

Nº 43
251



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FRECUENCIA DE Staphylococcus aureus Y DE
ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVA EN LA
FARINGE DE PERSONAS SANAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ELVA CECILIA ESPINOSA CONTRERAS



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.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	2
I. GENERALIDADES ACERCA DE LOS ESTAFILOCOCOS	
i. Taxonomía	3
ii. Características microscópicas	3
iii. Resistencia a agentes físicos, químicos y biológicos	5
iv. Propiedades culturales	6
v. Pruebas de identificación	8
vi. Importancia clínica	38
vii. Aspectos sobre el tratamiento de las estafilococcias	46
II. PARTE EXPERIMENTAL	
i. Equipo, material, reactivos y medios de cultivo	51
ii. Metodología	52
iii. Resultados	53
iv. Discusión	61
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFIA	66

INTRODUCCION

Los estafilococos continúan manifestándose entre las bacterias de mayor importancia para el humano, desde el punto de vista de la frecuencia y diversidad de las enfermedades que ocasionan, si bien su detección en ciertos tipos de muestra se interpreta con distintos criterios entre los miembros del equipo de salud.

Tal es el caso de las secreciones purulentas provenientes de los tejidos cutáneo y subcutáneo, así como de los exudados faríngeos, dado que su presencia en la piel y la garganta de numerosos individuos es considerada como normal.

No obstante, la especie más virulenta del género: *Staphylococcus aureus*, ocasiona procesos lesivos -en las zonas anatómicas mencionadas- a una buena parte de los individuos, en tanto que en otros sólo se incorpora a la flora habitual sin manifestar su incuestionable potencial patógeno. Por tal motivo, su aislamiento a partir de dichas muestras representa todo un enigma para los químicos clínicos y médicos encargados de decidir entre acreditarle o no a este microorganismo la etiología de la afección analizada.

El presente trabajo intenta establecer la verdadera frecuencia con la que *S. aureus* y los estafilococos coagulasa negativa (ECN) integran la flora faríngea de las personas sanas, para conocer la magnitud del problema señalado en el párrafo anterior. Es indudable que conociendo las cifras asociadas a la regularidad con la que los microorganismos colonizan a los individuos no afectados, el profesional del laboratorio podrá contar con mayores recursos para interpretar sus resultados.

OBJETIVO

Establecer la frecuencia con la que *S. aureus* y los estafilococos coagulasa negativa (ECN) colonizan la faringe de las personas sanas en la Ciudad de México, considerando parámetros epidemiológicos tales como el sexo, tabaquismo, zona de residencia y susceptibilidad a la adquisición de cuadros patológicos en las vías respiratorias altas.

I. GENERALIDADES ACERCA DE LOS ESTAFILOCOCOS

i. Taxonomía

Los estafilococos pertenecen a la familia *Micrococcaceae*, constituida también por los géneros *Micrococcus* y *Planococcus* (5, 36, 64).

Dentro del género *Staphylococcus* se localizan actualmente 27 especies: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. capitis*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. kloosii*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. arlettae*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. carnosus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. caseolyticus* y *S. lentus*. Sin embargo, es importante destacar que, dada su frecuencia en el humano, las 6 primeras son las que poseen mayor significado en el campo de la salud pública (5, 23, 36, 37, 64).

ii. Características microscópicas

Los estafilococos son bacterias esféricas cuyo diámetro

fluctúa entre 0.8 y 1.0 micras (alrededor de un décimo de diámetro del eritrocito humano): no poseen flagelos ni esporas y sólo algunas cepas son capsuladas; además, se tiñen fácilmente reteniendo el colorante de Gram de manera tenaz, aunque esta propiedad varía en los cultivos viejos y los que se obtienen bajo condiciones adversas (como en presencia de antibióticos, etc.) (17, 23, 37, 39, 43).

Su agrupación característica en acúmulos parecidos a racimos de uvas es la más evidente, aunque sólo se observa en las preparaciones provenientes de muestras biológicas y de cultivos sólidos; su pared celular consta de una capa externa rica en proteínas y de una capa interna de mucopéptido y, aunque su estructura antigénica ya se ha definido, los diversos antígenos tienen poco valor en su identificación, exceptuando a la proteína A de los estafilococos coagulasa positiva (ECP), la cual se utiliza para diferenciar a este grupo mediante la reacción pseudoimmune (17, 23, 36, 37, 39, 54).

Por otra parte, cabe mencionar que dicha proteína A se fija a la porción Fc de las moléculas de IgG (salvo de la IgG₂), dejando libres a las fracciones Fab de estas inmunoglobulinas para que puedan combinarse con su antígeno específico. Lo anterior constituye el fundamento bajo el cual se preparan reactivos de coagulación, empleados para identificar

confiablemente a diversos microorganismos, entre los cuales figuran los estreptococos de los grupos A, B, C, D y G, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *Haemophilus influenzae* (37, 39, 61).

iii. Resistencia a agentes físicos, químicos y biológicos

Los estafilococos figuran entre las bacterias no esporuladas más resistentes, ya que pueden sobrevivir a muchas condiciones ambientales desfavorables durante su camino de un hospedador a otro; son muy resistentes a la luz, temperaturas externas extremas y desecación, por lo cual estos microorganismos se pueden transmitir aún por medio del polvo. Además, sobreviven días a semanas en el pus desecado y en el esputo, y pueden resistir calor húmedo hasta de 60°C durante 30 minutos (5, 17, 23, 39, 66).

