos coagulasa negativos pueden producir hemolisina delta e indicaron que las hemolisinas epsilon y delta son idénticas. Ali Haque y Cabrera aplicaron su técnica de localización electroforética para detectar las hemolisinas producidas por S. epidermidis, varias hemolisinas fueron identificadas (epsilon, teta y kapa) pero su significado no se sabe aún.

Las propiedades de las hemolisinas se resumen en el cuadro # 2.

II.4.7.- Leucocidina.

En 1923, Panton y Valentine descubrieron un producto extracelular estafilocócico que afecta leucocitos, pero no eritrocitos. En honor a estos descubridores, esta toxina fue llamada leucocidina Panton-Valentine.

Por cromatografía con intercambio de iones se separa en dos componentes conocidos como: F (fast:rápido) y S (slow:lento), solos son biológicamente inactivos, pero juntos causan leucocitosis. El peso molecular de F y S es de 32,000 y 38,000 respectivamente.

Parece que la única respuesta de los leucocitos a la leucocidina es una alteración en la permeabilidad de cationes, lo cual tiene efectos secundarios: la célula pierde movilidad y se hincha, volviéndose esférica, con gránulos en su periferia y finalmente se destruye.

II.4.8.- Enterotoxina.

La relación de los estafilococos con la intoxicación alimentaria se describe en el punto II.6.3.

II.5.- Enzimas extracelulares.

II.5.1.- Coagulasa.

El estafilococo es la única bacteria que sinteti-

za una coagulasa capaz de coagular el plasma citratado u oxalatado.

La formación del coágulo ocurre en dos etapas:

1) Hay una reacción entre la substancia que produce la bacteria, procoagulasa, con un cofactor o activador presente en el plasma para formar el agente coagulante; la coagulasa.

2) Ocurre la coagulación del plasma bajo la influencia de la coagulasa.

Aún cuando el factor bacteriano es la procoagulasa, comúnmente se le llama coagulasa. Hasta ahora se han identificado 7 tipos de coagulasas que se diferencian inmunológicamente. La mejor prueba de que una cepa de estafilococos es potencialmente patógena es una respuesta positiva a la prueba de la coagulasa. Las cepas coagulasa positivo producen otras enzimas como hialuronidasa y DNasa.

II.5.2.- Hialuronidasa.

Su actividad enzimática es despolimerizando la substancia fundamental de los tejidos, el ácido hialurónico. Esta enzima se asocia con el grado de invasión de

cepas de estafilococos, las cepas no invasoras producen poca o ninguna cantidad de hialuronidasa.

II.5.3.- Estafilocinasa.

El estafilococo produce una cinasa que forma complejos con el plasminógeno (precursor de una proteasa del plasma: plasmina) para producir un producto con actividad celular similar a la de la plasmina y que causa la lisis de coágulos de fibrina.

CUADRO. # 2

Principales hemolisinas del *Staphylococcus aureus*

LISINA	ERITROCITOS SENSIBLES	LISINA CALIENTE-FRIA	SUBSTRATO	REQUERIMIENTO DE CATIONES	OTRAS ACTIVIDADES
Alfa	Conejo	No	Desconocido	Ninguno	Toxicidad - dermonecrótica, letal y leucocítica.
Beta	Oveja	Si	Esfigomielina	Mg++ Co++	Toxicidad - ligeramente letal (para conejos)
Gamma	Conejos, humanos, ovejas	No	Desconocido	Na+	Toxicidad - letal (para ratones)
Delta	Humanos, ovejas, conejos	No	Fosfatidilinositol	Ninguno	Cierta toxicidad demonecrótica letal y leucocítica

NOTA: Sólo se han puesto los eritrocitos de las especies más sensibles.

II.6.- Patogenicidad.

II.6.1.- Poder patógeno.

Los estafilococos están ampliamente difundidos en muchos lugares en la naturaleza y la mayoría tienen una existencia saprofitica. Algunos son patógenos y responsables de enfermedades en hombres y animales.

La mayoría de las lesiones producidas en animales domésticos por estos organismos son inflamaciones superficiales con formación de pus. Una vez que el estafilococo patógeno llega a los tejidos, su multiplicación causa necrosis y formación de abscesos.

