

Nº 64  
2E1.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PRUEBA RAPIDA DE IDENTIFICACION DE  
STAPHYLOCOCCUS COAGULASA  
POSITIVA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
CESAR GUTIERREZ RAMOS

MEXICO, D. F.

1992

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

Pág.

|   |    |
|---|----|
| INTRODUCCION.....   | 1  |
| OBJETIVOS.....  | 3  |
| I.- GENERALIDADES.....  | 4  |
| A) Importancia clínica del género <u>Staphylococcus</u> .....     | 4  |
| B) Características morfológicas y fisiológicas.....               | 5  |
| C) Estructura antigénica.....                                     | 7  |
| D) Proteína A.....  | 9  |
| - Antecedentes -.....   | 9  |
| - Características -.....  | 11 |
| - Afinidad de la Proteína A por la Fracción cristalizable (Fc)... | 12 |
| - Relación entre patogenicidad y producción de Proteína A....     | 13 |
| E) Enzimas extracelulares.....                                    | 15 |
| F) Toxinas estafilocócicas.....                                   | 20 |
| G) Manifestaciones clínicas.....                                  | 24 |
| H) Inmunidad.....   | 29 |
| I) Tratamiento y Prevención.....                                  | 30 |
| II.- PARTE EXPERIMENTAL.....                                      | 32 |
| A) Material.....  | 32 |
| A.1) Material biológico.....                                      | 32 |
| A.2) Medios de cultivo.....                                       | 32 |
| A.3) Material complementario.....                                 | 33 |

|   |    |
|---|----|
| A.4) Reactivos y soluciones.....  | 34 |
| B) Metodología.....   | 35 |
| B.1) Obtención de la gamma globulina.....   | 35 |
| B.2) Obtención del reactivo requerido para la elaboración<br>de las pruebas.....  | 37 |
| B.3) Características de las cepas de <u>Staphylococcus</u><br>aisladas de casos clínicos.....   | 38 |
| B.4) Desarrollo de la prueba para determinar la presencia de<br>Proteína A en las cepas de <u>Staphylococcus</u> coagulasa<br>positiva..... | 39 |
| III.- RESULTADOS Y DISCUSION.....   | 41 |
| IV.- CONCLUSIONES.....  | 49 |
| ANEXOS.....   | 51 |
| V.- BIBLIOGRAFIA.....   | 54 |

## INTRODUCCION.

Gran parte de las investigaciones bacteriológicas, están dirigidas al estudio y diagnóstico del género **Staphylococcus**, ya que estos microorganismos se encuentran relacionados con enfermedades tales como: folliculitis, impétigo, síndrome de piel escaldada, piodartritis, osteomielitis, intoxicación alimentaria, etc.

El análisis rutinario de laboratorio, no proporciona una identificación rápida de **Staphylococcus**, ya que dicho análisis se basa en la determinación de características morfológicas y biológicas, para lo cual se necesitan entre 42 y 54 horas para poder dar un resultado confiable.

La capacidad para coagular el plasma, es una prueba empleada y generalmente aceptada como criterio para la identificación de la patogenicidad de los estafilococos asociados con casos clínicos; aunque debe hacerse notar y tomarse en cuenta que actualmente hay cepas de **Staphylococcus** coagulasa negativa las cuales actúan de manera oportunista en humanos con algunos factores predisponentes, causando diversos cuadros infecciosos, algunos de gravedad.

El inconveniente de la prueba de la coagulasa, es que su tiempo mínimo de realización es de 4 a 6 horas. Es por esto que se buscan otro tipo de pruebas rápidas, confiables, económicas y, que en un momento determinado, puedan sustituir a las actuales.

La prueba que se propone en este trabajo, tiene un tiempo aproximado de 5 minutos de espera; en ésta se relacionan la cantidad de Proteína A presente en la cepa de **Staphylococcus**, la Fracción Fc (Fracción cristalizante) de la IgG (Inmunoglobulina clase G) de la gamma globulina de conejo y partículas de carbón, activadas mediante un proceso especial; dando como resultado una aglutinación macroscópica.

Debido a la afinidad que existe entre la Proteína A y la fracción cristalizante de la IgG, se produce un acoplamiento, quedando atrapadas las partículas de carbón en dicha reacción, conociéndose a este proceso, como fenómeno pseudoimmune (Figura 1).

La mayoría de las cepas de **Staphylococcus** poseedoras de Proteína A se aíslan de padecimientos clínicos, de aquí su importancia para la elaboración de este proyecto.

## **OBJETIVOS.**

- a) **Obtener un reactivo biológico, constituido por gamma globulina de conejo y partículas de carbón activadas, para poder detectar Proteína A en cepas de *Staphylococcus coagulasa positiva*.**
  
- b) **Evaluar la especificidad de la reacción, utilizando cepas de *Staphylococcus*, tanto coagulasa positiva como coagulasa negativa, previamente identificadas.**

## I. GENERALIDADES.

### A) Importancia clínica del género Staphylococcus.

Los estafilococos están entre las primeras bacterias que se reconocieron como patógenas y se descubrieron por primera vez a principios de la década de 1880. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ven a menudo como miembros de la flora bacteriana normal de la piel y del tracto respiratorio superior. Muchas de las especies que se encuentran en el hombre son comensales, algunas tienen un potencial patógeno limitado, pero la especie predominantemente patógena para el hombre es *Staphylococcus aureus* (3, 8, 13).

Estos microorganismos son responsables de más del 80% de las enfermedades supurativas que se encuentran en la práctica médica. Provocando infecciones tanto en piel, como en cualquier parte del cuerpo. En su adaptación al parasitismo, se encuentran entre las bacterias patógenas más versátiles y exitosas.

En la última década, la mayoría de las enfermedades estafilocócicas serias se observan en pacientes cuyas defensas normales están severamente alteradas. Los pacientes hospitalizados, debilitados, cateterizados, con prótesis, los que presentan serias enfermedades subyacentes, ó que se han sometido a extensas intervenciones quirúrgicas, son especialmente susceptibles a la infección por estafilococos (6, 14).

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, pioartritis, bacteremia, endocarditis, infecciones estafilocócicas metastásicas, intoxicación alimentaria y síndrome de choque tóxico.

También deben tomarse en cuenta los estafilococos coagulasa negativa, entre los que se encuentran: **Staphylococcus epidermidis**, **S. haemolyticus**, **S. lugdunensis**, **S. schleiferi**, **S. saprophyticus**, **S. hominis**, etc, los cuales ya no pueden considerarse saprófitos inocuos. Actualmente, es evidente que en las condiciones propicias pueden asumir un papel patógeno, produciendo: septicemia, endocarditis bacteriana, infecciones asociadas con prótesis de válvulas cardíacas, prótesis articulares y uso de catéteres, así como infecciones urinarias (cistitis y uretritis), osteoartritis e infecciones de la piel (7, 9, 15, 16, 21, 23, 24, 30, 33).

### **B) Características morfológicas y fisiológicas.**

**Staphylococcus** es el único género de importancia médica en la familia **Micrococcaceae**, son células esféricas, Gram-positivas, inmóviles, no esporuladas, cuyo diámetro varía de 0.5 micras a 1.5 micras, las cuales se dividen en tres planos para formar racimos irregulares; unas pocas cepas producen una cápsula mucosa que incrementa la virulencia de la bacteria.

El estafilococo es un microorganismo facultativo, pero se obtiene un crecimiento más abundante en condiciones aerobias. El crecimiento ocurre en un amplio espectro de temperatura, 6.5°C a 46°C, con un rango óptimo de 30°C a 37°C. El pH óptimo es de 7.0 a 7.5, pero el espectro varía de 4.2 a 9.3. Los estafilococos crecen bien en muchos medios de rutina de laboratorio, como agar-soya-tripticaseína (14).

En las placas de agar, las colonias individuales son lisas, opacas, circulares, convexas-bajas y varían de 1 a 4 mm de tamaño. Las colonias de gran número de cepas de *S. aureus* son de color amarillo, esta pigmentación se debe a derivados carotenoides. La producción de pigmento puede observarse mejor en las placas de agar 110, incubando a 37°C 24 horas, seguido de 24 a 48 horas a temperatura ambiente. En caldos de cultivo, son más comunes las cadenas cortas y las formas diplocóccicas.