Adicionalmente, los estafilococos resisten la acción de los fenoles y la de muchos otros desinfectantes empleados en los laboratorios (cloruro de magnesio, cloruro de benzalconio, etc.). La incorporación de 7 a 8 % de cloruro sódico a los medios de cultivo permite su desarrollo, a la vez que inhibe el de casi todas las demás bacterias. De hecho, el diseño de medios selectivos para su aislamiento se basa en esta propiedad y/o en su capacidad para soportar la oxidación por teluritos (6, 17, 23, 39, 64).

Finalmente, su resistencia a la penicilina suele depender de su capacidad para producir β lactamasas, propiedad transmitida por conjugación o transducción y que implica la presencia de plásmidos de resistencia, de los cuales cada vez se genera mayor información (2, 8, 11, 17, 23, 39, 64).

iv. Propiedades culturales

a) Medios de cultivo

Aunque estos microorganismos se reproducen fácilmente en el laboratorio previa siembra en caldo o agar nutritivos, los medios de cultivo que carecen de tiamina y ácido nicotínico no favorecen su desarrollo; sin embargo, en los medios corrientes suelen existir cantidades pequeñas de estas vitaminas. Su crecimiento en sangre es más abundante y hace posible poner de manifiesto hemolisinas estafilocócicas de acción enérgica, tales como la α , β , γ o δ , presentes con cierta regularidad en los ECP (4, 17, 23, 31, 36, 42).

Independientemente de que en el laboratorio se emplea gelosa sangre para lograr el aislamiento de estos microorganismos, se suelen incorporar al análisis otros de naturaleza selectiva, tales como el S110 y el manitol sal agar -que deben su selectividad a su alto contenido en NaCl-, así como Baird Parker y Vogel Jhonson -cuyo agente inhibidor es el K_2TeO_8 al 1 %- (17, 23, 36, 39, 42, 64).

b) Condiciones de incubación

Estos microorganismos desarrollan dentro de límites muy amplios de temperatura (10 a 40°C), aunque su crecimiento óptimo se obtiene entre los 30 y 37°C. Es importante precisar que, su pigmentación característica -la cual sólo es producida por ciertas especies-, se produce mejor entre los 19 y 25°C (17, 23, 36, 39, 64).

A la presión atmosférica normal de aerobiosis se logra un desarrollo más abundante, pero muchas cepas se reproducen aceptablemente en ausencia de oxígeno; adicionalmente, se ha observado que el exceso de bióxido carbonico aumenta la producción de enterotoxinas por *S. aureus*, sobre todo cuando el medio posee almidón (5, 17, 23, 36, 39).

c) Morfología macroscópica

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* produce un pigmento dorado amarillento, a diferencia de varios ECN que presentan pigmentaciones que varían del blanco al amarillo limón. En general, las colonias estafilocócicas guardan semejanza con manchas redondas de pintura y, de acuerdo a la composición de los medios, su diámetro fluctúa entre los 3 y 5 mm y su coloración varía desde el blanco -en gelosa sangre- hasta el negro -en las formulaciones que contienen teluritos,

tales como el Baird Parker y el Vogel Jhonson (17, 23, 36, 64).

v. Pruebas de identificación

v.1. Detección del género

Una vez efectuado el aislamiento de colonias sospechosas de estafilococos, es necesario contar con la seguridad de que se trata de este género, lo cual generalmente se logra mediante extensiones teñidas al Gram. Sin embargo, en caso de persistir algunas dudas, puede recurrirse a la realización de pruebas bioquímicas que diferencian a estos microorganismos de otros géneros similares en cuanto a características microscópicas. En este sentido, destacan la de la bencidina y las oxidasas, para descartar la presencia de *Micrococcus*, y la de la catalasa para evitar confundirlos con estreptococos (5, 20, 33, 36, 64).

A continuación se describen los principales aspectos asociados a las pruebas mencionadas.

Prueba de la bencidina (5, 20, 36, 64)

La prueba de la bencidina se emplea para detectar la presencia de citocromo c en las bacterias analizadas y, en

particular, para diferenciar entre *Micrococcus* y *Staphylococcus* dado que, en relación a dichos géneros, sólo el primero y una especie del segundo -*S. sciuri*, la cual difícilmente se encuentra en las muestras de humanos- poseen dicha proteína. Esta última se localiza en la cadena respiratoria, unida covalentemente a su grupo hemo -a diferencia de lo que sucede con otros citocromos-; por tal razón, persiste en la bacteria después de que ésta es sometida a un tratamiento con TCA-HClO₄ y acetona-HCl, de manera que posteriormente reacciona con la bencidina adicionada produciendo una coloración azul.

Para realizar la prueba, se suspenden dos colonias de la bacteria en 1 ml de una mezcla 1+1 (vol/vol) de ácido tricloroacético 1 N y ácido perclórico 1 N. Dicha suspensión se homogeniza lo mejor posible, se incuba aproximadamente tres minutos y se centrifuga. Posteriormente se descarta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 1 ml de agua destilada antes de vertirse en 40 ml de una mezcla helada 49+1 (vol/vol) de acetona 24 N y HCl, agitando vigorosamente. El proceso de extracción dura entre 10 y 15 minutos. y el paso siguiente consiste en colocar al material bacteriano en un disco de papel filtro (de 9 cm de diámetro), sobre el cual después se adiciona la solución de bencidina base que, en caso positivo, asumirá la coloración azul antes mencionada.

Esta modificación a la prueba constituye el método más simple y rápido, resultando ideal para los laboratorios clínicos de rutina, ya que no requiere de material o equipo costosos. De hecho, se puede realizar en cualquier medio libre de azida y cianida, que favorezca el crecimiento de los microorganismos probados.