También son responsables de algunas infecciones serias como mastitis en la mayoría de animales domésticos; piemia en corderos; septicemia y artritis en aves de corral; acné, furunculosis y batiomicosis en caballos y vacas; dermatitis y septicemia en perros y gatos.

En el hombre los estafilococos se encuentran generalmente en lesiones con pus e infecciones como osteomielitis, carbunco renal, bronconeumonías. En algunos casos la piemia y endocarditis maligna pueden resultar de un absceso primario localizado. Casos de envenenamiento por alimentos son frecuentemente debidos a la enterotoxii

na producida por estafilococos, los cuales crecen en comidas guisadas, leche y productos lácteos, pescado y salsas.

Muchos estafilococos muestran un importante grado de variación a los antibióticos, siendo estas clases resistentes, de gran importancia epidemiológica y terapéutica.

II.6.2.- Mastitis estafilocócica.

Staphylococcus aureus es un organismo muy versátil ya que se adapta fácilmente a los nutrientes disponibles en la leche o los tejidos invadidos, aún a pesar de la presencia de sustancias bactericidas.

Se caracteriza porque vive entre los neutrófilos, se multiplica y finalmente destruye a su huésped.

Se le ha dado importancia al estafilococo aureus ya que actualmente es el patógeno más común de la ubre bovina. Streptococcus agalactiae, también está muy difundido pero se le ha dado menos importancia porque es más susceptible a los antibióticos intramamarios y requiere de factores más específicos para su crecimiento, en contraste con el nada exigente estafilococo.

Suele afectar a los animales jóvenes y aparece inmediatamente después del parto. Las formas agudas se pueden complicar en ocasiones con gangrena y causar la muerte del animal.

En la actualidad, no existe un tratamiento específico.

II.6.3.- Intoxicación alimenticia.

La intoxicación que con más frecuencia se presenta es la producida por la ingestión de la enterotoxina producida por S. aureus; se le ha llamado así por causar gastroenteritis o inflamación de la mucosa gástrica e intestinal. Los estafilococos pueden producir cuatro tipos serológicos de enterotoxinas: A, B, C y D que difieren en su toxicidad, siendo la primera la más frecuente.

Los estafilococos pueden llegar a los alimentos por medio del hombre (vías nasales, granos y heridas infectadas) u otros animales. Los alimentos responsables de intoxicaciones alimenticias son los productos de pastelería rellenos de crema, el jamón, la lengua y la carne de aves, pescado y sus derivados, la leche y productos lácteos como crema y queso, carne de vaca salada, otras carnes y sus productos cárnicos, cremas, empana-

das y aderezos de ensalada.

La cantidad de enterotoxina producida se halla influída por el tipo de alimento, las proteínas y el almidón parecen estimular la producción de toxina. Los alimentos contaminados con estafilococos después de un tratamiento térmico, constituyen un magnífico medio de cultivo para el germen y para la producción de toxina.

La enterotoxina es muy termoestable. Resiste la ebullición durante 20-60 minutos y el tratamiento con autoclave aunque por este proceso va gradualmente perdiendo potencia. El tratamiento térmico que los alimentos sufren inmediatamente antes del consumo no es suficiente para destruir la toxina producida. Aunque no se pueda demostrar en los alimentos la presencia de estafilococos vivos, pueden causar intoxicación.

Cuando se produce intoxicación en el hombre por ingestión de la enterotoxina el período de incubación es de 2-3 horas (oscilando entre 1-6); los síntomas más comunes en el hombre son salivación, náuseas, vómito, diarrea, dolores de cabeza, calambres musculares, sudoración, escalofríos y temperaturas subnormales entre otros. No duran más de 1-2 días y la recuperación es fácil y total. Es muy bajo el índice de mortalidad. Casi nunca -

se requiere de un tratamiento pero en caso necesario se administran soluciones salinas por vfa parenteral para restaurar el balance salino y contrarrestar la deshidratación.

En una inspección bacteriológica realizada en Estados Unidos de carnes congeladas y ensaladas además de Staphylococcus aureus también encontraron Escherichia coli y coliformes.