Su energía la obtienen tanto de la vía respiratoria como de la fermentativa. Las vías intactas para glucólisis, ciclos de pentosa fosfato y ácido cítrico, funcionan en condiciones de crecimiento apropiadas. La capacidad del estafilococo para existir en condiciones de oxidorreducción alta y baja, es una ventaja para su supervivencia en su hábitat natural, superficies mucosas y en infecciones (8).

Los estafilococos utilizan un amplio espectro de azúcares y otros hidratos de carbono. En condiciones aerobias, el principal producto del catabolismo de la glucosa es el

ácido acético, con pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub>. En condiciones anaerobias, el producto principal es el ácido láctico y acetoina (8, 14).

Estas bacterias pueden producir hemólisis total, debido a que producen cuatro diferentes hemolisinas solubles. Esta hemólisis no sólo se asocia con *S. aureus*, sino que también pueden producirla cepas de *S. epidermidis*. (14, 17).

Dichos microorganismos, son resistentes a condiciones ambientales adversas, sobreviven durante semanas en pus y esputo secos, y en placas de agar selladas los cultivos continúan siendo viables durante varios meses; los estafilococos son más resistentes que muchas bacterias a los desinfectantes químicos comunes, como fenoles y cloruro de mercurio, pero son sensibles a concentraciones de ácidos grasos no saturados y colorantes básicos (8).

### **C) Estructura antigénica.**

La composición antigénica de los estafilococos es compleja y heterogénea. Las distintas especies comparten muchos antígenos, incluso con los micrococos. Los antígenos estafilocócicos incluyen una gran variedad de proteínas, ácidos teicoicos y polisacáridos, que pueden ponerse de manifiesto por reacciones de aglutinación, precipitación o hemaglutinación. Por otra parte, varios de los antígenos estafilocócicos, particularmente los de la superficie celular, son interesantes a causa de su posible interacción con las defensas del hospedero (8).

La pared celular de **S. aureus** consiste de cuatro componentes principales:

peptidoglicano, ácidos teicoicos, polisacárido A y Proteína A.

El peptidoglicano comprende del 40 al 60% del peso de la pared celular. La porción glúcida de la molécula, como en muchas otras bacterias, consiste en residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil glucosamina, que alternan regularmente y están unidos por uniones beta-1,4 glucosídicas. Sin embargo, en los estafilococos, todos los residuos de ácido N-acetilmurámico transportan cadenas de tetrapéptidos que están unidas en forma cruzada por puentes de pentaglicinas.

Esta extensa unión cruzada, proporciona a la pared estafilocócica una estructura firme que ayuda a la célula a sobrevivir en el medio ambiente hostil y en los tejidos del hospedador. Es antigénico, ya que induce la formación de anticuerpos (14).

En **S. aureus**, el ácido teicoico de la pared celular es del tipo ribitol fosfato, es un componente esencial del receptor del fago de **S. aureus**. También desempeña un papel importante en el mantenimiento de las funciones fisiológicas normales, controla la actividad de las enzimas autolíticas que funcionan en el crecimiento de la pared celular y separación de las células hijas. Además, es uno de los principales aglutinógenos de los estafilococos, intensifica la activación del complemento por ambas vías y es responsable de la adherencia de **S. aureus** a las células epiteliales (1, 8, 14, 39).

Un determinante antigénico importante en todas las cepas de *S. aureus* es el polisacárido A específico de grupo, presente en la pared celular. El determinante serológico de este polisacárido es la unidad N-acetil-glucosaminil ribitol del ácido teicoico. La especificidad reside en la configuración alfa o beta de los sustitutos glucosamino. En la pared celular, el polisacárido A está asociado con el glucopéptido en un estado insoluble y requiere enzimas líticas para su liberación. Muchos humanos adultos presentan una reacción de hipersensibilidad cutánea de tipo inmediato al polisacárido A y se encuentran niveles bajos de anticuerpos precipitantes en su suero (14).

#### **D) Proteína A.**

##### **- Antecedentes -**

Desde los primeros estudios seroepidemiológicos para tipificar a las cepas patógenas de las no patógenas de estafilococos, se detectó la presencia de una proteína típica, específica, altamente antigénica, que era el mayor componente de una de las cuatro fracciones proteicas estafilocócicas. Tiempo después Lofkvist y Sjoquist (31) purificaron esta proteína a partir de la cepa de *S. aureus* Cowan I, que se había identificado como una rica fuente de la misma. En un principio se creyó que esta fracción antigénica de la pared celular de *S. aureus*, tenía un carácter polisacárido, pero posteriormente se confirmó que era completamente proteico y se le dió el

nombre de Proteína A. Además, se logró establecer la presencia de anticuerpos dirigidos contra este antígeno en sueros humanos.

El contenido de proteína A de la pared celular, es de aproximadamente 7% (35) a su vez, el 90% de la misma se encuentra unida en forma covalente al peptidoglicano (14).

Casi todas las cepas de *S. aureus* de origen clínico contienen Proteína A. Durante el crecimiento celular, ésta se incorpora a la pared celular y se libera también hacia el medio de cultivo, comprendiendo una tercera parte de la producida por la bacteria. Existen cepas de *S. aureus* que no son capaces de incorporar Proteína A a la pared celular y otras que la liberan toda hacia el medio. Este fenómeno se observa en cepas resistentes a la metilina (11, 28).

La estreptomycin, el cloramfenicol y la puromocina, inhiben la síntesis de Proteína A.

#### - Características -

La Proteína A consiste de una sola cadena polipeptídica, con un peso molecular de 42,000. Cuatro residuos de tirosina totalmente expuestos en la superficie son los responsables de la actividad biológica.

La Proteína A consta de 5 regiones, 4 dominios altamente homólogos, y un C-terminal unido a la pared celular (Figura 2).

Cuando se purifica, contiene una preponderancia de aminoácidos básicos, y su extracción de la pared bacteriana incrementa la carga negativa de la superficie celular (34).

Provoca una variedad de efectos biológicos. Es quimiotáctica, anticomplementaria, antifagocítica y promueve reacciones de hipersensibilidad y lesión plaquetaria. Es mitógena y potencia la actividad NK. Aunque hay una buena relación entre la producción de Proteína A y la actividad de la coagulasa, no hay correlación entre la ausencia o presencia de Proteína A y alguna propiedad patógena (36).

#### **- Afinidad de la Proteína A por la Fracción cristalizable (Fc) -**

La Proteína 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 pseudoimmunes, este fenómeno proporciona una herramienta poderosa en la investigación de los mecanismos biológicos de las reacciones antígeno-anticuerpo.

La propiedad de la Proteína A de unirse a esta porción del anticuerpo, permite explicar las bases estructurales de ciertos fenómenos biológicos asociados con la

región Fc (37). Su reactividad con la inmunoglobulina va a depender de la especie de la cual proviene el suero. Entre sueros de la misma especie pueden existir diferencias de afinidad a distintas clases o subclases de inmunoglobulinas. En el humano, dentro de la clase IgG sólo tienen reactividad las subclases IgG1, IgG2 e IgG4. La subclase IgG3 no presenta reactividad, esto se atribuye a su secuencia de aminoácidos en la cadena H, es decir, la IgG3 tiene diferencias secuenciales con respecto a las otras subclases. (18, 19, 20). La IgA2 y la IgM también se enlazan a la Proteína A, en la última, su enlace se ve inhibido por la presencia de IgG por lo que su unión depende de la cantidad de ésta presente en el suero (10, 12, 27). Una pequeña cantidad de Proteína A se enlaza a la IgE pero probablemente de diferente manera que otras inmunoglobulinas, aparentemente su enlace es en la porción Fab (4).

La reacción pseudoimmune no depende de la temperatura, por lo que se trabaja a temperatura ambiente. Tampoco depende del tiempo, al parecer reaccionan inmediatamente que entran en contacto la inmunoglobulina y la Proteína A (12).

Los estudios realizados por Balows indican que primero existe una combinación de la Proteína A y la Fc de la inmunoglobulina y después se presenta una reacción secundaria para formar complejos detectados por precipitación (10, 12).

La Proteína A, al tener cuatro regiones homólogas, tiene la posibilidad de enlazar cuatro inmunoglobulinas. Sin embargo, es posible que se presente un impedimento

estérico que no permita la unión de cuatro IgG a una molécula de la proteína. Al comparar los pesos moleculares de las dos proteínas, se observa que el peso de las IgG es cerca de cuatro veces mayor que el de la Proteína A, la cual se enlaza al fragmento Fc de la IgG en la interfase de sus dominios CH2 y CH3 mediante un enlace hidrofóbico. Su enlace requiere que esté íntegra la región de ambos dominios del fragmento Fc (5).