Prueba de la oxidasa (20, 36, 46, 48, 64)

La enzima citocromo oxidasa es una hemoproteína que permite a los microorganismos utilizar aceptores finales de electrones en la cadena respiratoria. El objetivo de esta prueba consiste en determinar si dicha enzima es capaz de habilitar a las aminas aromáticas primarias, tales como el diclorhidrato de p-fenilendiamina, para que actúen como aceptores de electrones. Es decir, en presencia de oxígeno, la citocromo oxidasa de ciertas bacterias oxida al reactivo utilizado como sustrato, transformándolo en indofenol o azul de indofenol, que son compuestos coloridos.

Los reactivos (sustratos) más empleados son: el diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1 % en agua (reactivo de Kovac), el diclorhidrato de dimetil-p-fenilendiamina al 1-1.5 % en agua (reactivo de Gordon y McLeod) y el reactivo de Nedi, que corresponde a una mezcla -a partes iguales- de alfa naftol al 1 % en alcohol etílico y aminodimetilanilina

al 1 %.

La técnica se realiza directamente en la placa; se agregan 2 ó 3 gotas de cualquiera de los reactivos señalados sobre la colonia sospechosa y la respectiva coloración aparecerá durante los siguientes 10 a 15 segundos.

También se puede realizar de la siguiente manera: en un trozo de papel filtro Whatman se agregan unas gotas de reactivo de Kovac y, posteriormente, con un asa se extiende la colonia sobre él. La coloración esperada se observará 10 a 30 segundos después.

Las colonias que manifiestan resultado positivo desarrollan un color rosado, después marrón y finalmente negro. Empero, cuando se emplea la mezcla dimetil p-fenilendiamina / alfa-naftol, la reacción se considera positiva cuando aparece una coloración azul. Cabe subrayar que las colonias de microorganismos oxidasa negativa no evidenciarán cambio de color.

La prueba de la oxidasa, además de ser rápida y sencilla, es muy útil en la detección de varios géneros bacterianos, e inclusive, para diferenciar entre *Staphylococcus* (a excepción de *S. sciuri*) -que la da negativa- y los micrococcos -que la dan positiva-. No obstante, en este último caso, es muy

conveniente utilizar como sustrato al tetrametil p-fenilén diamina, al 6 %, en dimetilsulfóxido, puesto que de esta manera se incrementan notablemente la exactitud y precisión de los resultados.

Prueba de la catalasa (23, 39, 43, 46, 48)

La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Químicamente es una hemoproteína bastante similar a la hemoglobina, con la diferencia de que los cuatro átomos de hierro contenidos en su molécula, se encuentran en su estado más oxidado (Fe^{+++}), mientras que en la hemoglobina lo están en estado reducido (Fe^{++}). Exceptuando a los estreptococos y a *Gardnerella vaginalis*, las bacterias aerobias y facultativas poseen esta enzima, no así la mayoría de las anaerobias que, con el objeto de llevar a cabo la degradación del mismo sustrato, producen la peroxidasa.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos terminales del metabolismo oxidativo de los carbohidratos y se convierte, en concentraciones elevadas, en un agente extremadamente tóxico para las células bacterianas, debido a su poder altamente oxidante; de tal manera que, de faltar la actividad enzimática de la catalasa, se acumularía este peróxido y provocaría la destrucción celular asociada,

principalmente, a la oxidación de sus sistemas enzimáticos.

Adicionalmente, es preciso recordar que el poder bactericida de macrófagos y neutrófilos radica, en buena medida, en la acción oxidante del H_2O_2 contenido en sus lisosomas. Por ello, las bacterias catalasa positiva suelen resistir e interferir la fagocitosis, dependiendo ello de las cantidades que sintetizan de esta enzima.

La reacción catalizada por la catalasa es :



Dentro del laboratorio clínico, la prueba de la catalasa se utiliza generalmente para diferenciar al género *Streptococcus* (-) del *Staphylococcus* (+) y, con menor frecuencia, para hacerlo entre las especies de bacilos Gram positivos y entre las micobacterias. Para llevarla a cabo es necesario disponer, por un lado, de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 % -almacenada en frasco ámbar y en refrigeración- y, por otro, de un cultivo puro de 18-24 h del microorganismo por probar, contenido en una caja de Petri o bien en tubos de ensayo exentos de sangre, toda vez que los eritrocitos poseen esta actividad enzimática.

Los procedimientos que se practican resultan muy sencillos y

rápidos; en el caso de la prueba en portaobjetos, se colocan en éste, primeramente, una asada de la colonia del microorganismo, en caso de encontrarse en medio sólido, o bien, del cultivo líquido y, posteriormente, se vierten sobre ésta una o dos gotas de la solución de H_2O_2 al 30 %. La reacción es tan rápida que bastan unos segundos para que en la solución que está en contacto con las células, se empiecen a notar burbujas ocasionadas por el O_2 que se desprende; sin embargo, si la reacción inicia después de 60 segundos y se está llevando a cabo en una forma muy débil, la prueba se considerará como negativa, ya que se han encontrado otras enzimas diferentes de la catalasa, que realizan la hidrólisis lentamente.

