

247
17



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**CORRELACION ENTRE PRODUCCION DE
PROTEINA "A" Y PATOGENICIDAD EN
Staphylococcus aureus**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P r e s e n t a

NORMA ANGELICA CASTELLANOS CHAVEZ

FALLA DE ORIGEN

México D F

1989



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.

INDICE.

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
I. GENERALIDADES	4
A. Importancia clínica de <u>Staphylococcus</u>	4
B. Características morfológicas y fisiológicas del género <u>Staphylococcus</u>	5
C. Enzimas y Toxinas estafilocócicas	9
C.1 Enzimas extracelulares	9
C.2 Toxinas	12
C.2.1 Toxinas citolíticas	12
C.2.2 Toxina exfoliativa	13
C.2.3 Enterotoxinas	14
C.2.4 Exotoxinas pirógenas	15
D. Pruebas de rutina para la identificación de estafilococos	15
D.1 Hemólisis	15
D.2 Desarrollo en distintos medios selectivos	16
D.3 Producción de pigmento	17
D.4 Catalasa	17

D.5	Caldo manitol rojo de fenol	18
D.6	DNAsa	18
D.7	Coagulasa	18
E.	Proteína A	19
E.1	Características de la proteína A	19
E.2	Afinidad de la proteína A por la fracción cristallizable (Fc) de las gamma globulinas	20
E.3	Reacción Pseudoinmune	21
E.4	Probable relación entre patogenicidad y producción de proteína A	23
II.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
A.	Material	26
A.1	Material biológico	26
A.2	Material de vidrio	26
A.3	Material normalmente empleado en el laboratorio.	27
A.4	Equipo	28
A.5	Medios de cultivo	28
A.6	Reactivos y soluciones	28
B.	Metodología	29
B.1	Pruebas realizadas a cada una de las cepas de <u>Staphylococcus</u> aisladas clínicamente	29

B.1.1	Desarrollo en caldo manitol rojo de fenol adicionando cloruro de sodio al medio	29
B.1.2	Desarrollo en tripticaseína soya agar	29
B.1.3	Desarrollo en manitol sal agar	30
B.1.4	Degradación del manitol presente en el caldo y en el agar	30
B.1.5	Desoxirribonucleasa termorresistente	30
B.1.6	Presencia de pigmento	31
B.2	Técnica de sensibilización de eritrocitos de carnero	31
B.3	Prueba de la presencia de proteína A por medio de la reacción de hemaglutinación en 300 casos clínicos ..	33
III.	RESULTADOS	35
IV.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	39
V.	CONCLUSIONES	45
ANEXO	47
VI.	BIBLIOGRAFIA	49

INTRODUCCION.

Debido a la importancia que tiene la determinación de la patogenicidad de las cepas de Staphylococcus aisladas en el laboratorio clínico, durante mucho tiempo se han desarrollado pruebas indicativas de ésta. Como es sabido de todos, la prueba de la coagulasa es la que universalmente se acepta como la determinante, pero no cesan las investigaciones que lleven a otra que con ahorro de tiempo, con más confiabilidad y de ser posible más económica, pueda ser complementaria o aún sustituir a la empleada actualmente.

El análisis rutinario de laboratorio no proporciona una identificación rápida para las cepas de Staphylococcus ya que éste se basa en la determinación de las características biológicas y morfológicas, para las cuales se requiere de un tiempo mínimo de 48 horas. Dentro de estas características están:

- La agrupación típica en racimos.
- El desarrollo de colonias comunmente grandes, cuyas características dependen del medio de cultivo.
- La producción de catalasa.
- La capacidad de producir ácido a partir de manitol y reducir telurito a telurio.
- La producción de desoxirribonucleasa (DNAsa).
- La capacidad de producir coagulasa, que es otra característica y la más importante de los estafilococos patógenos.

Para acortar el tiempo que normalmente se emplea en el análisis rutinario, se propone correlacionar la proteína A de Staphylococcus, con su patogenicidad, ya que la producción de esta proteína se puede determinar con rapidez, sensibilidad y especificidad mediante una reacción inmunológica. Se trata de una reacción de hemaglutinación, en la cual, los eritrocitos de carnero se sensibilizan con suero de conejo anti-glóbulos rojos de carnero y este reactivo, al enfrentarse a las cepas de estafilococos productoras de proteína A, producirá el acoplamiento entre la fracción cristalizante (Fc) de las gamma - globulinas (IgG) y dicha proteína, debido a la afinidad que tiene ésta por esa porción del anticuerpo. Este fenómeno biológico, se conoce como reacción pseudoinmune ya que no interviene la fracción anticuerpo (Fab).

En esta reacción de hemaglutinación se utiliza como soporte glóbulos rojos de carnero sensibilizados con un anticuerpo homólogo, la fracción cristalizante (Fc) libre se unirá a la proteína A y esto puede detectarse macroscópicamente como una reacción de aglutinación.

Este estudio inmunológico muestra una fuerte correlación con la patogenicidad de la bacteria. Esta correlación puede aportar una nueva dimensión al diagnóstico de las enfermedades estafilocócicas.

OBJETIVOS.

- Relacionar la presencia de proteína A con la patogenicidad de las cepas de estafilococos con el objeto de considerar su empleo como técnica rutinaria.

- Detectar la proteína A que se encuentra en la pared celular de los estafilococos patógenos y que es típica de estos microorganismos.

- Obtener un reactivo biológico consistente en eritrocitos de carnero sensibilizados con suero de conejo anti-glóbulos rojos de carnero, para la detección de dicha proteína.

- Valorar la confiabilidad de un método de detección de proteína A por medio de una reacción de hemaglutinación, utilizando el reactivo preparado, para así obtener un resultado más rápido que el que se requiere normalmente en las pruebas de rutina.

I. GENERALIDADES.

A. Importancia clínica de Staphylococcus.

S. aureus continúa siendo la causa de nuevos y serios problemas infecciosos, por lo que tiene un alto índice de morbilidad y mortalidad. Los desórdenes tóxicos, como el síndrome de choque tóxico y el síndrome estafilocócico de piel escaldada, muestran el potencial infeccioso de S. aureus; este microorganismo causa la mayoría de las infecciones supurativas que se encuentran en la práctica médica y también se le considera responsable de un gran porcentaje de casos de intoxicación alimentaria.

Los estafilococos causan un gran número de enfermedades tanto en hombres como en animales. Cuando desarrollan in vivo o in vitro, liberan una serie de toxinas y enzimas que tienen una variedad de efectos biológicos sobre el tejido del órgano afectado. Se ha reportado por medio de electroforesis la presencia de 18 productos extracelulares, asociados con la patogenicidad de S. aureus. (1),(16),(13)

El síndrome de choque tóxico se reconoció como una enfermedad específica en 1978 por Todd y colaboradores, quienes lo asociaron con una infección estafilocócica en niños. En 1980, However lo relacionó con el uso de tampones durante la menstruación. Posteriormente, se identificó una toxina producida por algunas cepas de Staphylococcus, que a la fecha se ha relacionado

con la mayoría de los casos de síndrome de choque tóxico. (1)

El género Staphylococcus constituye parte de la flora habitual de la piel, y puede ocasionar serios problemas especialmente cuando las barreras naturales están comprometidas por cirugías, traumatismos, implantación de prótesis artificiales o terapia inmunosupresora. (16)

La mayoría de las investigaciones se dirigen hacia los estafilococos coagulasa positiva ya que son responsables de infecciones cutáneas (formación de furúnculos, carbuncos, impétigo y síndrome estafilocócico de piel escaldada), neumonía, osteomielitis, piocartrosis, bacteremia, endocarditis, infecciones estafilocócicas metastásicas, intoxicación alimentaria, enterocolitis estafilocócica y son causantes de síndrome de choque tóxico. También deben tomarse en cuenta los estafilococos coagulasa negativa ya que actualmente son la causa de bacteremia, endocarditis bacteriana, colonización de las anastomosis o derivaciones ventrículo-auriculares, infecciones de heridas e infecciones de las vías urinarias. (23)

B. Características morfológicas y fisiológicas del género Staphylococcus.

En la familia Micrococcaceae, el género de importancia médica es Staphylococcus, estos microorganismos poseen las siguientes características: células redondas de 0.8 a 1.0 μm de diámetro, Grampositivos, inmóviles, no esporulados, y por lo general

no capsulados; unas pocas cepas producen una cápsula o capa mucosa que incrementa la virulencia del microorganismo.