#### **- Relación entre patogenicidad y producción de Proteína A -**

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

Forsgren diseñó una técnica en tubo empleando eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos y encontró que el 98.9% de 700 cepas de estafilococos coagulasa positiva y desoxirribonucleasa positiva, produjeron Proteína A. Kronvall reportó que el 90% de 156 cepas de estafilococos coagulasa positiva aglutinaron con IgG de mieloma, mientras que ninguna de las 46 cepas coagulasa negativa aisladas aglutinaron 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 Proteína A positiva (2, 25).

En la década de los 80, se introdujeron partículas de látex y eritrocitos de camero sensibilizados con plasma humano y fibrinógeno en la práctica de los laboratorios, como una herramienta para la detección rápida de la actividad enzimática de la coagulasa y de la Proteína A presente en cepas de **S. aureus**.

El fibrinógeno ligado a las partículas de látex, detecta la presencia de la coagulasa, posteriormente las inmunoglobulinas presentes en el plasma unidas a las partículas de látex detectan a la Proteína A presente en la pared celular de los estafilococos. La mezcla de las suspensiones antes mencionadas con una colonia aislada de **S. aureus**, da como resultado una rápida aglutinación macroscópica. Dicha técnica, tiene de 92% a 99% de sensibilidad y de 98 a 100% de especificidad para **S. aureus** (17).

Existen en el mercado, equipos de identificación de bacterias tales como **Streptococcus** del Grupo A, B, C, y D de Lancefield.

En este tipo de pruebas, se utiliza una reacción de coaglutinación, teniendo como herramienta al fenómeno pseudoinmune. Se obtienen anticuerpos dirigidos contra las diferentes bacterias en investigación, los cuales se acoplan a una cepa de **Staphylococcus aureus** rica en Proteína A, al poner este reactivo con la muestra problema si es positiva se observa una aglutinación macroscópica.

Por otra parte, existe una reacción de hemaglutinación, en la cual, los eritrocitos de camero se sensibilizan con suero de conejo anti-glóbulos rojos de camero y este reactivo, al enfrentarse a las cepas de estafilococos productoras de Proteína A, se produce el acoplamiento entre la fracción cristalizable (Fc) de la gamma globulina (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 del anticuerpo (Fab) (2).

A la fecha siguen las investigaciones, las que primordialmente se enfocan a detectar toxinas estafilocócicas mediante reacciones de aglutinación en látex, como es el caso de la toxina exfoliativa (29).

#### **E) Enzimas extracelulares.**

Los estafilococos sintetizan varios factores enzimáticamente activos que actúan sobre sustratos asociados al hospedero y a menudo producen efectos adversos. Los factores más importantes son la coagulasa, la hialuronidasa y las estafiloquinasas; se cree que generalmente se relacionan con la virulencia.

#### **- Coagulasa -**

Las coagulasas estafilocócicas exhiben un alto grado de correlación con la virulencia, ayudan en la protección contra la destrucción intraleucocitaria inhibiendo la fagocitosis

y antagonizan la actividad bactericida del suero normal, característica que aparentemente se relaciona con la virulencia.

La coagulasa estafilocócica existe en dos formas: una libre y la otra unida a la célula. Las dos son inmunológicamente diferentes y su modo de acción es ligeramente distinto. La coagulasa libre es una proteína, y se han identificado cuatro tipos antigénicos.

En la coagulación del plasma, la coagulasa reacciona con un factor del plasma similar a la protrombina para formar un complejo constituido por coagulasa y un factor que reacciona con ella; el complejo presenta una actividad enzimática semejante a la trombina y desdobla al fibrinógeno, produciendo de este modo un coágulo de fibrina.

La coagulasa unida a la célula, o factor aglutinante, no se libera de la superficie celular, de modo que cuando estas células se mezclan con el plasma, lo agrupan o aglutinan en virtud de la precipitación de fibrina en la superficie celular. Su sustrato parecen ser monómeros de fibrina solubles que no pueden ser coagulados por trombina; por consiguiente, el mecanismo no es el mismo que el de la coagulasa libre.

La coagulasa no es muy tóxica si se inyecta por vía parenteral, pero en grandes dosis origina una caída rápida en el fibrinógeno y una coagulación extravascular extensa, para producir la muerte en los animales de experimentación (8, 38).

- **Lipasas** -

Los estafilococos producen enzimas lipohidrolizantes denominadas colectivamente "lipasas". Las lipasas actúan sobre una variedad de sustratos, incluyendo plasma, grasa y aceites que se acumulan en las superficies del cuerpo. Estos materiales tienen valor para la supervivencia del microorganismo y explican la intensa colonización de estafilococos en las áreas sebáceas de mayor actividad. Aparentemente la producción de lipasas es esencial en la invasión de tejido cutáneo y subcutáneo sanos. En casos clínicos aislados, hay una estrecha correlación entre la producción in vitro de lipasas y la capacidad de producir forúnculos (14).

- **Hialuronidasa** -

Más del 90% de las cepas de *S. aureus* producen hialuronidasa. Esta enzima hidroliza al ácido hialurónico presente en la sustancia intracelular del tejido conectivo, facilitando la diseminación de la infección; esta enzima consiste de diversos componentes biológicamente activos (14).

- **Estafiloquinasa (fibrinolisisina)** -

Una de las enzimas proteolíticas de *S. aureus* es la estafiloquinasa, posee actividad fibrinolítica, es antigénica y enzimáticamente diferente de la estreptoquinasa de los estreptococos. La disolución de los coágulos por la enzima estafilocócica, está

mediada por su activación de plasminógeno plasmático en la enzima fibrinolítica plasmina. Aunque la producen muchas cepas de *S. aureus*, hay pocas evidencias de que sea un factor importante en la patogenicidad (14).

- **Desoxirribonucleasa (Nucleasa)** -

La elaboración de una nucleasa resistente al calor parece estar únicamente asociada con cepas de *S. aureus*. Se halla en la célula, en la superficie celular o cerca de ella. Es una proteína globular compacta constituida por una sola cadena polipeptídica. El calentamiento a 65°C produce rompimientos estructurales, pero los cambios son rápida y totalmente reversibles. La nucleasa es una fosfodiesterasa con propiedades endonucleolíticas y exonucleolíticas (14).

- **Beta - Galactosidasa** -

La detección de la actividad de la enzima beta-galactosidasa, ayuda a la diferenciación de ciertas especies de estafilococos. Los equipos comerciales que se utilizan para detectar la actividad de dicha enzima, emplean el 2-naftol-beta-D-galactopiranosido como sustrato. En este ensayo, se pueden identificar a *S. Intermedius* y algunas cepas de *S. saprophyticus* como beta-galactosidasa positiva; *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* y *S. hylcus* son negativos para esta prueba (16).

**- Ureasa -**

En los equipos convencionales para la determinación de la actividad de esta enzima, se detecta la liberación de amoníaco a partir de la urea, dando como resultado un incremento en el pH, dándose a notar por el vire del indicador rojo de fenol, el cual cambia de amarillo-naranja a rojo.

**S. epidermidis**, **S. intermedius** y algunas cepas de **S. saprophyticus**, son ureasa positiva; **S. aureus**, **S. lugdunensis** y **S. hylcus** tienen actividad variable; y **S. haemolyticus**, **S. schleiferi** son ureasa negativa (16).

**- Ornitín - descarboxilasa -**

Una actividad positiva de ornitín-decarboxilasa, puede identificar a **S. lugdunensis** con considerable exactitud, ya que se tiene como dato que todas las cepas de esta especie son positivas para esta prueba. Algunas cepas de **S. epidermidis** tienen una actividad muy pobre para esta prueba (16).

Dicha actividad puede determinarse por la técnica descrita por Moeller (26).

**- Fosfatasa -**

La actividad de fosfatasa puede determinarse usando la modificación de la técnica de Pennock y Huddy (32). En ésta se utiliza difosfato de fenolftaleína como sustrato.

**S. aureus, S. schleiferi, S. intermedius, S. hylcus** y algunas cepas de **S. epidermidis** son fosfatasa alcalina positiva, **S. haemolyticus, S. lugdunensis** y **S. saprophyticus** son fosfatasa alcalina negativa (16).