III.- MATERIAL Y METODOS

Se procesaron 100 muestras obtenidas en el rastro de Zamora, Mich. a partir de abscesos encontrados en ganado vacuno.

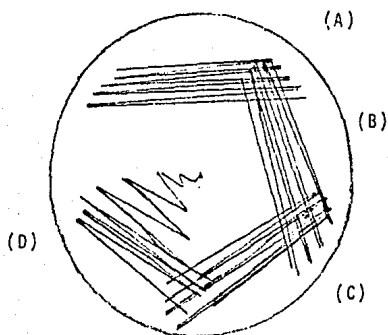
Para cada absceso se tomaron muestras con hisopos estériles e inmediatamente se introdujeron en tubos de ensayo con medio de Stuart para su posterior traslado al laboratorio.

Ya en el laboratorio, se sembró la muestra en un medio de cultivo adecuado que nos permita el crecimiento de todos los microorganismos presentes en la muestra tomada, como lo es el agar sangre, ya que además de ser un medio nutritivo nos permite determinar el tipo de hemólisis. Se utilizó la técnica por aislamiento para diseminar los organismos individuales lo suficiente para que puedan desarrollarse en colonias típicas aisladas (Fig. # 1). Se incubó a 37°C durante 24 horas; después de ese tiempo se observó el crecimiento desarrollado; a las colonias sospechosas de estafilococos se les hizo un frotis con coloración Gram para observar su morfología al microscopio (Fig. # 2) y para más seguridad posteriormente la prueba de la catalasa en portaobjetos (la cual

se observa inmediatamente y es a temperatura ambiente).- Después se resembró en Agar de Sal y Manitol y se incubó a 37° por 24 horas, posteriormente se realizó la prueba de la coagulasa y la prueba de la DNasa. La de la coagulasa se incubó a 37° leyendo cada media hora durante 4 horas y los tubos con resultado aparentemente negativo se dejaron 24 horas, para observarlos nuevamente. La prueba de la DNasa también se incubó por 24 horas observándose la existencia de hemólisis alrededor de las estirfas de estafilococos.

FIGURA # 1

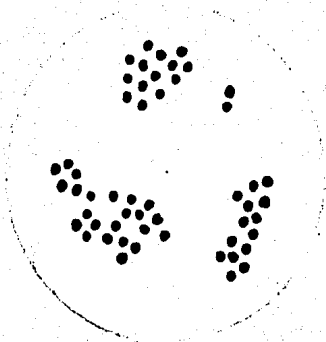
Aislamiento primario de microorganismos
Método para inocular una placa de medio de cultivo



- A) La torunda de algodón se frota a través de la superficie, sobre una zona pequeña cerca del borde de la placa.
- B) Se emplea un asa de platino, pasada por la llama y enfriada, para estriar otra zona de la placa.
- C) Pasar el asa por la llama y enfriar; entonces hacer varias estrías como se muestra en el grabado, montándolas sobre el rayado B).
- D) Pasar el asa por la llama y enfriar, entonces efectuar varios rayados montándose sobre el rayado C), -- según queda reflejado en el grabado.