Por lo que toca a la prueba en placa, el procedimiento que se sigue básicamente es el mismo, exceptuando que diferentes autores recomiendan diluir 1:10 la solución de H_2O_2 al 30 %, de tal manera que su concentración final sea de 3 %. Las gotas de la solución se vierten directamente en el medio de cultivo sobre las colonias del microorganismo problema; la interpretación para ambas técnicas es similar a la descrita para la prueba en portaobjetos. Es importante contar con microorganismos que funjan como controles positivo y negativo para efectuar la previa comprobación de que el reactivo funciona adecuadamente. En este caso, debe mencionarse que se utilizan cepas de *Staphylococcus* y *Streptococcus* para los que

invariablemente la prueba deberá ser positiva y negativa, respectivamente.

v.2. Diferenciación de especie

Una vez que el aislamiento se ha identificado plenamente como *Staphylococcus*, puede procederse a determinar la especie correspondiente, iniciando con la prueba de la coagulasa -para establecer si se trata de *S. aureus* o de ECN- porque, de resultar negativa esta última, es necesario realizar otras reacciones (5, 64).

La tabla 1 muestra los patrones de identificación de las principales especies patógenas para el humano y los párrafos siguientes describen los fundamentos y técnicas de las pruebas mencionadas.

Tabla 1. Principales pruebas involucradas en la identificación de las especies estafilocócicas de mayor significado clínico.

P R U E B A	1	2	3	4	5	6
COAGULASA	+	-	-	-	-	-
FACTOR AGLUTINANTE	+	-	-	-	(+)	+
TERMONUCLEASA	+	-	-	-	-	+
FOSFATASA ALCALINA	+	+	-	-	-	+
ORNITINA DC	-	(d)	-	-	+	-
UREASA	d	+	-	+	d	-
RESISTENCIA A						
NOVOBIOCINA	-	-	-	+	-	-
MANOSA	+	(+)	-	-	+	+
SACAROSA	+	+	+	+	+	-

CLAVE: 1 = *S. aureus*; 2 = *S. epidermidis*; 3 = *S. haemolyticus*; 4 = *S. saprophyticus*; 5 = *S. lugdunensis*; 6 = *S. schleiferi*; d = 11 a 89 % de cepas positivas; () = reacción tardía.

Prueba de la coagulasa (5, 36, 39, 42, 43, 48)

La coagulasa es una proteína de composición química desconocida y que resulta relativamente termoestable, ya que resiste temperaturas de hasta 60°C durante 30 minutos; es muy sensible a la acción de enzimas proteolíticas y, como posee una actividad similar a la de la protrombina -que la capacita

para convertir el fibrinógeno en fibrina, aún cuando en el medio de reacción se encuentren ciertas sustancias anticoagulantes-, permite que el infectólogo la detecte mediante reacciones simples.

En cuanto a su función *in vivo*, ésta consiste principalmente en interferir la fagocitosis, debido a que genera la producción de redes de fibrina alrededor de los microorganismos, impidiendo que el fagocito entre en contacto con ellos para englobarlos; sin embargo, al parecer también neutraliza la actividad antimicrobiana que el suero normal manifiesta contra los agentes infectantes.

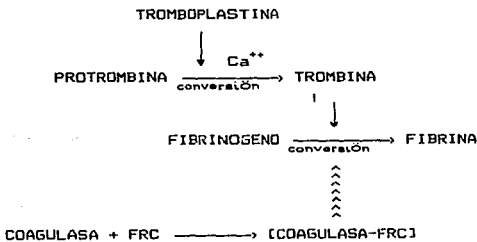
Tocante a su mecanismo de acción, existen evidencias de que la coagulasa puede inducir la activación de un mecanismo alterno de coagulación, habilitando a un componente del plasma para convertir el fibrinógeno en fibrina.

De hecho, se sugiere que la coagulasa es una sustancia muy parecida a la protrombina que, al reaccionar con dicho factor plasmático, forma un compuesto muy parecido a la trombina. Este paso es el decisivo porque, como es sabido, esta molécula es la que activa al fibrinógeno para formar fibrina en el proceso normal de la coagulación, cuando el organismo requiere de neutralizar las hemorragias o de delimitar y restaurar los tejidos involucrados en sucesos inflamatorios.

De acuerdo a lo anterior, la enzima origina la coagulación del plasma en dos pasos: inicialmente se verifica una reacción entre la enzima producida por el microorganismo y un factor proteico presente en el plasma (RFC, factor reactivo de la coagulasa) y, posteriormente, las redes de fibrina son producidas por efecto del complejo formado en el paso anterior.

Recordando el proceso que se efectúa en la última etapa de la coagulación sanguínea en el organismo, es posible relacionar el mecanismo asociado a la enzima estafilocócica:

Diagrama 1. Los pasos cruciales en el proceso de coagulación de la sangre y su relación con la reacción en la que participa la coagulasa estafilocócica.



Como se puede observar en dicho diagrama, existen una

coincidencia y una diferencia entre los mecanismos de la coagulación sanguínea y el que implica a la coagulasa: ambos requieren de fibrinógeno, pero el que implica a la enzima estafilocócica no necesita de la presencia de iones Ca^{++} .

En este sentido, debe recordarse que el plasma -a diferencia del suero- siempre contiene algún anticoagulante que mantiene atrapado al Ca^{++} . De esta manera, el hecho de que ocurra la coagulación durante la prueba, permite acreditar al microorganismo como productor de coagulasa. Sin embargo, para que lo anterior se considere como posibilidad única, es necesario que la cepa analizada sea pura, ya que otros microorganismos podrían utilizar al anticoagulante como fuente de carbono y, al degradarlo, la consecuente liberación del Ca^{++} reactivaría la ruta que se presenta en el organismo.

Otro aspecto importante en la realización de la prueba, radica en la elección del plasma que se va a emplear: debe considerarse principalmente su origen, ya que se ha encontrado que algunas cepas presentan resultados positivos con el humano y el de conejo, pero negativos con el de bovino.