- **Pirrolidonil arilamidasa** -

La actividad de pirrolidonasa puede determinarse por la hidrólisis del piroglutamil-beta-naftilamida. **S. haemolyticus** y **S. lugdunensis**, son pirrolidonasa positiva. **S. aureus** y **S. epidermidis**, son pirrolidonasa negativa (16).

**F) Toxinas estafilocócicas.**

Desde hace mucho tiempo se sabía que los filtrados libres de células procedentes de cultivos de estafilococos son tóxicos si se inoculan por vía parenteral y que las toxinas extracelulares se producen en cantidades considerables. Estos filtrados son necrosantes y letales cuando se administran a animales de experimentación.

Esta toxicidad, definida por la enfermedad, se ha sometido a investigación y se han aislado y caracterizado muchos de los principios tóxicos. Entre los más importantes están: las citotoxinas, incluyendo hemolisinas y leucocidinas; las enterotoxinas; las exfoliatinas y las exotoxinas pirógenas (8).

**- Toxinas citolíticas -**

Un cierto número de bacterias producen toxinas que causan disolución in vivo de células de mamíferos. Muchas de estas toxinas son proteínas, son extracelulares e inducen la formación de anticuerpos neutralizadores (14).

**Toxina Alfa (alfa-Hemolisina).**

Presenta un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo los efectos hemolíticos, letales y dermonecróticos observados luego de la inyección de filtrados a animales de laboratorio. Además, provoca rompimiento de los lisosomas y es citotóxica para una variedad de células de tejidos cultivados. Lesiona plaquetas y macrófagos humanos. Se observa lesión del sistema circulatorio, tejido muscular y tejido de la corteza renal (14).

**Toxina Beta (Esfingomielinasa).**

La actividad más notable de esta toxina es su capacidad para producir lisis con calor y frío. La toxina es una enzima con especificidad de sustrato por esfingomielinina (14).

### **Toxina Delta.**

Tiene una gran actividad biológica y no guarda preferencias por células de una especie en particular. Puede lesionar eritrocitos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas, así como esferoplastos y protoplastos de otras bacterias. Se ha demostrado que la toxina delta inhibe la absorción de agua en el íleon, estimula la acumulación de AMP y altera la permeabilidad en íleon de cobayos. También estimula la liberación de insulina desde los islotes de Langerhans aislados (14).

### **Toxina Gamma.**

Se carece de una información detallada sobre los efectos químicos y biológicos de la toxina gamma. Es una toxina citolítica con notable actividad hemolítica para eritrocitos humanos, de conejo y de camero. Consiste de dos componentes que actúan en forma sinérgica, siendo ambos necesarios para la hemólisis y toxicidad (14).

### **Leucocidina.**

La leucocidina Panton-Valentine producida por muchos estafilococos patógenos, ataca leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, pero ningún otro tipo de célula. La toxina está compuesta por dos proteínas que son electroforéticamente separables, se designan como F (rápido) y S (lento). Actúan en forma sinérgica, no en forma aditiva

y cada componente solo es inactivo. Ambos componentes de la leucocidina son altamente antigénicos y se han podido convertir a toxoides (14).

#### **- Enterotoxinas -**

Aproximadamente un tercio de todos los estafilococos coagulasa positiva aislados clínicamente, producen exotoxinas que causan intoxicación alimentaria en el hombre.

Las enterotoxinas estafilocócicas consisten en un grupo de proteínas globulares simples de cadena única, con pesos moleculares que varían entre 28,000 y 35,000. Se han identificado 6 tipos (A, B, C1, C2, D, E). Las enterotoxinas A y D se asocian con más frecuencia con intoxicaciones por alimentos, y la B es la que más probablemente se asocia con infecciones hospitalarias. Recientemente se ha aislado una nueva enterotoxina estafilocócica, la enterotoxina F, la cual se relaciona con el síndrome de choque tóxico (14).

El sitio receptor para la enterotoxina estafilocócica son las vísceras abdominales. La diarrea inducida se ha atribuido a la inhibición de la absorción de agua desde la luz del intestino y a un aumento del flujo tras mucoso de líquido hacia la luz. La enterotoxina es un potente mitógeno para los linfocitos. Es pirógena e incrementa la letalidad de Gram negativos.

- **Toxina exfoliativa (toxina epidermolítica) -**

Esta toxina es capaz de separar capas celulares adyacentes en la epidermis, causando diversas manifestaciones cutáneas del síndrome de piel escalada. No produce muerte celular y no provoca una respuesta inflamatoria, desconociéndose su mecanismo de acción. Además, es un potente mitógeno de células T (14).

- **Exotoxinas pirógenas -**

Recientemente se han descrito exotoxinas estafilocócicas pirogénicas que se cree que desempeñan un papel relevante en síndromes similares a la escarlatina por estreptococos de grupo A y al síndrome de choque tóxico. Tres de estas toxinas (A, B, C) se han caracterizado bioquímica y biológicamente. La exotoxina pirogénica de tipo C la producen cepas de *S. aureus* de pacientes con síndrome de choque tóxico. Esta toxina tiene marcados efectos sobre células T no específicas y aumento de la hipersensibilidad adquirida (14).

**G) Manifestaciones clínicas.**

El rasgo característico de una infección estafilocócica es la formación de abscesos. Esto puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo, pero en cada área la lesión básica consiste en inflamación, infiltrado leucocitario y necrosis hística.

## **- Infecciones cutáneas -**

### **Forúnculos y Carbuncos.**

La infección estafilocócica de la piel, es la más común de todas las infecciones bacterianas en el hombre. La más superficial de éstas es la foliculitis, en la cual se observa una infección del folículo piloso. La extensión hacia el tejido subcutáneo da como resultado la formación de una lesión supurativa local, un forúnculo. Un carbunco o carbunco es similar a un forúnculo pero tiene múltiples focos y se extiende hacia las capas más profundas del tejido fibroso (14).

### **Impétigo.**

El impétigo estafilocócico es común en niños pequeños. Se caracteriza por la formación de pústulas encostradas en las capas superficiales de la piel. La remoción de las costras deja expuesta una superficie roja que rezuma líquido. La enfermedad es altamente contagiosa (14).

### **Síndrome de piel escaldada.**

El síndrome de piel escaldada abarca tres entidades clínicas diferentes pero relacionadas:

- 1 - **La dermatitis exfoliativa generalizada. Se caracteriza por un eritema doloroso generalizado y una notable descamación bullosa en grandes áreas de la piel, es la forma más severa.**
  
- 2.- **El impétigo buloso es una forma localizada del síndrome, en la cual la infección ocurre en el sitio de la lesión.**
  
- 3.- **La escarlatina estafilocócica es una forma generalizada leve del síndrome.**

**El síndrome de piel escaldada afecta primordialmente a neonatos y niños menores de 4 años (14).**

#### **- Neumonía -**

**La neumonía producida por estafilococos no es habitual, excepto en aquellos casos que se produce como infección secundaria a la influenza; no obstante, la frecuencia de mortalidad es elevada, y debe considerarse como una enfermedad grave que necesita una terapia especial.**

Se reconocen dos tipos generales de neumonías estafilocócicas. La primera es una infección primaria de los pulmones y se da predominantemente en personas muy jóvenes o en aquéllas que están predispuestas, como los que padecen influenza. La otra es a menudo posterior a una septicemia como foco secundario de la infección (8).

- Osteomielitis -

**S. aureus** es la causa de muchos casos de osteomielitis primaria. La enfermedad ocurre principalmente en niños menores de 12 años y en muchos casos se produce luego de la diseminación hematógena a partir de un foco primario, habitualmente una herida o un forúnculo. Los síntomas clínicos de osteomielitis aguda incluyen, fiebre, escalofríos, dolor sobre el hueso y espasmo muscular alrededor del área afectada. La osteomielitis estafilocócica secundaria se asocia a un traumatismo penetrante o a cirugía y es frecuente en pacientes con diabetes mellitus o con enfermedad vascular periférica (14).

- Ploartritis -

Aproximadamente el 50% de todos los casos de artritis bacteriana son causados por **S. aureus**. La ploartritis estafilocócica puede ocurrir luego de cirugía ortopédica, junto con osteomielitis o infecciones cutáneas locales. La infección destruye el

cartilago articular y puede dar como resultado una deformación articular permanente (14).