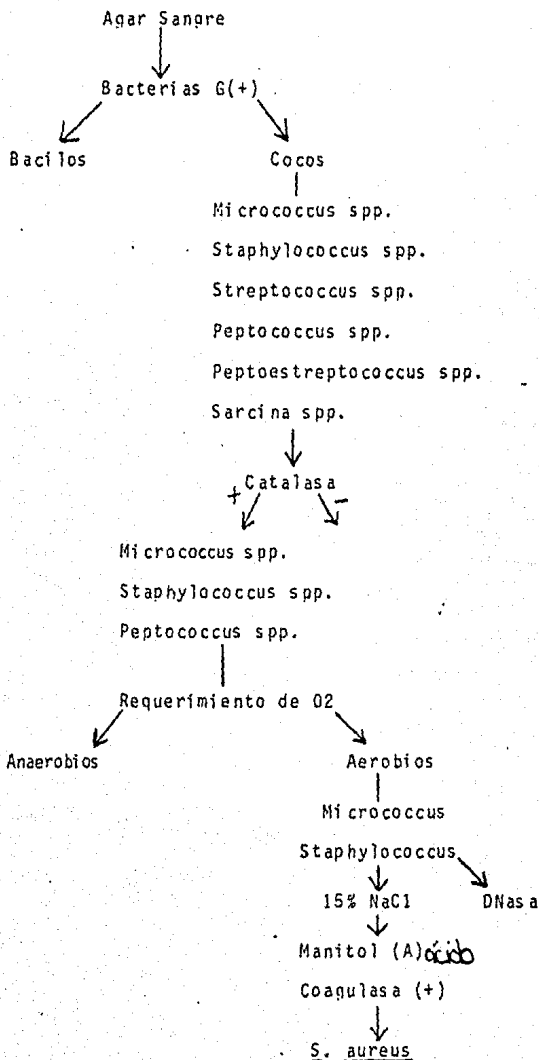
FIGURA # 2

Disposición en racimos de uvas característicos de los estafilococos.



CUADRO # 3

Esquema utilizado para la identificación de estafilococos



1) Medio de transporte de Stuart:

Fórmula aproximada en g/lt:

Agar	3.0
Tioglicolato de sodio	1.0
Glicerofosfato de sodio	10.0
Cloruro de calcio	0.1
Azul de metileno	0.002

Se suspenden 14.1 grs. de polvo en un litro de agua destilada, se calienta hasta hervir, se esteriliza en autoclave y se distribuye en tubos con tapón de rosca.

Este medio es un substrato semisólido empleado en el transporte y conservación de especímenes para cultivos de diversos gérmenes.

2) Agar sangre:

Su composición en g/lt:

Extracto de corazón	10.0
Triptosa	10.0
Sodio cloruro	5.0
Agar-agar	15.0
Aditivo: sangre	50-80 ml.

Se disuelven 40 g/lt, se esterilizan en autoclave, y se deja enfriar hasta 45°C, añadiendo 5-8% de sangre desfibrinada. Verter en cajas de Petri.

Su abundante base nutritiva ofrece condiciones óptimas de crecimiento a todos los microorganismos presentes, su pH (6.8) favorece la conservación de los eritrocitos y formación de halos claros de hemólisis.

3) Agar de Sal y Manitol:

Su composición en g/lt:

Extracto de carne	1.0
Mezcla de peptonas	10.0
Cloruro de sodio	75.0
D-Manitol	10.0
Agar	15.0
Rojo de fenol	0.025

Se disuelven 111.0 gr. del medio en un litro de agua destilada; se calienta hasta hervir para disolver el medio, se esteriliza en autoclave y se distribuye en cajas de Petri.

Es un medio selectivo empleado para aislar estafilococos patógenos. Este medio aprovecha la capacidad de

los estafilococos de desarrollar en presencia de cloruro de sodio al 7.5% y la de *S. aureus* de fermentar el manitol. La degradación del manitol con producción de ácido cambia el color del medio de rosado a amarillo.

4) Agar para el ensayo de desoxirribonucleasa:

Su composición en g/lt:

Triptosa	20.0
Sodio cloruro	5.0
Acido desoxirribonucleico	2.0
Agar-agar	15.0
Verde de metilo	0.05

Se disuelven 42.0 g/lt, se esterilizan en autoclave y se distribuyen en cajas de Petri.

Las colonias formadores de DNasa hidrolizan, a su alrededor, al ácido desoxirribonucleico (DNA) contenido en el medio de cultivo. Uteriormente, se acidifica el conjunto con HCl 1N, con lo cual precipita el DNA (turbidez), en tanto que las colonias DNasa-positivas presentan a su alrededor los correspondientes halos de aclaramiento. Otros autores recomiendan en su lugar medios de cultivo para ensayo de DNasa que contengan Azul de toluidina o Verde de metilo. En estos medios, las colonias -

DNasa-positivas presentan respectivamente halos rojo-rosados contrastando con el medio de cultivo azul, o bien, en el segundo caso, halos claros que destacan sobre el resto del medio de cultivo, verde.