Con respecto a su agrupación, en extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas; los racimos irregulares se pueden observar en forma característica si el extendido proviene de un cultivo en medio sólido, y cuando el medio de cultivo es líquido, son comunes las cadenas cortas o bien los diplococos. (15)

El desarrollo y tamaño de las colonias de Staphylococcus dependen del medio de cultivo, pero crecen bien en muchos medios de rutina en el laboratorio, como agar nutritivo o agar triptica-seína soya; en estos medios las colonias generalmente son lisas, opacas, circulares, convexas-bajas, y varían de 1 a 4 mm de diámetro. Algunos laboratorios emplean medios selectivos que permiten diferenciar a este género de otras bacterias. Los medios selectivos contienen ciertos sustratos como sales de telurito, cloruro de sodio, una concentración elevada de cloruro de litio, glicina, lecitina y manitol, todos estos componentes por un lado, -- permiten casi en forma exclusiva el crecimiento de los estafilococos y, por el otro la diferenciación de los mismos, inhibiendo el desarrollo de los microorganismos contaminantes. (5)

La mayoría de las colonias de S. aureus presentan un pigmento amarillo dorado en el primer aislamiento, este pigmento es un lipocromo formado por dos carotenoides. La presencia de éste no es un criterio válido para distinguir S. aureus de S. epider-

midis, ya que en celosa sangre, generalmente ambas especies producen colonias blancas. (15)

Los estafilococos pueden producir hemólisis total, debido a que producen hemolisinas solubles. Esta hemólisis no sólo se asocia con S. aureus sino que también pueden producirla contadas cepas de S. epidermidis. (17),(23),(15)

La mayoría de las cepas de Staphylococcus desarrollan en un amplio rango de temperatura y pH (6.5°C a 46°C y 4.2 a 9.3 - unidades de pH) siendo la temperatura óptima de 30°C a 37°C y el pH óptimo de 7.0 a 7.5. (15)

Los cocos Grampositivos poseen un elevado contenido de glucopéptidos y un menor contenido lipídico en su pared celular. La de S. aureus consta de tres componentes principales: peptidoglucano, ácido teicoico y proteína A. (16)

Los alcoholes y otros solventes orgánicos no penetran las paredes celulares deficientes en lípidos, esto permite que los microorganismos Grampositivos retengan al colorante cristal violeta en la tinción de Gram. (17)

El hecho de poseer un elevado contenido de glucopéptidos los ayuda a resistir la acción de agentes físicos, químicos y biológicos.

- Agentes físicos. Los estafilococos son muy resistentes a la luz solar, al calor, y a los efectos de la desecación. (Resisten el calor húmedo hasta de 60°C durante 30 minutos) (17)

Sobreviven a muchas condiciones ambientales desfavorables, de ahí que estos microorganismos puedan transmitirse a través del polvo.

- Agentes químicos. Este género es resistente a la acción del fenol al 5%, al $HgCl_2$, al cloruro de benzalconio (benzal), a la oxidación por telurito, a altas concentraciones de cloruro de sodio, y a la acción germicida de jabones tensoactivos y detergentes. (5).

- Agentes biológicos. Los estafilococos son resistentes a la penicilina y a la meticilina. (26), (15)

Staphylococcus staphylolyticus produce un antibiótico que lisa a las células de S. aureus, a este antibiótico se le denominó lisostafina; es una peptidasa con un peso molecular de 32 000 y que actúa específicamente sobre los puentes de poliglicina de la pared celular de Staphylococcus sp. (Las cepas de S. staphylo--lyticus son resistentes a este antibiótico).

Concentraciones mínimas de lisostafina inhiben el crecimiento de los estafilococos coagulasa positiva aislados de pacientes con bacteremia. Los estafilococos coagulasa negativa requieren de concentraciones mucho muy elevadas para ser inhibidos. (18)

Los estafilococos son facultativos, aunque las condiciones aerobias favorecen el crecimiento. La energía la obtienen tanto de la vía respiratoria como de la fermentativa.

Estos microorganismos realizan la glucólisis, el ciclo de pentosa fosfato y del ácido cítrico, siempre y cuando se encuentren en condiciones apropiadas de crecimiento. Las fuentes de carbono que utilizan los estafilococos son extensas, el principal producto del catabolismo de la glucosa es el ácido acético con pequeñas proporciones de CO_2 si las condiciones son aerobias, pero si las condiciones son anaerobias el principal producto es el ácido láctico produciéndose también acetofina. (15)

C. Enzimas y Toxinas estafilocócicas.

C.1 Enzimas extracelulares.

Se han encontrado una gran variedad de productos extracelulares o enzimas que promueven la invasividad y virulencia de los estafilococos.

Existen enzimas que sólo posee S. aureus y que son de gran ayuda en la identificación de este microorganismo; pero también existen enzimas comunes al género Staphylococcus que le permiten diferenciarlos de otros géneros. Entre las primeras se mencionen las siguientes:

- Coagulasa. La capacidad de coagular el plasma aún en presencia de un anticoagulante, es el criterio más usado y aceptado para la identificación de estafilococos patógenos. La acción de la coagulasa en la coagulación del plasma es similar a la conversión del fibrinógeno en fibrina catalizada por la trom-

bina, ya que la coagulasa reacciona con un factor desconocido presente en el plasma (FRC, factor de reacción de la coagulasa), reedituando un complejo similar a la trombina, el coágulo formado impide que actúen los mecanismos de defensa del huésped en contra del microorganismo. (15),(23)

- Lipasa. La producción de lipasas se relaciona con la invasividad de los estafilococos hacia el tejido cutáneo y subcutáneo sano, así como con la formación de furúnculos. Las lipasas son enzimas que hidrolizan a los lípidos; un ejemplo de lipasa presente en S. aureus, es la lecitinasa cuyo papel es degradar a la fosfatidil colina llamada también lecitina. (23)

- Estafiloquinasa o Fibrinolisisina. La fibrinolisisina es producida por muchas cepas de S. aureus, su función es disolver los coágulos, debido a que activa al plasminógeno para transformarlo en plasmina, que es una enzima que disuelve la fibrina liberando al microorganismo del coágulo y promoviendo su invasividad. (15),(13)

- Hialuronidasa. Es una enzima que favorece la diseminación de la infección porque hidroliza al ácido hialurónico presente en el tejido conectivo; es producida por la mayoría de las cepas de S. aureus. (15)

- Manitolasa. Los estafilococos utilizan una gran variedad de carbohidratos; dentro de éstos está el manitol, al cual

degradan por medio de una enzima que es la manitolasa y que está presente casi exclusivamente en cepas de S. aureus. (Hay pocas cepas de S. epidermidis que poseen esta enzima).