Cabe señalar que la prueba de la coagulasa requiere de mayor tiempo que la del factor aglutinante, más no por ello es de difícil realización. Para llevarla a cabo, se adicionan

asépticamente 0.5 ml de plasma de conejo reconstituido en un tubo de ensayo estéril, al que posteriormente le son agregados 0.5 ml de un cultivo líquido y puro de 18-24 h del microorganismo analizado; los componentes se mezclan rotando el tubo y se procede a incubar a 37°C hasta que se observe la formación, bien sea de redes de fibrina o de un coágulo.

La reacción se considerará positiva si ocurre cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo. Las bacterias coagulasa fuertemente positiva pueden producir el coágulo dentro de las primeras cuatro horas, razón por la que es recomendable leer el resultado a intervalos de 30 minutos, ya que *S. aureus* también produce fibrinolisinias, y la acción de éstas puede destruir el coágulo, provocando la obtención de resultados falsos negativos cuando se toman las lecturas en lapsos mayores. Otras cepas de *S. aureus* sólo son capaces de producir suficiente cantidad de coagulasa hasta que transcurren cerca de 18 h. Por tal motivo, es conveniente revisar nuevamente a las 24 h los cultivos que en los primeros tiempos se observen como coagulasa negativa.

Finalmente, es importante hacer notar que, a mayor virulencia de la cepa analizada, menor será el tiempo en que la prueba será positiva.

Prueba del factor aglutinante (5, 6, 17, 23, 36, 43, 48)

El factor aglutinante -antes conocido como coagulasa ligada- debe su nombre actual a que las pruebas en que se manifiesta aparentan reacciones de aglutinación; dicha sustancia se encuentra íntimamente unida a la célula bacteriana (aunque se desconoce la naturaleza de dicha unión), por lo cual no se encuentra en filtrados de cultivos y puede ser detectada mediante una prueba en portaobjetos. Por otra parte, el hecho de que su reactividad no se vea afectada por la acción de anticuerpos inducidos por la coagulasa demuestra que la estructura química de ambas es diferente, además de que convierte el fibrinógeno en fibrina directamente, sin la necesidad de que intervengan factores plasmáticos.

La realización de la prueba es sencilla y rápida, ya que basta poner en un portaobjetos una colonia del microorganismo suspendida en solución fisiológica estéril homogeneizada y, a un lado de ella, una gota de plasma; ambas partes se mezclan perfectamente con un aplicador de madera y la observación de un precipitado granular o de acúmulos blancos al cabo de 20 a 30 segundos deberá interpretarse como positiva; cuando estas características no se presentan dentro de los dos o tres minutos siguientes a la ejecución, la prueba se reportará negativa.

Es importante mencionar que el factor aglutinante y la coagulasa pueden tener el mismo valor diagnóstico en los

laboratorios clínicos, siempre que el primero se haya detectado en la prueba correspondiente. Sin embargo, cuando sólo se realiza esta última y ha resultado negativa, el analista estará obligado a llevar a cabo la prueba de la coagulasa, en razón de que 15 a 45 % de las cepas de *S. aureus* no es productor de factor aglutinante.

Prueba de la nucleasa termoestable (5, 17, 39, 44, 46, 59, 64)

Otro recurso utilizado para clasificar a los estafilococos dentro de la especie *S. aureus*, está basado en la detección de enzimas capaces de degradar al DNA. Sin embargo, se ha comprobado que en dicho género existen dos complejos diferentes que catalizan la reacción, a los cuales se conoce como DNAsa termolábil y DNAsa termoestable, respectivamente, y que en realidad sólo el segundo de ellos puede establecer la presencia de *S. aureus* -aunque este microorganismo sintetiza ambos-.

Para demostrar la existencia de los dos complejos enzimáticos en los estafilococos, los investigadores recurrieron a introducir una pequeña variante en la metodología original, la cual consistió en exponer a la cepa -cuya actividad se deseaba investigar-, a temperaturas de 90 a 100°C, antes de inocularse en el medio que contenía el sustrato. Ello reveló que algunas cepas perdían su actividad hidrolítica, mientras

otras la conservaban, comprobándose así la existencia de los dos diferentes complejos enzimáticos y diseñándose el método que en realidad proporciona un argumento confiable para llevar a cabo la identificación correspondiente.

Al complejo enzimático capaz de llevar a cabo su actividad degradativa después de haber sido expuesto a la temperatura, se le conoce como DNasa estable al calor o termorresistente, mientras que, al que pierde esa capacidad, se le denomina DNasa termolábil.

Las formas termorresistente y termolábil se han puesto de manifiesto en la mayoría de los ECP, en tanto que en los ECN sólo se ha demostrado la presencia de la última de ellas. Sin embargo, la prueba considerada como definitiva para la detección de *Staphylococcus aureus* -tanto en las industrias alimentaria y farmacéutica, como en el laboratorio clínico- es la prueba de la coagulasa, pero sus resultados también pueden apoyarse en la prueba de la DNasa termorresistente, que es fácil de interpretar, barata, sencilla y muy confiable.

La metodología que se sigue para llevar a cabo la prueba que evalúa la producción de DNasa por los microorganismos, es bastante sencilla: se parte de un cultivo puro del microorganismo cuya actividad se quiera probar, ya sea que se

tenga en un medio líquido o en uno sólido, el cual se siembra por estria en el medio agar para DNAsa, que contiene DNA entre sus componentes; posteriormente se incuba a 37° C durante 18-24 h y una vez que se ha obtenido desarrollo, se adiciona 1 ml de HCl 1 N que se distribuye sobre toda la superficie del medio; al cabo de 3 minutos, aparecerán zonas transparentes alrededor de las colonias productoras de DNAsa, mientras que alrededor de aquellas que no lo hagan, el medio conservará el aspecto opaco que el DNA confiere al mismo. Cabe señalar que puede ser sembrada en alguna otra porción de la superficie del medio, alguna cepa que haga las veces de control negativo, con el objeto de que las personas que no tengan experiencia en la interpretación de los resultados de esta prueba, puedan comparar entre una reacción positiva y una negativa.