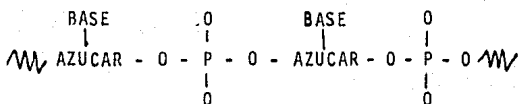
Se siembra en superficie de Agar de ensayo, por estriá, con un cultivo puro del material sometido a investigación. Sobre la misma placa, pueden sembrarse varias cepas en forma de bandas paralelas o por sectores. Se incuban de 18 a 24 horas, a 37°C.

Prueba de desoxirribonucleasa:

Esta prueba se usa para determinar la habilidad de un organismo para producir la enzima desoxirribonucleasa (DNasa) responsable de la degradación del ácido desoxirribonucleico (DNA); por lo tanto depende de la cantidad de DNasa producida por el estafilococo (discriminación cuantitativa). Staphylococcus aureus y S. epidermidis producen DNasa extracelular, pero S. aureus la produce en una mayor cantidad, por lo que esta prueba es generalmente positiva para S. aureus y negativa para S. epidermidis.

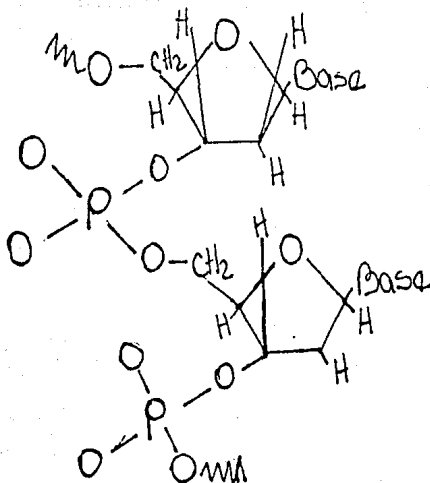
Se usa como una prueba complementaria para determinar el estafilococo patógeno.

El DNA es un miembro de la familia de polímeros - llamados ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos tienen - una cadena larga -una espina dorsal- que es la misma -- (salvo por su longitud) en todas las moléculas de ácidos nucleicos: es un poliéster (lo que se llama cadena polinucleotídica). El ester deriva del ácido fosfórico (la - parte ácida) y de un azúcar (la parte alcohólica).



Cadena de polinucleótido

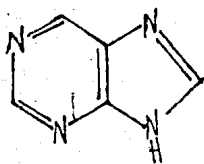
En el grupo de los ácidos nucleicos conocidos como ácidos ribonucleicos (RNA) el azúcar es D-ribosa y en los ácidos llamados desoxirribonucleicos (DNA) es la D-2-desoxirribosa. El prefijo 2-desoxi indica la ausencia - de un grupo -OH en la posición 2. Las unidades de azúcar se hallan en forma furanósica y se encuentran unidas al fosfato por medio de los hidroxilos en C-3 y C-5.



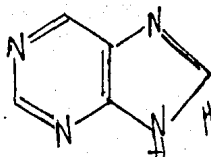
Acido desoxirribonucleico

Hay una de varias bases heterocíclicas unidas al C-1 de cada azúcar por medio de un enlace beta. Una unidad base-azúcar se denomina nucleósido; una unidad base-azúcar- ácido fosfórico es un nucleótido.

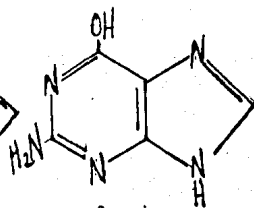
Las bases que se encuentran en el DNA son la adenina y la guanina que contienen el sistema anular de la purina y la citosina, la timina y la 5-metilcitosina tienen el sistema anular de la pirimidina.