Las enzimas comunes al género son:

- Fosfatasa. La fosfatasa tiene la capacidad de hidrolizar a los ésteres fosfóricos. Para determinar su actividad se emplea como sustrato monofosfato de fenolftaleína. Las cepas de S. aureus y S. epidermidis son fosfatasa positiva. Existen reportes cuantitativos que muestran que S. aureus produce una mayor cantidad de esta enzima en relación con S. epidermidis. (23)

- Gelatinasa. S. aureus y S. epidermidis hidrolizan la gelatina ya que ambas especies poseen la enzima gelatinasa. (24)

- Beta-lactamasa o penicilinas. Esta enzima inhibe la función de la penicilina porque rompe la unión del anillo beta-lactámico. Actúa sobre las penicilinas naturales, sintéticas y semisintéticas. La mayoría de las cepas de Staphylococcus son resistentes a la penicilina debido a que producen penicilinas.

- Desoxirribonucleasa (DNAsa). La DNAsa es una fosfodiesterasa que tiene la capacidad de degradar al DNA. Existen dos tipos de DNAsa: La DNAsa termolábil, cuya producción está relacionada con ambas especies de Staphylococcus y la DNAsa termorresistente que sólo se ha detectado en cepas de S. aureus. (22)

- Catalasa. El peróxido de hidrógeno es uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono. La catalasa es una enzima que produce el microorganismo para descomponer al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Esta enzima no es de mucha importancia en la identificación de los estafilococos patógenos ya que la produce todo el género y la mayoría de las bacterias aerobias y facultativas con excepción de los estreptococos. (17)

C.2 Toxinas.

C.2.1 Toxinas citolíticas. Las hemolisinas y la leucocidina, son toxinas citolíticas elaboradas por S. aureus. Se llaman toxinas citolíticas porque provocan la destrucción in vivo de células de diferentes especies. Existen cuatro tipos de hemolisinas (alfa, beta, delta y gamma), las cuales se encargan de lizar a las células rojas de la sangre y cuyas características se mencionan a continuación:

- Toxina alfa (α - Hemolisina). La hemólisis que provoca esta toxina es completa y franca cuando se trata de eritrocitos de carnero o conejo. La hemolisina alfa origina la descarga de lisosomas, lesiona a las plaquetas y macrófagos, no afecta a los monocitos y se encuentra predominantemente en cepas de estafilococos aisladas de humanos. (15)

- Toxina beta (β - Hemolisina o esfingomielinasa estafilo

cóccica). No da una zona amplia de hemólisis. Se presenta en cepas aisladas del ganado bovino y es rara en humanos. Se le llama esfingomielinasa porque degrada a la esfingomielina provocando una lesión en la membrana del eritrocito y, como consecuencia, la hemólisis. (15)

- Toxina delta (δ - Hemolisina). Esta hemolisina da una zona amplia de hemólisis, ataca eritrocitos de diferentes mamíferos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas. La toxina delta inhibe la absorción de agua en el fleón, altera la permeabilidad iónica en el fleón de cobayos, estimula la liberación de insulina y la acumulación de AMP. (15)

- Toxina gamma (γ - Hemolisina). Es una toxina que provoca la hemólisis de eritrocitos humanos, de carnero y de conejo. Se tiene muy poca información sobre esta hemolisina, pero así como las demás toxinas, desempeña un papel muy importante en el desarrollo de una infección estafilocócica. (15)

- Leucocidina. La leucocidina ataca a los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Es una toxina que protege al microorganismo de los leucocitos del huésped, ya que provoca la destrucción de los gránulos del polimorfonuclear y, como consecuencia, la muerte del leucocito. (15)

c.2.2 Toxina exfoliativa o epidermolítica. El síndrome estafilocócico de piel escaldada es provocado por esta toxina ya que causa la separación de las capas celulares de la epidermis provo

cando manifestaciones cutáneas, no provoca muerte celular ni respuesta inflamatoria. Si se inyecta por vía venosa en el conejo causa necrosis de las células epidérmicas. Tiene efecto letal, actúa sobre el músculo cardíaco y produce la muerte de los conejos.

C.2.3 Enterotoxinas. Tienen efecto en la vía digestiva. Se han identificado siete tipos de enterotoxinas: A, B, C₁, C₂, D, E y F. Las toxinas A y D se relacionan frecuentemente con intoxicaciones por alimentos, mientras que la enterotoxina B se asocia a infecciones hospitalarias. La enterotoxina F, fue la última que se descubrió y aisló de cepas de S. aureus, se observó que tiene una relación estrecha con algunos signos y síntomas del síndrome de choque tóxico. (1),(15)

Las enterotoxinas estafilocócicas resisten la acción proteolítica del jugo gástrico, de la tripsina y la pepsina. Los alimentos ricos en carbohidratos son ideales para que los estafilococos capaces de producir las toxinas se multipliquen y las excreten al alimento; y una vez que éstas son ingeridas por el sujeto, se presenta un período de incubación de 1 a 4 horas, comenzando entonces la sintomatología que consiste en: náuseas, vómito en proyectil, cuadro diarreico y espasmos a nivel intestinal.

Estas toxinas sólo actúan en el hombre y en algunos monos; no son mortales para los adultos, pero en recién nacidos pueden provocar la muerte.

c.2.4 Exotoxinas pirógenas. Se han identificado tres tipos de exotoxinas estafilocócicas pirógenas: A, B y C; ésta última es producida por cepas de S. aureus aisladas de pacientes con síndrome de choque tóxico.

El sistema inmune del huésped se ve afectado por la exotoxina pirógena de tipo C ya que provoca un aumento de la hipersensibilidad adquirida y actividad mitógena sobre células T no específicas. (15)

D. Pruebas de rutina para la identificación de estafilococos.

Después de obtener la muestra del paciente, la cual puede provenir de: exudado faríngeo, material de pústula o herida, líquido de impétigo, material de un absceso, secreción del ojo, supuración del oído externo, orina, exudado vaginal, sangre o líquido cefalorraquídeo, se procede a sembrar en gelosa sangre para el aislamiento de este tipo de materiales clínicos y posteriormente se realizan las pruebas de rutina que normalmente se emplean para la identificación del género Staphylococcus.

D.1 Hemólisis.

La gelosa sangre no es un medio selectivo, pero es un medio muy rico que permite observar si el microorganismo produce hemólisis. Para diferenciar las distintas actividades hemolíticas, se debe emplear en la elaboración del medio de cultivo, sangre de

carnero y base de tripticasefina soya agar.

Las colonias de S. aureus aparecen rodeadas de una zona de hemólisis completa, aunque también se han detectado algunas cepas de S. epidermidis que la producen; por esta razón el medio de gelosa sangre sólo se emplea para el aislamiento primario de las -- muestras clínicas. (15)

D.2 Desarrollo en distintos medios selectivos.

Los estafilococos son microorganismos que no requieren medios especiales, pero es conveniente utilizar medios selectivos para que inhiban el crecimiento de otras bacterias, favoreciendo el desarrollo de los primeros.