En cuanto a la prueba que evalúa de una manera cualitativa únicamente la producción de DNAsa termorresistente, ésta tiene como variantes que el cultivo puro de microorganismos por probar debe tenerse en forma líquida, de tal manera que antes de ser sembrado en el medio agar para DNAsa, puede resistir una exposición a la temperatura de un baño de agua hirviendo durante 15 minutos, sin que por ello pueda verse fundido el medio o inundado el cultivo (lo cual puede ocurrir si en su lugar es expuesta una placa que contenga medio sólido); la metodología posterior es la misma que la

anteriormente mencionada.

Respecto a la reacción que llevan a cabo estas enzimas, es poco lo que se sabe con certeza; son clasificadas como exonucleasas, porque realizan una reacción hidrolítica atacando sólo los extremos de las cadenas polinucleotídicas del DNA, ya que requieren la presencia de un grupo hidroxilo libre en los grupos fosfato de la porción 3' a 5' del sustrato, para poder desarrollar su actividad catalítica.

Prueba de la fosfatasa alcalina (5. 42, 46. 48)

Las fosfatasas constituyen un grupo muy distribuido de enzimas, cuyo grado de especificidad varía dependiendo de su procedencia; desarrollan actividad hidrolítica tanto sobre sustratos alifáticos (entre los que se cuentan a la mayoría de monoésteres del ácido ortofosfórico, glicerol 1-fosfato y glicerol 2-fosfato), como aromáticos (tales como el 4 nitrofenil fosfato), aunque es sólo un reducido tipo de ellas el que puede hacerlo sobre diésteres, triésteres fosfóricos y polifosfatos. Compuestos entre los que se incluyen el ATP, ADP, AMP, etc. Esta actividad específica se ve estimulada por la presencia de iones Mg^{++} , que sin embargo pueden inhibirla cuando se encuentran en concentraciones muy elevadas, al formarse grupos que sustituyen a los que se les ha demostrado participación en la reacción.

Otro factor que afecta de una manera muy similar la actividad de la fosfatasa alcalina, mostrado incluso para células de *Staphylococcus aureus*, es la concentración de fosfato inorgánico en el medio de cultivo; ya que su presencia estimula tanto la producción celular como una gran actividad de la enzima, notándose que el exceso del mismo reprime la producción de ésta. Por otro lado, se ha demostrado que la inosina incrementa la hidrólisis del sustrato por la enzima y que la presencia de ésta está relacionada con la del ácido teicoico superficial en la célula bacteriana.

La prueba de la fosfatasa alcalina ha venido siendo citada por los investigadores, como una de las pruebas confiables que existen para determinar la especie a la que pertenecen los microorganismos del género *Staphylococcus* y, por ende, su posible virulencia; pero existen además reportes que muestran que tanto los patógenos como los no patógenos producen la enzima y, por lo tanto, aunque ésta sea puesta de manifiesto, el resultado no aporta datos significativos para lograr este objetivo. Algunas investigaciones han mostrado que sólo el 73 % de un lote de ochenta y ocho cepas de ECP produjeron fosfatasa alcalina, lo cual supone que la prueba tiene alguna sensibilidad; pero se ha mostrado también la producción de la enzima por el 53 % de cepas coagulasa negativa, lo que sin lugar a dudas sienta un hecho precedente importante, para descartar a esta prueba como recurso confiable en el

diagnóstico de enfermedades. Posteriormente otros investigadores han arrojado resultados similares, que concluyen la reducida exactitud que para esta finalidad tiene la prueba.

Otros trabajos muestran que la prueba coincide casi en un 100 % con la prueba de la coagulasa. razón por la cual se busca optimizar el método.

Por lo que se refiere a la bioquímica involucrada en la prueba, la producción de fosfatasa se determina con base en la liberación de la fenolftaleína, debida a la acción enzimática presente ejercida sobre el reactivo utilizado como sustrato (difosfato de fenolftaleína). Al haber actividad hidrolítica de la enzima sobre los enlaces fosfato, la fenolftaleína quedará libre, pudiendo con ello ser detectada si se pone en contacto con algún Alkali, ya que presentará la coloración característica de este indicador ácido-base cuando se encuentra en medio básico.

FOSFATASA

Difosfato de fenolftaleína \longrightarrow Fenolftaleína libre (1)

Fenolftaleína + Alkali (NaOH o NH₃) \longrightarrow Color rosa rojizo
brillante (2)

Prueba de la ornitina descarboxilasa (S. 43, 46, 48)

Las descarboxilasas son enzimas capaces de actuar sobre la porción carboxilo de los aminoácidos, produciendo aminas y CO_2 ; aunque son numerosas, cada una es específica para su propio sustrato. Las descarboxilasas que son útiles en el diagnóstico de laboratorio son tres: arginina descarboxilasa, lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa.

Cabe mencionar que la descarboxilación de la lisina genera cadaverina y CO_2 , en tanto que la de la ornitina reditúa putrescina y CO_2 . Sin embargo, en el caso de la arginina, ésta puede ser catabolizada a través de dos sistemas que se pueden presentar simultánea o separadamente, participando -respectivamente- la arginina dihidrolasa y la arginina descarboxilasa; en este sentido, la segunda enzima origina la formación de putrescina, CO_2 y NH_3 -a través de agmatina- y, por su parte, la dihidrolasa genera estas mismas sustancias, pero pasando por ornitina.