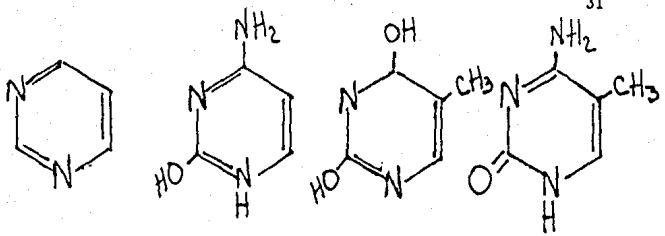
Estructura general



Adenina



Guanina



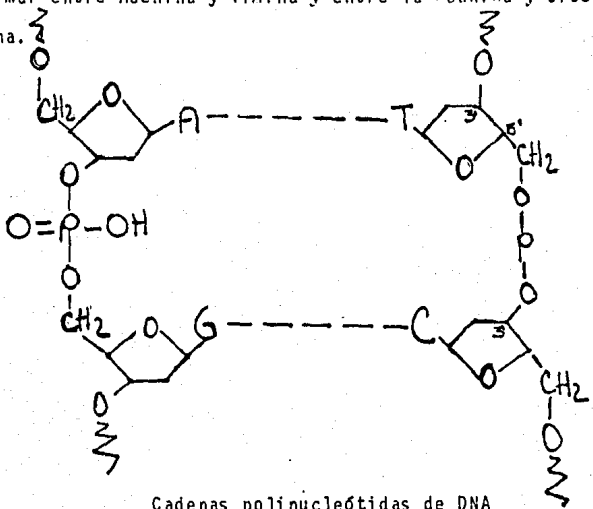
Estructura general

Citosina

Timina

5-Metilcitosina

El DNA son dos cadenas polinucleótidas idénticas, pero dirigidas en sentido opuesto; se hallan enrolladas una en torno a la otra, formando una hélice doble con un diámetro de 18.0 amstrong; ambas hélices se mantienen unidas a intervalos por puentes de hidrógeno entre las bases. Se cree que estos puentes solamente se pueden formar entre Adenina y Timina y entre la Guanina y Citosina.



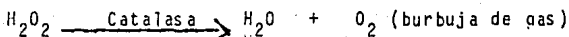
Cadenas polinucleótidas de DNA

5) Tinción de Gram:

- 1) Preparar el frotis.
- 2) Cubrir con violeta de genciana por un minuto.
- 3) Lavar al chorro de agua.
- 4) Cubrir el frotis con lugol por un minuto.
- 5) Lavar con alcohol acetona hasta la decoloración.
- 6) Lavar al chorro para arrastrar el exceso de alcohol.
- 7) Cubrir el frotis con safranina por un minuto.
- 8) Lavar al chorro, secar y observar con inmersión.

6) Prueba de la catalasa:

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua, como lo demuestra la siguiente reacción:



Químicamente es una hemoproteína de estructura parecida a la Hb, excepto que los cuatro átomos de Fe están en estado oxidado (Fe^{+++}) en lugar de reducido (Fe^{++}). Esta prueba se usa para diferenciar estafilococos spp. (positivos) de estreptococos spp. (negativos).

Prueba de portaobjetos a la temperatura ambiente (25°C):

- 1) Con un palillo se tomó el centro de una colonia pura de un cultivo de 18-24 horas, y se colocó en un portaobjetos limpio.
- 2) Se agregó una gota de H_2O_2 al 30% sobre las bacterias.
- 3) Se observó el burbujeo inmediato (liberación de gas)

NOTA: No tomar colonias de agar sangre y no invertir los pasos porque pueden dar reacciones falsas positivas.

7) Prueba de la coagulasa:

Esta prueba se usa para poner en prueba la habilidad de un organismo de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa (estafilocagulasa).

Se utiliza específicamente para diferenciar especies del género Staphylococcus: S. aureus (generalmente +) de S. epidermidis (-) y S. saprophyticus (-).

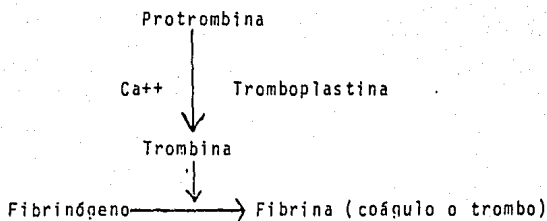
Una prueba coagulasa positiva es generalmente el criterio final para la identificación de Staphylococcus. Es frecuentemente utilizado como una indicación de virulencia o patogenicidad.