- Agar sal manitol. Es un medio selectivo porque contiene una elevada concentración de cloruro de sodio (75 g. de NaCl por litro), además el indicador ácido-base que contiene vira a amarillo si el microorganismo utiliza el manitol. (2)

- Agar 110 (S 110). La concentración de cloruro de sodio que posee este medio (75 g. de NaCl / 1000 ml), indica que es selectivo; pero esto no es cien por ciento cierto ya que no sólo desarrollan los estafilococos sino que también crecen otros microorganismos como: Streptococcus faecalis y algunas especies del género Proteus. (8)

- Agar Chapman Stone. Es un medio selectivo para el aislamiento de estafilococos, es similar al Agar 110. Las colonias

de S. aureus son amarillas o anaranjadas con una zona clara alrededor, lo cual implica la fermentación del carbohidrato. Las colonias de S. epidermidis son blancas o incoloras. (8)

- Agar Vogel Johnson. Es un medio selectivo para estafilococos manitol positivo, ya que permite la identificación y diferenciación de estafilococos patógenos que producen ácido, virando el indicador rojo de fenol y reduciendo el telurito a telurio (colonias negras). La flora acompañante es casi totalmente inhibida por el contenido del telurito, cloruro de litio y glicina. (8)

- Agar Baird Parker. Es un medio selectivo para estafilococos. El contenido de huevo permite observar lipólisis y proteólisis de los estafilococos en forma de halos característicos; además de la reducción del telurito a telurio. (8), (2)

D.3 Producción de pigmento.

En gelosa sangre no se observa la producción del pigmento, pero en agar 110 y en agar sal manitol, después de otras 24 horas de incubación a temperatura ambiente, se puede distinguir en forma clara que las colonias de S. aureus presentan pigmento dorado, mientras que las de S. epidermidis lo presentan de color blanco. (23)

D.4 Catalasa.

La catalasa es una prueba de rutina que se realiza única y exclusivamente para diferenciar al género Staphylococcus del género

ro Streptococcus. Esta nunca se debe realizar en gelosa sangre porque da una reacción falsa positiva debido a que los eritrocitos que contiene el medio son productores de catalasa. (23)

D.5 Caldo manitol rojo de fenol.

La degradación del manitol con producción de ácido, se detecta por el vire del indicador ácido-base rojo de fenol. La presencia de un color amarillo indica prueba positiva. Las cepas de S. aureus son manitol positivo, sin embargo no hay que descartar que también existen algunas cepas de S. epidermidis que degradan el manitol.

D.6 Desoxirribonucleasa (DNAsa).

Al complejo enzimático capaz de degradar al DNA después de exponerse a temperaturas de 90° - 100°C durante 15 minutos, se le designó DNAsa estable al calor o termorresistente, mientras que al complejo que pierde esta capacidad se le nombró DNAsa termolábil. Con estos estudios se logró comprobar la existencia de dos complejos enzimáticos cuya actividad degradativa depende de la temperatura. Es importante mencionar que la forma termorresistente se ha detectado en la mayoría de las cepas coagulasa positiva. (22).

D.7 Coagulasa.

Un estafilococo que produce coagulasa, es patógeno, inde-

pendientemente de la pigmentación de la colonia.

Esta prueba de rutina generalmente se realiza en el caldo manitol rojo de fenol neutralizado con NaOH o KOH diluida y adicionando plasma diluido 1:4. Posteriormente se examina en busca de coágulos en intervalos de 30 minutos durante 4 - 6 horas; si no se observan coágulos al finalizar este periodo, se deberá examinar a las 6 y 24 horas para dar la prueba como negativa. (23)

Es muy importante que el caldo manitol rojo de fenol esté neutralizado, porque en medio ácido, las enzimas se desnaturalizan y el plasma se coagula en forma inespecífica.

E. Proteína A.

E.1 Características de la proteína A.

El principal componente proteico de la pared celular de S. aureus es la proteína A, se ha demostrado que ésta comprende el 1.7 % de la bacteria y el 6.7 % de la pared celular. Las investigaciones realizadas muestran que la proteína A está ligada covalentemente al peptidoglucano de la pared celular, pero el punto exacto de unión no está esclarecido. (29)

La proteína consta de una sola cadena polipeptídica, compuesta de 378 aminoácidos, con un peso molecular de 41 494. (28)

Aproximadamente, un tercio de la proteína A se libera ha-

cia el medio y el resto se incorpora a la pared celular de la bacteria en crecimiento, pero existen cepas de S. aureus que no son capaces de incorporar dicha protefina a su pared, liberándola toda hacia el exterior, este fenómeno generalmente se dá cuando las cepas son resistentes a la meticilina. (26)

La mayoría de las cepas de S. aureus poseedoras de protefina A se aíslan de casos clínicos, de ahí su importancia.

Existen algunos antibióticos como la estreptomycin, el cloramfenicol y la puomicina, que inhiben la síntesis de protefina A, debido a que interfieren en ciertas funciones de los ribosomas. La vancomicina no inhibe la síntesis de protefina A pero sí la del peptidoglucano. (26)

E.2 Afinidad de la protefina A por la fracción cristalizable (Fc) de las gamma globulinas.

La protefina A tiene la capacidad de unirse a la porción Fc de la gamma globulina de mamíferos (IgG), lo cual conduce a la formación de complejos pseudoinmunitarios, este fenómeno proporciona una herramienta poderosa en la investigación de los mecanismos biológicos de las reacciones antígeno-anticuerpo. (30)

La propiedad de la protefina A de unirse a esta porción del anticuerpo, permite explicar las bases estructurales de ciertos fenómenos biológicos asociados con la región Fc, ya que se ha demostrado que la reacción de la protefina A da como resultado la ag

tivación del complemento. Si la proteína A se administra a cuyos, conejos, hamsters y hombres, se provocan una serie de reacciones inmunológicas que dañan los tejidos. (11),(12)

La proteína A no sólo se une a la porción Fc de la IgG sino que también puede unirse a los receptores Fc de los polimorfonucleares, alterando los procesos de opsonización y fagocitosis. (30)

Kronvall y colaboradores confirmaron que la proteína A se adhiere a la fracción cristalizable (Fc) de la IgG humana, pero esta unión sólo se realiza entre los subgrupos 1, 2 y 4 de las gamma globulinas. Además cuantificaron la proteína A de la cepa Cowan I de S. aureus, empleando globulinas de mieloma marcadas y estimaron que cada microorganismo posee alrededor de 80 000 moléculas de proteína A. (19),(21),(20)

E.3 Reacción pseudoimmune.

La presencia de proteína A en cepas de S. aureus puede detectarse por medio de una reacción de hemaglutinación, en donde se utiliza como soporte a los eritrocitos de carnero sensibilizados con un anticuerpo homólogo (amboceptor hemolítico).

La reacción entre eritrocitos de carnero y amboceptor hemolítico es una reacción antígeno-anticuerpo, ya que la porción Fab del anticuerpo queda unida al antígeno, mientras que la porción

Fc queda libre uniéndose a la proteína A, a este fenómeno biológico se le conoce como "reacción pseudoimmune", ya que no interviene la fracción Fab del anticuerpo, esto se puede detectar macroscópicamente a través de una reacción de aglutinación. (9),(25)
Fig. 1.