**- Septicemia y endocarditis -**

Los catéteres y otros cuerpos extraños, traumatismos y enfermedades debilitantes, predisponen a la contaminación del torrente circulatorio con estafilococos. La septicemia estafilocócica habitualmente se asocia con fiebre, escalofríos y toxicidad sistémica. Una complicación frecuente es la endocarditis, que habitualmente es aguda y maligna, con destrucción valvular en pocos días (14).

**- Infecciones estafilocócicas metastásicas -**

Uno de los rasgos característicos de la septicemia causada por los estafilococos, es la producción de abscesos metastásicos. Los sitios más frecuentes de este tipo de abscesos son la piel, tejidos subcutáneos y pulmones. Los abscesos internos de riñones, cerebro y médula espinal son comunes (14).

**- Intoxicación alimentaria -**

Es causada por la ingestión de alimentos que contienen la toxina preformada, elaborada por cepas productoras de enterotoxinas. Los síntomas, que aparecen bruscamente 2 a 6 horas después de la ingestión del alimento, consisten en dolor

abdominal severo de tipo calambre, náuseas, vómitos y diarrea. La recuperación es rápida, en 6 u 8 horas (14).

**- Enterocolitis estafilocócica -**

Se observa primordialmente en pacientes hospitalizados cuya flora intestinal normal se ha suprimido por la administración oral de antibióticos de amplio espectro que selectivamente permiten un crecimiento excesivo de cepas productoras de enterotoxinas. Las manifestaciones clínicas de este padecimiento, incluyen: calambres abdominales, diarrea abundante, fiebre, deshidratación y desequilibrio electrolítico (14).

**- Síndrome de choque tóxico (SST) -**

Cepas de *S. aureus* productoras de toxinas, se han implicado en esta enfermedad multisistémica que afecta a mujeres jóvenes. Habitualmente la enfermedad comienza durante la menstruación y se relaciona con el uso de tampones. Los aspectos clínicos incluyen fiebre, hipotensión marcada, diarrea, conjuntivitis, mialgia y una erupción escarlatiniforme seguida de una descamación fina (14).

## **H) Inmunidad.**

La inmunidad adquirida frente a la infección producida por estafilococos es generalmente escasa y parece ser esencialmente celular, siendo la fagocitosis el proceso más importante. Se ha probado la existencia de una respuesta inmunológica mediada por células, con liberación de interleucinas y activación de macrófagos, pero la capacidad bactericida de estas células no parece incrementarse (8).

Muchas de las toxinas y de las enzimas producidas por los estafilococos sirven como determinantes de la virulencia y son inmunogénicas. No obstante, los anticuerpos dirigidos contra ellas, con la posible excepción de la leucocidina, no parecen jugar un papel importante en la inmunidad efectiva (8).

El complemento es la mayor opsonina que participa en el reconocimiento del estafilococo. Muchos humanos adultos poseen anticuerpos séricos para ciertos antígenos estafilocócicos, pero los altos títulos no siempre protegen contra la enfermedad. Los niveles de anticuerpos (IgM e IgG) frente al glucopéptido y ácido teicoico, habitualmente están elevados en las infecciones estafilocócicas serias. La inmunización, como una forma de aumentar la resistencia a los estafilococos, ha tenido poco éxito y no se aconseja pues no hay protección duradera (16).

## **l) Tratamiento y Prevención.**

En el manejo de las infecciones estafilocócicas localizadas, el principio básico del tratamiento es el drenaje adecuado. Deben extraerse los cuerpos extraños del sitio de la infección. Aunque los agentes antibacterianos pueden controlar la diseminación de los microorganismos desde los abscesos, son menos efectivos contra las bacterias que se encuentran dentro de éstos y no facilitan su resolución.

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos son importantes en la selección del antibiótico apropiado y en la evaluación de su efectividad durante el curso de la infección. A menos que el paciente sea alérgico, se aconsejan análogos de la penicilina.

En infecciones cutáneas, el tratamiento oral con una penicilina semisintética, como la cloxacilina o dicloxacilina, habitualmente es eficaz. Si el paciente es alérgico a la penicilina, pueden usarse cefalosporinas, eritromicina o clindamicina por vía oral.

En enfermedades estafilocócicas sistémicas serias, se aconseja la administración parenteral de nafcilina, meticilina, oxacilina o una cefalosporina. La vancomicina, cefalosporinas y clindamicina son sustitutos parenterales adecuados en pacientes alérgicos (14).

**La infección estafilocócica nunca podrá ser controlada totalmente debido al estado de portador del hcnbre. El control de la diseminación de las infecciones tanto en el hogar como en los hospitales requiere cuidados higiénicos apropiados.**

**Debe evitarse el uso indiscriminado de antibióticos para prevenir el establecimiento y diseminación de cepas resistentes (14).**

## **II.- PARTE EXPERIMENTAL.**

### **A) Material.**

#### **A. 1) Material biológico.**

- 19.5 ml de Suero normal de conejo.
- Cepa de *S. aureus* Cowan I ATCC 12598.
- Cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228.
- 152 Cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas de casos clínicos.
- 38 Cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativa aisladas de casos clínicos.

#### **A. 2) Medios de cultivo.**

- Tripticaseína Soya agar (Bioxon Cat. 108-1)
- Tripticaseína Soya caldo (Bioxon Cat. 111-1)

#### **A. 3) Material complementario.**

- Asas bacteriológicas.
- Mechero Bunsen.
- Cajas Petri desechables estériles.
- Bulbos de látex.
- Bolsas para diálisis.

- Tarjetas de Reacción.
- Pipetas de plástico desechables.

#### **A. 5) Reactivos y soluciones.**

- Solución Salina Isotónica (0.85 %).
- Amortiguador de fosfatos (PBS) pH = 7.2
- Amortiguador de fosfatos (PBS) pH = 8.4
- Timerosal.
- Azida de sodio.
- Fenol al 5 %.
- Glicerina.
- Partículas de carbón activadas suspendidas al 10 % en Amortiguador PBS pH = 7.2

#### **B) Metodología.**

##### **B. 1) Obtención de la gamma globulina de conejo.**

Los 19,5 ml de suero, se sometieron al siguiente tratamiento:

- Se le eliminaron los anticuerpos específicos contra el género **Staphylococcus**, lo cual se logró adsorbiéndolos con una suspensión de **S. epidermidis** ATCC

12228 carente de Proteína A, pero que mantiene las mismas características antigénicas del género.

- La suspensión de la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 se obtuvo a partir de un cultivo de la bacteria de 18 a 24 horas en agar soya tripticaseína, el cual se cosechó con amortiguador PBS pH = 7.2. La suspensión se inactivó con calor a 80°C durante 15 minutos, evitando la sequedad y se ajustó a una proporción de 20%.
- Se centrifugó la suspensión de *S. epidermidis* ATCC 12228 y se eliminó el sobrenadante, quedando sólo el paquete celular. Sobre éste, se adicionó el suero de conejo y se homogenizó para volver a tener la suspensión bacteriana; se dejó 1 hora a 37°C y 2 horas a 4°C con agitación frecuente para poder adsorber todos los anticuerpos específicos contra el género *Staphylococcus*.
- Pasado este tiempo, se separó el suero de las células bacterianas por centrifugación a 6,000 rpm durante 20 minutos, quedando en el sobrenadante el suero.
- Para asegurarse de que el suero quedara libre de bacterias, se filtró a través de membrana de 0.45 micras, obteniéndose 18 ml de suero.

- Así, el suero quedó preparado para obtener su fracción gamma globulina, para esto se utilizó el método conocido como "Salting Out" en el cual se usa sulfato de amonio saturado. Este proceso se realizó 3 veces para purificar lo más posible a esta fracción. (Anexo 1).
- Se disolvió la gamma globulina obtenida en el mínimo volumen de NaCl 0.85 %. Dicho volumen fue de 7 ml.

#### **B. 2) Obtención del reactivo requerido para la elaboración de las pruebas.**

- La gamma globulina de conejo dializada, se llevó a una concentración de 2 mg/ml. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry (22), (Anexo 2), utilizándose a su vez métodos de concentración sencillos, como es el uso de sacarosa como absorbente de agua. (Anexo 3).
- La concentración obtenida fue de 2.2 mg/ml, teniendo 8 ml de gamma globulina de conejo; sin embargo como el volumen puede variar, hubo necesidad de hacer pruebas de ensayo y error para llegar a obtener los valores estandarizados y que al final estuvieran presentes las siguientes proporciones:

Glicerina, 20 % del volumen final.