El mecanismo exacto y la estructura química de la estafilocagulasa es desconocido; sin embargo, hay mu-

chas hipótesis y mecanismos de la acción de la coagulasa. Se sabe que esta enzima interviene en la coagulación. Actúa sobre algún constituyente presente en el suero para producir un coágulo o trombo. In vitro, la coagulasa aumenta la velocidad de coagulación del plasma; el resultado final es la formación de un coágulo de fibrina.

Plasma $\xrightarrow{\text{Coagulasa bacteriana}}$ Coágulo de fibrina

El mecanismo normal de coagulación se muestra en el siguiente diagrama abreviado:



Algunos autores sugieren que la coagulasa es una substancia como la protrombina la cual reacciona con factores normales del plasma para formar una substancia como la trombina la cual convierte el fibrinógeno en fibrina.

La coagulación del plasma ocurre en dos etapas:

- 1) Hay una reacción entre la enzima producida por la bacteria una procoagulasa, con un factor o activador presente en el plasma para formar coagulasa, y
- 2) La verdadera coagulación del plasma activado por la coagulasa.

La coagulación que en realidad es una procoagulasa está presente en dos formas:

- 1) Coagulasa ligada: también se conoce como "factor de aglutinación", está unida a la pared bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivos. La actividad de la coagulasa ligada o fija no es inhibida -- por los anticuerpos formados contra la coagulasa libre.
- 2) Coagulasa libre: Es una sustancia semejante a la trombina que se halla presente en los filtrados de cultivos.

La prueba de la coagulasa en tubo detecta ambas coagulasas.

Prueba de la coagulasa en tubo (técnica):

- 1.- Colocar asépticamente 0.5 ml de plasma citratado hu-

mano diluido 1:5 con solución salina en el fondo de un tubo estéril.

- 2.- Añadir 0.5 ml de un cultivo puro de 18 a 24 horas en caldo del mismo organismo por investigar.
- 3.- Mezclar por rotación suave del tubo, evitando remover o agitar el contenido.
- 4.- Colocar el tubo en un baño de agua o estufa a 37°C . Observar la formación de un coágulo visible.

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 coágulo o gel permanece en el fondo del tubo. Las bacterias fuertemente coagulasa positivas pueden producir un coágulo en una a cuatro horas; por lo tanto se recomienda observar el tubo a intervalo de 30 minutos durante las primeras cuatro horas de la prueba. Otras cepas de S. aureus pueden producir sólo suficiente coagulasa como para dar una reacción positiva tardía luego de 18 a 24 horas de incubación; por lo tanto, todas las pruebas negativas a las cuatro horas, deben observarse después de 18 a 24 horas de incubación.

IV.- DISCUSION Y RESULTADOS

De las 100 muestras, 84 fueron positivas para estafilococo y las 26 restantes fueron negativas, encontrándose otros microorganismos como estreptococos, bacilos y estreptobacilos.

De las 84 cepas de estafilococo, 68 presentaron - alfa o beta hemólisis, siendo más frecuente la beta-hemólisis, (Cuadro # 4).

En cuanto a la producción de coagulasa fue positiva para 68 cepas, siendo beta-hemolíticas la mayoría, - aunque también hubo con hemólisis alfa, (Cuadro # 5).

CUADRO # 4

Tipo de hemólisis de 84 cepas
de estafilococos

	NUMERO	PORCENTAJE
Cepas hemolíticas	68	80.9
Cepas no hemolíticas	16	19.1
Hemólisis alfa	17	
Hemólisis beta	51	

CUADRO # 5

Relación entre la producción de coagulasa y su tipo de hemólisis.

Producción de coagulasa	Tipo de hemólisis
68 cepas positivas	51 beta
	17 alfa
16 cepas negativas	

En el cuadro # 6 se presenta la relación entre las cepas Manitol (+) con la prueba de la DNasa.

CUADRO # 6

Relación entre la fermentación de manitol y formación de DNasa

Manitol (+)	DNasa
68	12 (+)
	56 (-)

Los resultados obtenidos del análisis de las 100 muestras se presentan en resumen en el cuadro # 7.