Las cepas Cowan I de S. aureus son ricas en proteína A y muestran un patrón de aglutinación positiva frente a los eritrocitos sensibilizados, mientras que S. epidermidis no los aglutina porque no posee proteína A en su pared celular. (25)

Forsgren y Sjoquist basaron sus estudios en la reacción pseudoimmune ya que a través de ésta encontraron que la proteína A se puede utilizar como reactivo inmunológico. (27). A partir de entonces a esta proteína se le han dado una serie de aplicaciones entre las cuales están:

- En radioinmunoensayo (RIA) se emplea como fase sólida para la cuantificación de α -fetoproteína en suero humano y también en la detección de algunos antígenos virales. (27)

- En inmunoensayos enzimáticos se emplea para la determinación de albúmina en orina. (14)

- En técnicas de aglutinación y coaglutinación se emplea como soporte de anticuerpos contra algunas bacterias. (neumococos, micobacterias, enterobacterias, neiserias, estreptococos, Haemophylus influenzae, Vibrio cholerae, etc.) (27)

E.4 Probable relación entre patogenicidad y producción de protefina A.

La producción de coagulasa es el criterio más aceptado para la identificación de estafilococos patógenos, la detección de esta enzima se considera como sinónimo de virulencia en S. aureus. Por tal motivo, se pretende establecer también una relación entre producción de protefina A y patogenicidad.

En 1958, Jensen describió un antígeno presente en S. aureus que precipitaba a la γ - globulina humana, a este antígeno se le designó con el nombre de protefina A estafilocócica. Desde entonces se han realizado investigaciones que permitan establecer que los estafilococos coagulasa positiva, son productores de protefina A. (25)

Forsgren diseñó una técnica en tubo empleando eritrocitos de carnero sensibilizados y encontró que el 98.9 % de 700 cepas de estafilococos coagulasa positiva, desoxirribonucleasa positiva, produjeron protefina A. Kronvall reportó que el 90 % de 156 cepas de estafilococos coagulasa positiva precipitaron con IgG de mieloma mientras que ninguna de las 46 cepas coagulasa negativa aisladas precipitaron con esta inmunoglobulina. Winbald y Ericson emplearon una técnica similar a la de Forsgren y encontraron que el 88.3 % de 700 cepas de estafilococos coagulasa positiva fueron protefina A positiva. (10), (25)

La prueba de hemaglutinación en tubo es de fácil preparación, rápida, sensible, específica, puede aplicarse en la identificación clínica de S. aureus y, lo que es más importante, muestra una fuerte correlación entre producción de proteína A y patogenicidad de esta bacteria. (25)

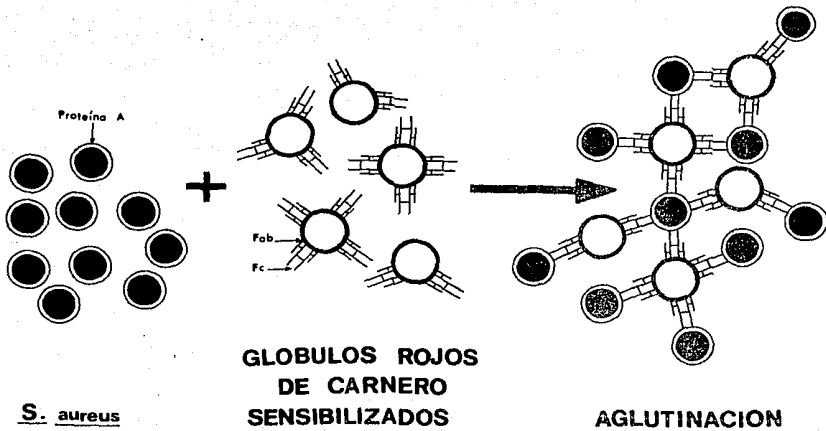


FIG. 1

II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

A. Material

A.1 Material biológico.

- Globulos rojos de carnero.
- Suero de conejo anti-glóbulos rojos de carnero (amboceptor hemolítico)
- Cepa de S. aureus Cowan I ATCC 12598
- Cepa de S. epidermidis ATCC 12228
- Cepas de Staphylococcus coagulasa positiva de origen clínico.
- Cepas de Staphylococcus coagulasa negativa de origen clínico.

A.2 Material de vidrio

- Tubos de ensaye de 13 * 100 con tapón de rosca.
- Tubos de ensaye de 13 * 100.
- Tubos de ensaye de 12 * 75.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Pipetas graduadas de 5 ml.
- Pipetas graduadas de 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Vaso de precipitado de 100 ml.
- Vaso de precipitado de 150 ml.

- Vaso de precipitado de 250 ml.
- Agitador de vidrio.
- Probeta graduada de 100 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 125 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 500 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 1000 ml.
- Frascos viales de 100 ml.
- Frascos viales de 50 ml.
- Frascos viales de 10 ml.

A.3 Material normalmente empleado en el laboratorio.

- Asas bacteriológicas.
- Mechero Bunsen.
- Portaobjetos.
- Gradillas metálicas para 40 tubos.
- Gasa.
- Algodón.
- Parafilm.
- Tela de alambre con asbesto.
- Tripié.
- Cajas Petri de plástico.
- Placas de microtitulación.
- Bulbo de látex.

A.4 Equipo.

- Incubadora de 37^o C.
- Refrigerador de 4^o C.
- Microscopio óptico.
- Baño de agua a 37^o C.
- Centrifuga.
- Autoclava.
- Balanza analítica.
- Balanza granataria.
- Filtro Swinex Millipore con membrana 0.45

A.5 Medios de cultivo.

- Tripticaseína soya agar.
- Tripticaseína soya caldo.
- Agar sal manitol.
- Caldo manitol rojo de fenol.
- Agar 110 (S 110)
- Caldo cerebro corazón.(BHI)

A.6 Reactivos y soluciones

- Amortiguador de fosfatos pH 7.2
- Amortiguador de Veronal pH 7.3
- Timerosal.
- Solución salina isotónica 0.85 %
- Colorantes de Gram.

- Aceite de inmersión.
- Solución de Alsever.
- Solución de fenol al 5 % .
- Cloruro de sodio.

B. Metodología

B.1 Pruebas realizadas a cada una de las cepas de Staphylococcus aisladas clínicamente.

Las 300 cepas de Staphylococcus aisladas en el Hospital Regional "Ignacio Zaragoza" del ISSSTE se sometieron a las siguientes pruebas:

B.1.1 Desarrollo en caldo manitol rojo de fenol adicionando cloruro de sodio al medio. (Ver ANEXO)

Cuando las cepas venían contaminadas, se procedió a sembrarlas en caldo manitol rojo de fenol más cloruro de sodio, (de manera que la concentración final fuera de 75 g de NaCl por litro). Los resultados fueron favorables porque sólo crecieron los estafilococos y los contaminantes se vieron inhibidos.

B.1.2 Desarrollo en tripticaseína soya agar.

Los estafilococos requieren un cierto número de aminoácidos y vitaminas, y a pesar de sus complejos requerimientos nutricionales, éstos desarrollan bien en muchos medios de rutina como el

agar tripticaseína soya.

2.1.3 Desarrollo en manitol sal agar.

Todas las cepas de estafilococos se sembraron en agar sal manitol para observar la morfología colonial, la producción de pigmento y la degradación de este carbohidrato.

2.1.4 Degradación del manitol presente en el caldo y en el agar.

A todas las cepas de estafilococos se les sometió a la prueba de degradación de manitol tanto en caldo como en agar, para observar si en ambos casos coincidían las pruebas, ya que existen cepas de estafilococos que sólo en uno de los casos lo degradan.