Fenol al 5 %, 0.5 % del volumen final.

Azida de sodio, 0.25 mg/ml

Timerosal, 0.20 mg/ml

Partículas de carbón activado suspendidas al 10 %, en Amortiguador PBS  
pH=7.2, 10% del volumen total (Anexo 4).

Para la conservación del reactivo, resultó efectivo su almacenamiento a temperatura de 4°C, en frasco vial con tapón de hule y engargolado. De esta forma se conservó su reactividad durante 3 meses.

El tratamiento con fenol, previene la contaminación del reactivo; el timerosal y la azida de sodio tienen la función de preservadores. La glicerina protege de una pronta desnaturalización de la proteína y las partículas de carbón, ayudan a observar la aglutinación macroscópica en la prueba.

### B. 3) Características de las cepas de Staphylococcus aisladas de casos clínicos.

Se utilizaron 190 cepas de Staphylococcus proporcionadas en el Hospital Juárez "Zona Norte", ya tipificadas como coagulasa positiva o coagulasa negativa.

**B. 4) Desarrollo de la prueba para determinar la presencia de Proteína A en las cepas de Staphylococcus coagulasa positiva.**

La prueba se realizó sobre tarjetas de reacción, las cuales son de cartón blanco bañadas con una capa fina de plastificante, que sirve para aislar el líquido del cartón; de esta forma es más nítida la reacción de aglutinación macroscópica.

Para el desarrollo de la prueba, las cepas de *Staphylococcus* se sembraron en agar soya tripticaseína, incubándolas de 18-24 horas a 37°C; pasado este tiempo y ya que las cepas habían desarrollado, se tomó de cada microorganismo en cultivo una colonia aislada, misma que se resuspendió en 0.25 ml de caldo soya tripticaseína, incubándose 15 minutos a 37°C.

Una vez transcurrido este tiempo, se colocaron sobre tarjetas de reacción, una gota del cultivo líquido de cada cepa y una gota del reactivo preparado; se mezclaron perfectamente con pipetas de plástico desechables y después en un agitador rotatorio a 120 rpm durante 5 minutos, o bien, manualmente.

Antes de usarse, el reactivo se mantuvo a temperatura ambiente y se mezcló perfectamente para que las partículas de carbón se resuspendieran.

Los resultados se obtuvieron a los 5 minutos, contados desde el momento en que ambas gotas se pusieron en contacto.

Se empleó la cepa de *S. aureus* Cowan I ATCC 12598 como control positivo para la Proteína A y a la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 como control negativo para esta proteína; ambos microorganismos se sometieron al mismo procedimiento que las cepas aisladas de casos clínicos.

Es importante resaltar, que siempre que se hace una prueba se montan los controles correspondientes, así mismo, si se utilizan cultivos bacterianos de más de 48 horas, las pruebas pierden sensibilidad.

### III.- RESULTADOS Y DISCUSION.

De las 190 cepas de *Staphylococcus*, 152 eran coagulasa positiva y 38 coagulasa negativa, dichas cepas, como ya se mencionó, se aislaron de casos clínicos.

Para reportar la lectura de la aglutinación obtenida en la prueba, se utilizó el siguiente criterio:

| <u>PORCENTAJE</u>      | <u>CARACTERISTICAS</u>  | <u>AGLUTINACION</u><br><u>(RESULTADO)</u> |
|------------------------|---|---|
| 100 % de Aglutinación. | Sobrenadante claro. Presencia de grumos negros muy grandes.   | 4 +                                       |
| 75 % de Aglutinación.  | Sobrenadante ligeramente turbio. Presencia de grumos negros grandes   | 3 +                                       |
| 50 % de Aglutinación.  | Sobrenadante moderadamente turbio. Presencia de grumos negros pequeños.   | 2 +                                       |
| 25 % de Aglutinación.  | Sobrenadante turbio. Presencia de grumos negros muy pequeños. Poca acumulación de partículas de carbón en el seno de la reacción. | 1 +                                       |
| 0 % de Aglutinación    | Ausencia de aglutinación. Acumulación total de las partículas de carbón en el seno de la reacción.                                | -   |

Las siguientes tablas (1 y 2), muestran los resultados obtenidos después de la realización de la prueba correspondiente.

**TABLA 1.** Relación de Cepas de Staphylococcus coagulasa positiva (Ver Gráfica 1).

| <u>RESULTADO</u> | <u>AGLUTINACION</u> |              |
|------------------|---------------------|--------------|
| (en cruces)      | No. cepas           | % cepas      |
| 4 +              | 37                  | 24.32        |
| 3 +              | 66                  | 43.42        |
| 2 +              | 31                  | 20.39        |
| 1 +              | 18                  | 11.87        |
| <b>TOTALES</b>   | <b>152</b>          | <b>100 %</b> |

**TABLA 2.** Relación de Cepas de Staphylococcus coagulasa negativa.

| <u>RESULTADO</u> | <u>AGLUTINACION</u> |              |
|------------------|---------------------|--------------|
| (en cruces)      | No. cepas           | % cepas      |
| -                | 38                  | 100          |
| <b>TOTALES</b>   | <b>38</b>           | <b>100 %</b> |

Los controles dieron los siguientes resultados:

- Control Positivo.- Cepa de *S. aureus* Cowan I ATCC 12598 = 4 +
- Control Negativo.- Cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 = -

Las 152 cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva, dieron positiva la prueba; unas en mayor grado que otras, pero todas mostrando diversas cantidades de Proteína A presente en sus paredes celulares.

Se puede ver en los resultados, que la gran mayoría de las cepas (103 o sea el 67.74%) producen una gran cantidad de Proteína A, lo que ocasiona entre el 75 y 100% de aglutinación (3+ y 4+). Las demás cepas (49, es decir el 32.26%) producen una cantidad menor de Proteína pero todavía detectable por la reacción, con un 50% (2+) o 25% (1+) de aglutinación.

Por lo que respecta a las cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa, ninguna dio positiva la prueba. Por lo que se puede considerar que hay relación entre la producción de coagulasa y la presencia de Proteína A en el estafilococo.

En esta reacción, se utiliza gamma globulina de conejo libre de anticuerpos específicos contra *S. aureus*, evitando así los resultados falsos positivos. Los resultados falsos negativos se eliminan, ya que aunque hay cepas de estafilococos

que liberan la Proteína A hacia el medio, ésta se detecta con la reacción, pues su sensibilidad permite reconocer antígeno soluble.

Por todo lo anteriormente mencionado, podemos decir que se lleva a cabo una reacción pseudoimmune entre la Proteína A presente en los estafilococos patógenos y la porción Fc de la IgG inespecífica de la gamma globulina de conejo.

Cabe señalar, que aún adsorbidos los anticuerpos del suero de conejo específicos en contra del género *Staphylococcus*, pueden haber anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de especie, en este caso contra *S. aureus*; lo cual podría afectar al resultado obtenido. Sin embargo dicha posibilidad se puede descartar, ya que la cantidad de Proteína A presente en los estafilococos es mayor en comparación con los antígenos específicos.

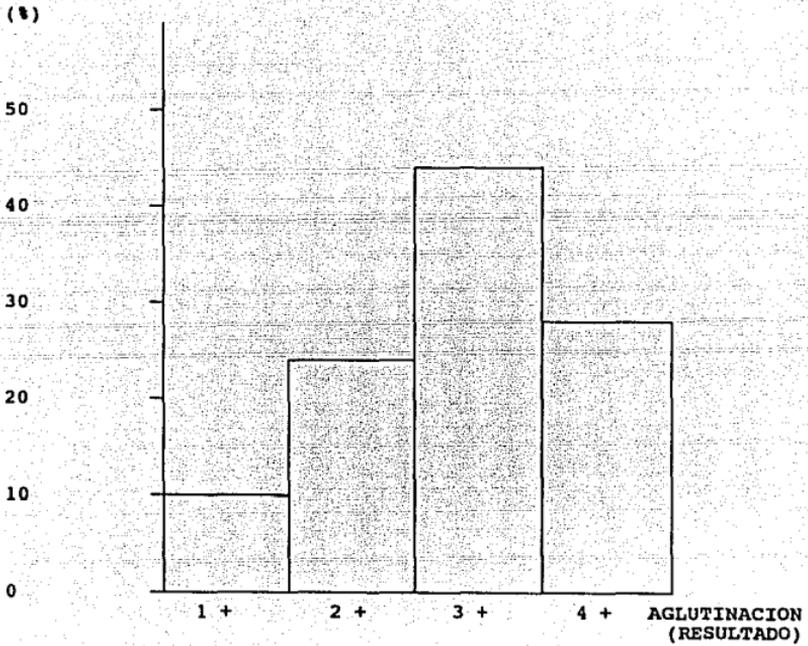
Para eliminar esta posibilidad, tendría que utilizarse una cepa de *S. aureus* libre de Proteína A para adsorber los anticuerpos específicos.