Como todos estos productos de la descarboxilación son estables en condiciones anaerobias, se prefiere incubar a la bacteria estudiada, previo recubrimiento de la superficie del medio con una capa de parafina. En este contexto, el oxígeno existente en el medio será consumido por el microorganismo durante su fase inicial de crecimiento y, más tarde, las aminas provocadas por las respectivas descarboxilaciones aumentarán el pH, virando a vino la coloración del indicador.

se trate del púrpura de bromocresol o del rojo de cresol.

En cuanto al medio utilizado, éste es el caldo descarboxilasa de Moeller, el cual contiene 5 g de peptona, 5 g de extracto de carne, 0.03 g de púrpura de bromocresol, 0.005 g de rojo de cresol, 0.005 g de piridoxal, 0.5 g de glucosa y 1000 ml de agua destilada. Su pH final se ajusta a 6.0.

Su preparación consiste en mezclar y disolver los reactivos, antes de distribuirlos en 4 tubos de 13 x 100 -por cada microorganismo analizado-, uno de los cuales debe llevar tapón de rosca; respecto a los 3 restantes, se les añade a cada uno el aminoácido correspondiente (ornitina, lisina y arginina), a que queden en una concentración de 1 %. Se reajusta el pH al medio que contiene la ornitina antes de proceder a la esterilización: 121°C, 15 lb. durante 10 minutos.

Para realizar la técnica se inoculan los tubos con un cultivo joven, tomando con una asa la colonia sospechosa; una vez realizado lo anterior, se cubren los medios con una capa de 4 a 5 mm de parafina estéril y se incuban a 37°C. Todos los tubos deben examinarse diariamente durante cuatro días.

La prueba se interpreta de la siguiente manera: una reacción alcalina será positiva y ésta se evidenciará por el color

púrpura del medio. Cabe mencionar que el contenido de los tubos puede virar a amarillo en las horas iniciales, debido a la producción de ácido a partir de la glucosa.

Los resultados positivos de la ornitina descarboxilasa suelen ayudar a identificar a la especie *S. lugdunensis* con considerable exactitud dado que, a la fecha, no se han reportado cepas ornitina descarboxilasa negativa en esta especie. No obstante, deben llevarse a cabo otras pruebas para diferenciarla de *S. epidermidis*, ya que algunas cepas de esta última han mostrado actividad retardada en esta reacción.

Prueba de la ureasa (5, 36, 43, 48)

La urea es una diamina que se hidroliza rápidamente en presencia de una enzima constitutiva: la ureasa. En solución, la urea se hidroliza reedituando dióxido de carbono, amoníaco y agua, los cuales finalmente se convierten en carbonato de amonio. La reacción se detecta con un indicador que vira a un color característico al aumentar el pH del medio por efecto de este último compuesto. La reacción se puede visualizar en medios líquidos o sólidos.

El medio líquido más utilizado para efectuar esta prueba es el caldo urea de Stuart, el cual contiene 9.1 g de fosfato

monopotásico, 0.1 g de extracto de levadura, 9.5 g de fosfato disódico, 20.0 g de urea, 0.001 g de rojo de fenol y 1000 ml de agua destilada; su pH debe ajustarse a 6.8.

Los reactivos se mezclan y disuelven sin calentar y posteriormente se esterilizan por filtración con membrana Millipore. Después, el medio se reparte en tubos de 12 X 75, a razón de 2.5 ml en cada uno, bajo estrictas condiciones de esterilidad.

El medio sólido más utilizado es el agar urea de Christensen, el cual contiene 1 g de peptona, 1 g de glucosa, 5 g de cloruro de sodio, 2 g de fosfato monopotásico, 20 g de urea, 0.012 g de rojo de fenol, 15 g de agar y 1000 ml de agua destilada; su pH final debe ser, como en el medio de Stuart, de 6.8.

Con excepción de la urea, todos los reactivos se mezclan y disuelven en 900 ml de agua, antes de procederse a su esterilización a 121°C, 15 lb. Por otro lado, se prepara una solución de urea en 100 ml de agua, se esteriliza por filtración y, una vez que la otra porción se ha enfriado hasta aproximadamente 50°C, ambas partes se mezclan en condiciones asépticas, se distribuyen en tubos de 16 X 150 -6 ml en cada uno- y se dejan enfriar en posición inclinada.

Para realizar la técnica, se añade una colonia sospechosa al

caldo o se estria sobre el agar. Se incuba a 35°C durante 18 a 24 h y se observan los resultados: tanto en el caldo de Stuart como en el agar de Christensen, el indicador del medio virará a rojo si el medio se alcaliniza por la producción de carbonato de amonio a partir de la urea; en el caso del agar de Christensen, el vire de todo el medio a rojo, indicará que el microorganismo es un degradador rápido de urea. Cuando el color rojo sólo se presente en el pico de flauta y poco a poco se difunde en todo el tubo, se trata de un microorganismo que degrada lentamente la urea.

Esta prueba es útil para diferenciar algunas especies de *Staphylococcus*, ya que *S. epidermidis*, *S. intermedius*, y la mayoría de las cepas de *S. saprophyticus* la dan usualmente positiva; *S. aureus*, *S. lugdunensis*, y *S. hyicus* generan resultados variables, y tanto *S. haemolyticus* como *S. schleiferi* la dan negativa.