2.1.5 Desoxirribonucleasa termorresistente.

Para efectuar esta prueba, se utilizó un cultivo puro de cada una de las cepas de estafilococos en medio líquido, enseguida se expusieron a la temperatura de un baño de agua hirviendo durante 15 minutos, se inocularon por picadura en el agar DNasa de prueba y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La presencia de una zona clara alrededor de la colonia indicó una prueba positiva de DNasa, la zona se logró distinguir mejor con la adición de HCl 1N. (Ver ANEXO).

B.1.6 Presencia de pigmento.

A todas las cepas utilizadas en este estudio se les detarminó si producían pigmento dorado en manitol sal agar. La pre--presencia de éste se pudo distinguir claramente tras 48 horas de incubación, 24 horas a 37^o C y otras 24 horas a temperatura ambiente.

B.2 Técnica de sensibilización de eritrocitos de carnero.

- Mantener a los eritrocitos de carnero antes de su uso a 4^o C en una solución de Alsever. (6)

- Lavar los eritrocitos de 3 a 5 veces con solución salina isotónica 0.85 %.

- Hacer una suspensión de los eritrocitos al 5 % con amoxtiguador de fosfatos pH 7.2 o con amortiguador de Veronal pH 7.3 (6).

- Diluir el amboceptor hemolítico con solución salina isgtónica 0.85 % de acuerdo con los resultados obtenidos en la unidad aglutinante. (Ver ANEXO)

- Mezclar 4 ml de eritrocitos de carnero al 5 % y 10 ml del amboceptor diluido de acuerdo con la unidad aglutinante.

- Agitar suavemente y esperar 20 minutos.

- Centrifugar y eliminar el sobrenadante.

- Lavar 3 veces el paquete con solución salina isotónica 0.85 %.

- Resuspender con 10 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.2 o con amortiguador de Veronal pH 7.3 para que la suspensión tenga finalmente una concentración del 2 %.

La temperatura de refrigeración conserva alrededor de tres días a los eritrocitos de carnero sensibilizados ya que después de este tiempo se observa una ligera hemólisis, la cual puede eliminarse mediante centrifugación y de esta manera se pueden seguir utilizando los eritrocitos en las pruebas.

Para la conservación de los hematíes resulta efectivo el uso de soluciones de glicerol- citrato-fosfato con almacenamiento a temperatura de congelación (-4° C); los glóbulos rojos sensibilizados y almacenados así se conservan alrededor de diez días.

(4)

El tratamiento con formaldehído y glutaraldehído, para la conservación de los eritrocitos de carnero altera las propiedades antigénicas de la membrana del glóbulo rojo ya que cuando se pone frente a su anticuerpo, éste no se une y por lo tanto no se puede apreciar claramente una reacción de aglutinación; sin embargo, -- cuando se trata de pegar un antígeno a un eritrocito formalinizado esta técnica resulta ser eficaz a diferencia de cuando se trata de pegar su anticuerpo en que la técnica no tiene éxito.

(3), (7), (31)

B.3 Prueba de la presencia de proteína A por medio de la reacción de hemaglutinación en 300 casos clínicos.

La prueba de hemaglutinación para la detección de proteína A puede realizarse en tubos o en microplacas de titulación.

Para realizar esta prueba, las cepas de estafilococos se sembraron en tripticaseína soya caldo y se incubaron durante 8 horas a 37° C de manera que el medio de cultivo estuviera turbio (se detectaron algunas cepas que requirieron un tiempo de incubación mayor y por lo tanto se dejaron incubando hasta 24 horas).

Una vez que las cepas habían desarrollado, se tomaron 50 ul de los microorganismos de cultivo y se depositaron en el pozo de la microplaca, enseguida se colocaron 50 ul de los glóbulos rojos de carnero sensibilizados al 2 %.

Los resultados de las pruebas se leyeron a las 2 horas, en este tiempo se empezó a contar después de la adición de los eritrocitos sensibilizados. (El intervalo en el cual se pueden leer los resultados es de 2 a 5 horas, según Maxim y colaboradores). (25)

Al mismo tiempo se tomaron otros 50 ul de los microorganismos de cultivo y se depositaron en el pozo de otra microplaca y en lugar de añadir glóbulos rojos sensibilizados, se añadieron glóbulos rojos no sensibilizados al 2 %, esto sirvió como control para observar si los sensibilizados aglutinaban a la proteína A.

Se empleó a la cepa de S. aureus Cowan I ATCC 12598 como control positivo para la proteína A y a la cepa S. epidermidis ATCC 12228 como control negativo para esta proteína, ambos -- microorganismos se sembraron en tripticaseína soya caldo y se incubaron a 37° C durante 8 horas.

CUADRO I

DESARROLLO DE LOS ESTAFILOCOCOS EN DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO.

<u>Staphylococcus</u>	DESARROLLO EN CALDO MANITOL ROJO DE FENOL + NaCl	DESARROLLO EN TRIPTICASEINA SOYA AGAR	DESARROLLO EN MANITOL SAL AGAR
COAGULASA POSITIVA ⁽¹⁾	224 → 100%	224 → 100%	224 → 100%
COAGULASA NEGATIVA ⁽²⁾	76 → 100%	76 → 100%	76 → 100%

(1) 224 fue el número de cepas de S. aureus que se trabajaron y que fueron referidas al 100 %.

(2) 76 fue el número de cepas de S. epidermidis que se trabajaron y que fueron referidas al 100 %.

CUADRO 2

PRUEBAS REALIZADAS A LOS 300 CASOS DE ESTAFILOCOCOS.

<u>Staphylococcus</u>	DEGRADACION DEL MANITOL EN CALDO	DEGRADACION DEL MANITOL EN AGAR	DNasa TERMORESISTENTE	PIGMENTO DORADO AL DESARROLLAR EN MANITOL SAL AGAR
COAGULASA POSITIVA ⁽¹⁾	222 → 99.1 %	221 → 98.6 %	224 → 100 %	175 → 78.1 %
COAGULASA NEGATIVA ⁽²⁾	2 → 2.6 %	2 → 2.6 %	0 → 0.0 %	0 → 0.0 %

(1) 224 fue el número de cepas de S.aureus que se trabajaron y que fueron referidas al 100 %.

(2) 76 fue el número de cepas de S.epidermidis que se trabajaron y que fueron referidas al 100 %.

CUADRO 3

DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE -
PROTEINA A EN 300 CASOS CLINICOS
POR MEDIO DE HEMAGLUTINACION.

	NUMERO DE AISLAMIENTOS	NUMERO DE CEPAS PROTEINA A POSITIVA	PORCENTAJE DE CEPAS PROTEINA A POSITIVA
COAGULASA POSITIVA	224	222	99.1%
COAGULASA NEGATIVA	76	0	0.0%

REACCION DE HEMAGLUTINACION EN PLACA DE MICROTITULACION.

CONTROLES DE Staphylococcus.

S. aureus COWAN I ATCC 12598
(Control positivo de proteína A)



S. epidermidis ATCC 12228
(Control negativo de proteína A)



CASOS CLINICOS DE Staphylococcus

Proteína A positiva
(Agglutinación positiva)



Proteína A negativa
(No hay agglutinación)



IV. ANALISIS DE LOS RESULTADOS.

En este estudio se probaron 300 cepas de Staphylococcus aisladas de diferentes tipos de muestras. (224 coagulasa positiva y 76 coagulasa negativa).