Podrían usarse:

- a) Una cepa de *S. aureus* resistente a la metilina, las cuales liberan toda la Proteína A hacia el medio y no incorporan nada a su pared celular.

- b) Una cepa de **S. aureus** tratada mediante métodos físico-químicos específicos, por medio de los cuales se le eliminará toda la Proteína A.
- c) La cepa de **S. aureus** Wood 46, la cual produce muy poca Proteína A.

GRAFICA 1



Relación entre el % de cepas de Staphylococcus coagulasa positiva y su % de aglutinación correspondiente

El siguiente esquema, se plantea para dar una explicación al fenómeno que sucede en esta reacción.

Se deduce de las siguientes pruebas realizadas,

a) Se centrifugó el reactivo, separando las partículas de carbón de la gamma globulina de conejo. Las partículas de carbón, se llevaron al volumen original con solución salina isotónica y se realizaron pruebas con cepas de **Staphylococcus** positivas a la reacción, dando resultados negativos; así mismo, a una muestra de este preparado se le añadió anti-gamma globulina de conejo para verificar que no aglutinara, teniendo también un resultado negativo.

A la gamma globulina de conejo, se le determinó su concentración de proteínas dando 2.2 mg/ml.

b) Se realizó la prueba añadiendo por separado las partículas de carbón, la gamma globulina de conejo y la cepa de estafilococo coagulasa positivas, resultando positiva. También se verificó que el orden de la incorporación no afecta el resultado.

FIGURA 1

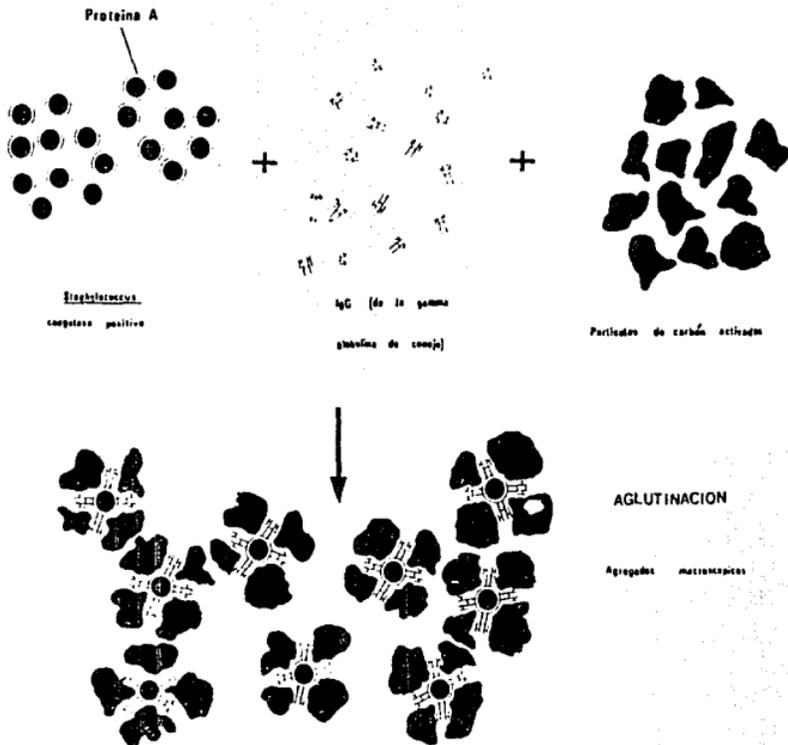
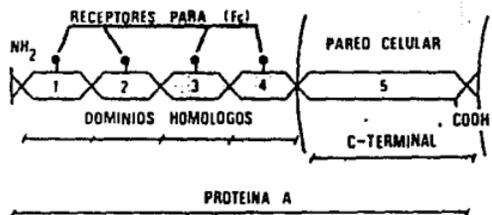


FIGURA 2



#### IV.- CONCLUSIONES.

- A) Se logró desarrollar un reactivo biológico conteniendo gamma globulina de conejo purificada y partículas de carbón activadas. Dicho reactivo ayudó a la identificación de la Proteína A contenida en **Staphylococcus** coagulasa positiva.
  
- B) Se demostró la especificidad de la reacción al utilizar cepas de **Staphylococcus** coagulasa positiva y coagulasa negativa, teniendo buenos resultados.
  
- C) Es una prueba en la cual se lleva a cabo un fenómeno conocido como reacción pseudoimmune.
  
- D) Es una prueba muy rápida, ya que se requiere entre 36 y 38 horas, lo cual representa una notable disminución del tiempo que normalmente se emplea en la identificación.

- E) Es una prueba económica, que se puede utilizar como una técnica diagnóstica en los laboratorios de rutina.
- F) Es una técnica que no requiere de preparaciones o tratamientos especiales de las muestras.
- G) Se deben tomar en cuenta dos consideraciones: El reactivo permanece estable hasta tres meses conservado en un rango de temperatura de entre 2 y 8°C, después de este tiempo los resultados ya no son confiables. Segundo, si se utilizan cultivos bacterianos de más de 48 horas las pruebas pierden sensibilidad.

## A N E X O S

### **ANEXO 1. Precipitación de la gamma globulina por medio de Salting Out.**

En este método se precipita la gamma globulina mediante la adición de solución saturada de sulfato de amonio a temperatura ambiente, a tener una concentración en la mezcla de un tercio de saturación. Esta precipitación se repite 3 veces con lo que se logra obtener a la gamma globulina con alto grado de pureza. El sulfato de amonio que queda atrapado en el precipitado de gamma globulina se elimina mediante diálisis contra una solución amortiguada de PBS. El producto resultante de este método de purificación es una mezcla de todos los anticuerpos contenidos en el suero, pero libres de las demás proteínas que constituyen dicho suero.

La gamma globulina se mantiene en diálisis hasta que el dializado de negativa la reacción de sulfatos. (Al adicionar unas gotas de una solución al 10 % de cloruro o de hidróxido de bario a una muestra del dializado, si se forma precipitado blanco de sulfato de bario la diálisis no ha terminado aún). Esta diálisis se lleva a cabo a pH de 8.4 para evitar la desnaturalización de las proteínas, que ocurre a un pH neutro.

## Anexo 2. Determinación de proteínas por el método de Lowry

Reactivos:

- a) Sol. de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en  $\text{NaOH}$  0.1 N
- b) Sol. de tartrato de Na y K al 1 %
- c) Sol. de  $\text{CuSO}_4$  al 0.5 %
- Estándar de albúmina 1 mg/ml
- Reactivo de Folin 1:3

Preparación de la mezcla de reacción:

Se toman 0.5 ml. de la sol. a) y 0.5 ml de la b) y se llevan a 50 ml con la c).

Curva estándar:

La curva estándar se prepara de la siguiente manera:

| microlitros<br>estándar<br>(1 mg/ml) | microlitros<br>(SSI) | ml. de mezcla<br>de reacción | ml. de Folin<br>1:3 |                |
|--------------------------------------|----------------------|------------------------------|---------------------|----------------|
| -                                    | 100                  | 4                            | 0.5                 |                |
| 10                                   | 90                   | 4                            | 0.5                 |                |
| 20                                   | 80                   | 4                            | 0.5                 | Esperar 20     |
| 40                                   | 60                   | 4                            | 0.5                 | minutos y      |
| 60                                   | 40                   | 4                            | 0.5                 | leer a 590 nm. |
| 80                                   | 20                   | 4                            | 0.5                 |                |
| 100                                  | -                    | 4                            | 0.5                 |                |

Los problemas se preparan adicionando 100 microlitros de muestra a 4 ml de la mezcla de reacción.