CUADRO # 7

Resultados obtenidos

Catalasa	Hemólisis	Coagulasa	Manitol	DNasa	No. de cepas
+	beta	+	+	+	12
+	beta	+	+	-	39
+	alfa	+	+	-	17
+	-	-	-	-	16
-	-	-	-	-	16

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

V.- CONCLUSIONES

No podemos determinar la capacidad patógena del estafilococo basándonos en la producción de hemolisinas, fermentación del manitol o producción del pigmento dorado en agar-sangre, ya que no todas las cepas patógenas tienen estas características.

En general, la producción de coagulasa es la propiedad que más se relaciona con la capacidad patógena ya que se han encontrado mutantes coagulasa negativa de - - S. aureus que son tan patógenas como las cepas que sí la produce, así como otros estafilococos coagulasa negativos no considerados anteriormente como patógenos; además de que no hay pruebas para afirmar que la coagulasa esté directamente relacionada con la virulencia.

En este trabajo el 80.9% de 84 cepas de estafilococos presentaron carácter hemolítico por lo que se puede decir que el carácter hemolítico es una propiedad común de los estafilococos aislados de abscesos en inspección de carnes. Hay muy pocos trabajos realizados sobre esto mismo para comparar los resultados obtenidos pero en un trabajo hecho por Harry se obtuvo el 97% de cepas hemolíticas de un total de 132 cepas coagulasa positivas

siendo éstas aisladas de pollos, pavos y patos; en otro estudio Keskin-tepe obtuvo 53.38% de 133 cepas coagulasa positivas y negativas obtenidas de abscesos en caballos, vacas, perros, gatos y ovejas.

Todos los animales que llegan a los rastros deben ir completamente sanos, ya que la finalidad de esa carne es su consumo para alimentación del hombre; si presentan abscesos, lesiones o cualquier tipo de enfermedad pueden causar problemas en el hombre, ya que la carne es un excelente medio para reproducción bacteriana y puede haber contaminación de otros animales por medio de los operarios o por el material que se empleó en el sacrificio -- del animal.

Por este trabajo se demuestra que las condiciones de admisión y operación de animales para ser sacrificados pueden y deben mejorarse para asegurar la calidad de la carne que será consumida por el hombre.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- W. C. Frazier, Microbiología de los alimentos, España, Ed. Acribia.
- 2.- B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg y W. B. Wood, Tratado de Microbiología, España, Ed.-Salvat, 1972.
- 3.- Merchant-Pacjer, Bacteriología y Virología Veterinaria, España, Ed. Acribia.
- 4.- B. A. Freeman, Tratado de Microbiología de Burrows, México, Ed. Panamericana, 1983.
- 5.- Koneman, Allen, Dowell y Sommers, Diagnóstico microbiológico, Argentina, Ed. Panamericana, 1983.
- 6.- Difco, Manual de Bacteriología (recopilación de técnicas).
- 7.- Robert Thornton Morrison y Robert Neil Boy, Química Orgánica, Estados Unidos, Fondo Educativo Interamericano, 1976.
- 8.- Jean. F. Mac Faddin, Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, Estados Unidos, Second edition.

- 9.- César Agenjo Cecilia, Enciclopedia de la inspección veterinaria y Análisis de alimentos, Madrid, España-Calpe, S. A., 1980.
- 10.- Wisseman, Gordon M, The Hemolysins of *Staphylococcus aureus*, Bact. Rev., 39:4:1975.
- 11.- Menes Ignacio, García Ma. Luisa, Actividad hemolítica y hemolisinas producidas por estafilococos aislados a partir de abscesos en inspección de carnes, - Rev. Lat-Amer. Microbiol., 24:1982, 151-156.
- 12.- Rogolsky, Marvin, Nonenteric Toxins of S. aureus, - Microbiol. Rev., 43:2:1979, 320-360.
- 13.- Keskintepe H, Staphylococci in animals. Characteristics, distribution and its public health significance, Veteriner Fakultesi Dergisi, 24:1977, 90-98.
- 14.- Anderson J, Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis, Br. Vet. J., 132 : 3:1976, 229-245.
- 15.- Tesis profesional de Romo Rodríguez Eusebia Lourdes, "Aislamiento de S. aureus a partir de muestras de materia fecal de individuos normales y diarreicos", U.A.G., Guadalajara, Jal., 1979.