Como se muestra en el cuadro 1, todos los estafilococos de sarrollaron perfectamente en tripticaseína soya agar y en agar sal manitol, lo cual indica que estos microorganismos obtienen de estos medios todos sus requerimientos. El empleo del caldo manitol rojo de fenol adicionado de cloruro de sodio hasta ajustar una concentración de 7.5 % aporta muy buenos resultados ya que se puede utilizar para el aislamiento de los estafilococos al inhibir a los contaminantes y, a su vez, permite observar la degradación del manitol.

Por otro lado, se detectaron dos cepas de S. aureus que no degradaron el manitol del caldo pero sí el del agar, igualmente se presentaron tres que no degradaron el manitol del agar pero sí el del caldo, esto podría deberse a que la concentración de -- sustrato o algún otro factor que no se determinó, probablemente inhibió la síntesis de la enzima manitolasa en ambos casos.

La manitolasa, aunque son casos no frecuentes definitivamente, también se encuentra presente en contadas cepas de estafilococos coagulasa negativa ya que se reportaron dos cepas de S. epidermidis que degradaron el manitol del caldo y del agar.

Esto implica que es muy baja la probabilidad de que una cepa de S. epidermidis se diagnostique como S. aureus, en el caso de que se empleara solamente esta prueba para diferenciarlos.

El 100 % de las cepas de S. aureus produjeron DNAsa termorresistente, mientras que ninguna de las cepas de S. epidermidis produjo esta enzima. Es una prueba fácil de realizarse, pero tiene la desventaja de que proporciona el resultado 20 horas después de inocularse el microorganismo en el medio de cultivo que contiene el sustrato.

La producción de pigmento no se utiliza como prueba confirmativa de la patogenicidad del microorganismo, ya que se sabe que esta característica no es constante, lo cual se corroboró al encontrarse que sólo el 78.1 % de las cepas coagulasa positiva produce pigmento dorado al desarrollar en manitol sal agar. (En todos los casos que presentan coagulasa negativa, las colonias muestran un color blanco al desarrollar en el medio anterior).

Con respecto, a la prueba de hemaglutinación para demostrar la presencia de proteína A en cepas de estafilococos patógenos, se encontró que de 224 cepas de estafilococos coagulasa positiva, 222 poseían proteína A lo que equivale al 99.1 % y de 76 cepas coagulasa negativa a ninguna se le detectó proteína A. (Cuadro 3)

Como se mencionó anteriormente sólo a dos cepas de S. aureus

no se les detectó proteína A, esto se puede atribuir a que existen cepas de S. aureus que no son capaces de incorporar dicha proteína en su pared, liberándola toda hacia el medio de cultivo.

La importancia de la proteína A radica en que la mayoría de las cepas de S. aureus poseedoras de esta proteína se aíslan de casos clínicos.

Por otro lado, cuando se sensibilizaron los eritrocitos frescos de carnero para la prueba de hemaglutinación, se observó que éstos permanecen sin alterarse alrededor de 3 días, ya que después de este tiempo hay hemólisis; debido a este problema dichos eritrocitos se trataron con formaldehído y glutaraldehído buscando que se conservaran más tiempo, pero el tratamiento con estos reactivos alteró las propiedades antigénicas de la membrana del glóbulo rojo, porque al observar al microscopio los eritrocitos formalinizados y sensibilizados, se apreció una aglutinación inespecífica en comparación con los eritrocitos únicamente formalinizados, ya que aunque en éstos últimos existe una autoaglutinación, ésta se puede eliminar agregándoles albúmina sérica bovina.

Los controles que se utilizaron en esta prueba fueron los siguientes:

- Capa Cowan I de S. aureus ATCC 12598 que se empleó como control positivo para la proteína A.

- Cepa de S. epidermidis ATCC 12228 que se utilizó como control negativo para la proteína A.

Otro control que se realizó al mismo tiempo que se montaron las pruebas, fue el de añadir glóbulos rojos no sensibilizados a cada una de las cepas con el fin de observar si los eritrocitos no se aglutinaban inespecíficamente en presencia de los microorganismos, ya que podrían obtenerse falsos positivos. En estos controles se observó que no había formación de la malla de aglutinación porque no existía gamma-globulina que se uniera a la proteína A y sólo se formó un botón de eritrocitos con sobrenadante claro, lo que indica que no se presentan falsos positivos.

El tiempo de lectura para las pruebas según Maxim, es en un intervalo de 2 a 5 horas; sin embargo, se pudo constatar que con tiempos mayores, aunque había desecación, la lectura permanecía sin ningún cambio, pudiéndose leer perfectamente las pruebas.

Son muchas las ventajas que presenta la prueba de hemaglutinación para la detección de proteína A:

- Es de fácil preparación.
- Es rápida tanto en tubo como en microplaca.
- Es sensible.
- Es específica.
- Es confiable.

- Si no se cuenta con micropipeta se pueden emplear capilares con bulbos de látex.

- Puede aplicarse en la identificación clínica de S. aureus.

- Puede emplearse como prueba complementaria o bien llegar a ser sustituto de la coagulasa.

- Su lectura e interpretación no presenta confusión ni dificultad alguna.

- En comparación con el tiempo requerido en el análisis rutinario (54 a 72 horas), esta prueba emplea un tiempo menor desde el primocultivo (32 horas).

- Muestra una fuerte correlación (99.1 %) entre producción de proteína A y patogenicidad de S. aureus.

Sin embargo, esta prueba presenta algunas desventajas como son:

- Los eritrocitos de carnero sensibilizados (reactivo biológico) tienen una vida corta, puesto que duran alrededor de tres días en refrigeración y diez días almacenados a temperatura de congelación en soluciones de glicerol-citrato-fosfato.

- El tratamiento de los glóbulos rojos de carnero con formaldehído, no tiene éxito porque aunque prolongue la viabilidad del eritrocito no se obtiene el reactivo deseado.

- El costo es relativamente elevado debido a que se emplea un boceptor hemolítico y eritrocitos de carnero.

- Algunos estafilococos coagulasa positiva no incorporan la proteína A en su pared celular, por tal motivo no se pueden detectar con la hemaglutinación.

En la prueba de hemaglutinación el porcentaje que se obtuvo respecto a las cepas coagulasa positiva es muy significativo ya que muestra concordancia en el hecho de que son productoras de proteína A, mientras que el porcentaje obtenido para las coagulasa negativa indica que ninguna produce e incorpora proteína A en su pared celular.

V. CONCLUSIONES.

- Los objetivos propuestos en este estudio se cumplieron porque a través de ellos se llegó a correlacionar producción de proteína A y patogenicidad de S. aureus.
- Se puede considerar como un criterio cierto, que un estafilococo que produce proteína A es patógeno, esto se corrobora porque la mayoría de las cepas de estafilococos coagulasa positiva, proteína A positiva, se aislaron de pacientes que mostraban un cuadro clínico muy severo en la garganta, así como de algunos portadores sanos; las cepas coagulasa negativa, proteína A negativa, procedían de pacientes que no presentaban cuadro clínico alguno.
- La técnica de hemaglutinación es una reacción inmunológica que proporciona una gran ayuda en la identificación de estafilococos patógenos y que tiene amplias perspectivas de aplicarse en el laboratorio como prueba de rutina.
- Entre una de las ventajas que se señala está la disminución del tiempo de diagnóstico; en comparación con la prueba de la coagulasa realizada rutinariamente, la hemaglutinación requiere de un total de 32 horas para tener el resultado (este tiempo incluye el primocultivo).
- Una desventaja que se menciona, es que el reactivo biológico

permanece viable alrededor de 3 a 4 días, por lo que se recomienda prepararlos continuamente.