### **Anexo 3. Método de concentración de la gamma globulina utilizando sacarosa.**

La gamma globulina dentro de una bolsa de diálisis, se introduce en un recipiente que contenga sacarosa, se deja el tiempo necesario para que el azúcar absorba el agua. Posteriormente, la bolsa de diálisis se lava con agua destilada para quitar los residuos de sacarosa. De esta forma la gamma globulina queda concentrada y lista para trabajarla.

### **Anexo 4. Características de las partículas de carbón utilizadas en la prueba.**

Las partículas de carbón utilizadas en este proyecto, tienen las siguientes características:

- a) Un tamaño entre 10 y 15 micras.
- b) Reciben un tratamiento térmico a 100 °C durante 10 minutos.
- c) Se suspenden en amortiguador PBS pH = 7.2, a una concentración del 10 %.

## V.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Aly, R., Martin, M. A. "Role of teichoic acid in the binding of Staphylococcus aureus to nasal epithelial cells". J. Infect. Dis. 141: 463-465 (1980).
  
- 2.- Castellanos Chávez Norma Angélica  
CORRELACION ENTRE PRODUCCION DE PROTEINA A Y PATOGENICIDAD  
EN STAPHYLOCOCCUS AUREUS.  
Tesis Fac. de Química.  
UNAM México (1989).
  
- 3.- Cohen, J. O.  
THE STAPHYLOCOCCI  
Wiley Interscience  
New York (1972)
  
- 4.- Cooper, M., Hofschneider, P. H. "Current Topics in Microbiology and Immunology" J. Infect. Dis. 104: 159-176 (1983).
  
- 5.- Deisenhofer, J. "Crystallographic refinement and atomic models of human Fc fragment and its complex with fragment B of Protein A from

- Staphylococcus aureus at 2.9 and 2.8 A resolution". *Biochemistry*, 20: 2361-2370 (1981).
- 6.- Fakety, F. R. "Staphylococcal Infections". *Textbook of Medicine*, 2: 1466-1473 (1982).
- 7.- Fleurette, J., Y. Brun. "Infections caused by coagulase-negative staphylococci other than S. epidermidis and S. saprophyticus". In G. Pulverer. 195 - 208 (1987).
- 8.- Freeman, B. A.  
MICROBIOLOGIA DE BURROWS  
22a Edición.  
Ed. Médica Panamericana  
Argentina (1986).
- 9.- Freney, J., Y. Brun. "Staphylococcus lugdunensis sp. nov. and Staphylococcus schleiferi sp. nov., two species from human clinical specimens". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 169 - 172 (1988).
- 10.- Grangeot-Keros, L., Lebrun, L. Briantais, M. J. and Pillot, J. "A critical study of the use of staphylococci containing Protein A for separation of IgG and IgM antibodies". *Immunol. Methods*, 51: 183-195 (1982).

- 11.- Gutiérrez Ramos Abel  
IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO A POR REACCION  
DE COAGLUTINACION.  
Tesis Fac. de Química UNAM.  
México (1981).
- 12.- Harboe, M. and Folling, I. "Recognition of two distinct of human IgM and IgA  
based on different binding to Staphylococci". Scand. J. Immun. 4: 471-480  
(1974).
- 13.- Jeljaszewics, J. "Staphylococci and staphylococcal diseases".  
Zentbel. Bakt. I. 5: 1-1137 (1976).
- 14.- Joklik, W. K., Willet, H., Amos, D. B.  
MICROBIOLOGIA ZINSSER  
18a Edición  
Ed. Médica Panamericana  
Argentina (1984).
- 15.- Karchmer, A. W., G. L. Archer, and W. E. Dismukes.  
"Staphylococcus epidermidis causing prosthetic valve endocarditis:  
microbiologic and clinical observations as guides to therapy". Ann. Intern.  
Med. 98: 447-455 (1983).

- 16.- Kloos, W. E. and Lambe, D. W. "Staphylococcus" in  
Balows, A., Hausler, W., Herrman, K.  
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY  
5th Edition  
American Society for Microbiology  
Washington (1991).
- 17.- Koneman, W. E., Allen, D. S., Dowell, V. R., Janda, W. M., Sommers, H. M.  
and Winn, W. C.  
COLOR ATLAS AND TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY.  
3rd Edition  
J. B. Lippincott Company  
Philadelphia (1988).
- 18.- Kronval, G., Formmel, D. "Definition of Staphylococcal Protein A reactivity for  
human immunoglobulin G fragments". *Immunochemistry*. 7: 124-127 (1970).
- 19.- Kronval, G., Menssner, R. P. and Williams, R.C. Jr. "Immunochemical studies  
on the interaction between staphylococcal Protein A and gamma G globulin".  
*J. Immun.* 105: 1353-1359 (1970).

- 20.- Krowal, G., Quie, P. G., and Williams, R.C. Jr. "Cuantification of staphylococcal protein A: Determination of equilibrium constant and number of protein A residues on bacteria". J. Immun. 104: 273-278 (1980).
- 21.- Leighton, P. M. and J. A. Little. "Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from urinary tract infections". Am. J. Clin. Pathol. 85: 92-95 (1986).
- 22.- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. y col. "Protein measurement with Folin Phenol reagent". J. Bio. Chem. 3: 73 (1951).
- 23.- Lowy, F. D., and S. M., Hammer. "Staphylococcus epidermidis infections". Ann. Intern. Med. 99: 834-839 (1983).
- 24.- Martin, M. A., M. A., Pfaller, and R. P., Wenzel. "Coagulase-negative staphylococcal bacteremia". Ann. Inter. Med. 110: 9-16 (1989).
- 25.- Maxim, P. E., Mathews, H. L., Mengoli, H. F. "Single-tube-mixed aglutination test for the detection of staphylococcal Protein A". J. Clin. Microbiol. 4:418-422 (1976).

- 26.- Moeller, V. "Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system". *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 36: 158-172 (1955).
- 27.- Montero Canibe Ma. Teresa  
MODELO EXPERIMENTAL DE UNA TECNICA PARA EL DIAGNOSTICO PRECOZ DE LA RUBEOLA UTILIZANDO STAPHYLOCOCCUS AUREUS.  
Tesis Fac. de Química UNAM  
México (1985).
- 28.- Movitz, J. "A study on the biosynthesis of Protein A in Staphylococcus aureus".  
*Eur. J. Biochem.* 48: 131-136 (1974).
- 29.- Murono, K., Fujita, K. "Detection of staphylococcal Exfoliative toxin by Slide Latex Agglutination". *J. Clin. Microbiol.* 26: 271-274 (1988).
- 30.- Paley, D., C.F. Moseley. "Primary osteomyelitis caused by coagulase-negative staphylococci" *J. Pediatr. Orthop.* 6: 622-626 (1986).
- 31.- Pansorbin. Staphylococcus aureus, Cells: Immunological applications of fixed protein A-Bearing Calbiochem Brand Biochemicals. Behring Diagnostics. Division of American Hoechst Corporation. (1983).

- 32.- Pennock, C. A., and R. B. Huddy. "Phosphatase reaction of coagulase-negative staphylococci and micrococci". J. Pathol. Bacteriol. 93: 685-688 (1967).
- 33.- Ponce de León, S., S. H. Guenther, and R. P. Wenzel. "Microbiologic studies of coagulase-negative staphylococci isolated from patients with nosocomial bacteremias". J. Hosp. Infec. 7: 121-129 (1986).
- 34.- Sjoquist, J., Meloun, B. "Protein A isolated from Staphylococcus aureus after digestion with lysostaphin." Eur. J. Biochem. 29: 572-578 (1972).
- 35.- Sjoquist, J., Movitz, J. "Localization of Protein A in the bacteria". Eur. J. Biochem. 30: 190-194 (1972).
- 36.- Spika, J. S., H. A. Verbrugh, and J. Verhoef. "Protein A effect on alternative pathway complement activation and opsonization of Staphylococcus aureus". Infect. Immun. 43: 455-460 (1981).
- 37.- Stites, D. P., Stobo, J. D., Fudenberg, H. H., Vivian, W. J.

INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA

5a Edición

Ed. El Manual Moderno

México, (1985).

- 38.- Switalaski, L. M. "Isolation and purification of staphylococcal clumping factor".  
Zentbl. Bakt. I., Suppl. 5: 413-425 (1976).
- 39.- Wilkinson, B. J. "Activation of complement by cell surface components of  
Staphylococcus aureus". *Infec. Immun.* 20: 388-392 (1978).