- En cuanto a la prueba de degradación de manitol en caldo y en agar, se puede considerar que ambas son confiables, ya que muestran una mínima diferencia en el porcentaje, corroborando de esta manera que la producción de manitolasa es una prueba muy útil en la diferenciación de las especies de estafilococos.

- La DNasa termorresistente es una prueba que resultó muy confiable porque el 100 % de las cepas coagulasa positiva ejercieron actividad hidrolítica sobre el DNA, lo cual no sucedió con ninguna de las coagulasa negativa. La desventaja de esta prueba es que el resultado se obtiene en 20 horas y este tiempo no incluye el primocultivo.

ANEXO.

1. Caldo manitol rojo de fenol adicionado de cloruro de sodio.

Fórmula aproximada en gramos por litro de agua destilada
(Bioxon)

Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de fenol	0.018
Manitol	5.0
pH final	7.4 ± 0.2

Añadir al medio 7.0 g de cloruro de sodio por cada 100 ml de agua destilada, para obtener una concentración de 7.5 % de cloruro de sodio. Esterilizar a 116° C a 118° C (no más de 12 libras de presión) durante 15 minutos.

2. Agar DNAsa de prueba.

Acido desoxirribonucleico	2g
Digesto pancreático de caseína USP	15g
Digesto papaico de harina de soya USP	5g
Cloruro de sodio	5g
Agar	15g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 110° C durante 15 minutos.

3. Determinación de la unidad aglutinante.

- Preparar diferentes diluciones del amboceptor (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, etc.)

- Colocar 0.2 ml de cada dilución en diferentes tubos de ensayo de 12*75.

- Adicionar 0.2 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero al 2 % en cada tubo.

- Observar si hay aglutinación macroscópica (la dilución en donde no se observe aglutinación macroscópica, esa será la unidad aglutinante del amboceptor)

VI. BIBLIOGRAFIA.

1. Abramson C., Bergdoll M.S., Wheat L. "Immunoserology of Staphylococcal disease". CUMITECH 22. A.S.M. 22,1-12, (1987)
2. B.B.L. MANUAL DE PRODUCTOS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO. 5a. Edición. Editorial Asociados, S.A. México. (1968)
3. Bing D. H., Weyand J.G.M., Stavitsky A.B. "Hemagglutination with aldehyde-fixed-erythrocytes for assay of antigens and antibodies". Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 124, 1166-1170, (1967).
4. Boletín Técnico. "Congelación de glóbulos rojos". Dade reagents Inc. Boletín No. 52. Miami Florida, U.S.A.
5. Burrows W., Moulder J. M. TEXT BOOK OF MICROBIOLOGY. 20 th Edition W. B. Saunders Company. Philadelphia, U.S.A. (1973)
6. Conrath T. B. HANDBOOK OF MICROTITER PROCEDURES.

49

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Dynatech Corporation.
Cambridge, Mass. (1972)

7. Czimas L. "Preparation of formalinized erythrocytes". Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 103, 157-160, (1960).
8. DIFCO. MANUAL OF DEHYDRATED CULTURE MEDIA AND REAGENTS FOR MICROBIOLOGICAL AND CLINICAL LABORATORY PROCEDURES. 9 th Edition. (1970)
9. Forsgren A., Sjoquist J. "Protein A from S. aureus. I. Pseudoimmune reaction with human γ -globuline. J. Immunol. 97, 822-827, (1966)
10. Grov. A., Myklestad B., Deding P. "Immunochemical studies on antigen preparations from Staphylococcus aureus". Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 61, 588- 596, (1964)
11. Gustafson G. T. "Hemorrhagic reaction in the hamster produced by interaction of protein A from Staphylococcus aureus human gamma globulin and endotoxin". Acta Pathol. Microbiol. Scand. 74, 127-138, (1968).
12. Gustafson G. T., Sjoquist J., Stalenheim G. "Protein A from Staphylococcus aureus". II.- Arthus - like reaction produced in rabbits by interaction of protein A. J. Immunol. 100, 530-534, (1968).

13. Hamilton H. K., Rose M. B.
DIAGNOSTICO CLINICO.
1a. Edición
Ed. Interamericana.
(1985)
14. Harper J.R., Orengo A. "The use of protein A-bearing Staphylococcus aureus as a solid phase in an enzyme immuno assay and its application to the determination of urinary albumin". Proceeding. 22, 297, (1981)
15. Joklik W. K., Willet H., Amos D.B.
ZINSSER. MICROBIOLOGIA
18a. Edición.
Ed. Médica Panamericana.
(1984)
16. Kloos W. E. "Natural populations of the genus Staphylococcus
Annual Reviews Inc. 34, 559-592, (1980)
17. Koneman E. W., Allen S. D., Dowell V. R., Sommers H. M.
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO.
Texto y Atlas de color.
Ed. Médica Panamericana.
(1985)

- 18.** Korzybiski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kurylowicz W.
ANTIBIOTICS. ORIGIN, NATURE AND PROPERTIES.
American Society for Microbiology.
Vol. III
(1978)
- 19.** Kronvall G. "Definition of Staphylococcal protein A reactivity for human immunoglobulin G fragments". *Immunochem.* 7, 124, (1970).
- 20.** Kronvall G. "Quantitation of Staphylococcal protein A: Determination of equilibrium constant and number of protein A residues on bacteria". *J. Immunol.* 104, 273, (1970)
- 21.** Kronvall G., Williams R. C. Jr. "Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups". *J. Immunol.* 103, 828, (1969)
- 22.** Lachica R. V. F. "Simplified thermonuclease test for rapid identification of Staphylococcus aureus, recovered on agar media. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 633-634, (1976)
- 23.** Lennette E., Balows A., Hausler W., Truant J.
MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA.
Ed. Médica Panamericana.
(1982)

24. Mac Fadin J. F.

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS
DE IMPORTANCIA CLINICA.

Ed. Médica Panamericana.

(1980)

25. Maxim P. E., Mathews H. L., Mengoli H. F. "Single-tube mixed
agglutination test for the detection of Staphylococcal
protein A" J. Clin. Microbiol. 4, 418-422, (1976)

26. Movitz J. "A study on the biosynthesis of protein A in
S. aureus. Eur. J. Biochem. 48, 131-136, (1974).

27. Pansorbin. Staphylococcus aureus. Cells: Immunological
applications of fixed protein A-bearing Calbiochem Brand
Biochemicals. Behring Diagnostics. Division of American
Hoechst Corporation. (1983)

28. Sjoquist J., Meloun B., Hjeltn H. "Protein A isolated from
S. aureus after digestion with lysostaphin" Eur. J.
Biochem. 29, 572-578, (1972)

29. Sjoquist J., Movitz J., Hjeltn H., Johansson I. "Localization
of protein A in the bacteria". Eur. J. Biochem. 30, 190-
194, (1972)

30. Stites D. P., Stobo J. D., Fudenberg H. H., Vivian W. J.

INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA.

5a Edición.

Ed. El Manual Moderno.

(1985)

31. Weir D. M.

HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY.

3 th Edition.

Blackwell Scientific Publications.

Vol. I Chapter 20

(1978).