Prueba de la resistencia a la novobiocina (3, 5, 26, 32, 36, 42)

Kloos y Schleifer han desarrollado un esquema simplificado para llevar a cabo la identificación de especies estafilocócicas asociadas directamente al ser humano. En este sentido, un parámetro importante de dicho esquema radica en determinar la susceptibilidad o resistencia de las cepas a

1.6 µg/ml de novobiocina, puesto que sólo tres especies de ECN (*S. saprophyticus*, *S. cohnii* y *S. xylosus*) son resistentes a este antibiótico y, de ellas, únicamente a *S. saprophyticus* se le concede -dada su regular frecuencia- una importancia clínica considerable.

El método contempla el uso de discos impregnados con 5 µg/ml de novobiocina y al agar P como medio de prueba, y los aislamientos que manifiestan halos de inhibición de 1 a 5 mm de diámetro -previa incubación de 24 h a 35°C- se consideran novobiocina resistentes. Una desventaja del procedimiento consiste en el hecho de que el agar P no se encuentra disponible comercialmente en forma deshidratada, aunque ello es muy relativo, ya que el medio Mueller-Hinton puede sustituirlo.

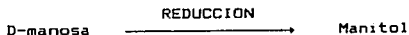
En un estudio reciente, 254 aislamientos clínicos de ECN fueron identificados mediante el esquema de Kloos, incluyéndose 111 cepas de *S. epidermidis*, 50 de *S. hominis*, 31 de *S. saprophyticus*, 27 de *S. simulans*, 23 de *S. haemolyticus*, 10 de *S. warneri* y 2 de *S. capitis*. Cuatro a cinco colonias de cada una se propagaron en placas de tripticase soya agar con 5 % de sangre de carnero y, posteriormente, se resembraron en 5 ml de caldo tripticase soya, incubándose a 35°C durante 2 a 5 h, hasta que apareció una ligera turbidez que se ajustó al 0.5 del estándar de Mac

Farland. Las suspensiones se inocularon masivamente en 2 placas: una con agar P y otra con Muller-Hinton, se colocaron los discos correspondientes y, previa incubación de 16 a 18 h a 35°C, se midieron los halos de inhibición, considerándose como susceptibles a las cepas que los presentaban de por lo menos 16 mm (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri* y *S. capitis*).

Los resultados mostraron un elevado grado de correlación entre los 2 medios empleados, comprobándose la posibilidad de utilizar al Mueller-Hinton cuando no se disponga del agar P.

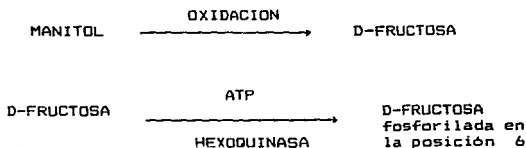
Prueba de la manitolasa (36, 43, 48, 64)

Con este nombre se conoce al sistema enzimático mediante el cual una célula bacteriana es capaz de llevar a cabo la utilización de manitol, con el fin de satisfacer sus requerimientos de carbono. El manitol es químicamente un azúcar-alcohol, tal como otros compuestos a los que también se les denomina alcoholes polihídricos -adonitol, dulcitol y sorbitol-, mismos que son producidos a partir de la reducción de monosacáridos:



La vía mediante la cual *S. aureus* metaboliza a este compuesto

es la glicólisis, la cual sucede una vez que han ocurrido reacciones en las que se ven involucradas isomerasas, ligasas, transferasas y oxidoreductasas, para transformar al manitol o a la manosa -según el caso-, en glucosa-6-fosfato: un estudio que se ha realizado sobre este particular ha conducido a la formulación de la regla de Bertrand Hudson, que establece que la oxidación de un grupo alcohólico secundario a grupo cetónico, solamente sucede si éste se encuentra situado entre un grupo primario y otro secundario y, además, está en posición cis con respecto a este último. De acuerdo a lo anterior, el manitol será oxidado obteniéndose D-Fructosa, y de esta manera bastará con que ésta sea fosforilada en la posición 6 por catálisis de la hexoquinasa y con gasto de un ATP por molécula.



De esta manera, el sustrato será incorporado al sistema Embden-Meyerhof-Parnas, cuyos productos finales ácidos provocarán una disminución en el pH del medio de cultivo, ovc podrá detectarse mediante el vire a amarillo del indicador rojo de fenol.

La prueba de la manitolasa constituye una reacción que, dada su aceptable exactitud y sencillez, es utilizada en muchos laboratorios para diferenciar a la especie *S. aureus* -que la da positiva- de la mayoría de los estafilococos coagulasa negativa (ECN) -que no lo hacen-. Puede ser llevada a cabo tanto en medio sólido como en medio líquido, si bien una parte de los analistas prefiere efectuarla en el primero, al mismo tiempo que se aísla al microorganismo en medios selectivos con alta concentración de NaCl -como el manitol sal agar-.

De esta manera, se reduce el tiempo de diagnóstico, aunque existe un serio inconveniente: el índice de confiabilidad de la prueba no es del 100 % y, de no realizarse también la reacción de la coagulasa, se corre el riesgo de reportar erróneamente al microorganismo aislado, con toda la problemática que ello origina.

La técnica se reduce a sembrar la muestra o a la bacteria en manitol sal agar o en caldo manitol rojo de fenol -respectivamente-, dado que sus composiciones incluyen tanto al sustrato como el indicador; los medios se incuban posteriormente durante 24 h. después de las cuales se hará la lectura de los resultados, interpretándose la prueba como positiva cuando el indicador del medio ha virado a amarillo o, como negativa, cuando dicha coloración es roja.

Cabe mencionar que en algunos laboratorios se prefiere realizarla en el medio líquido dado que, a la vez que se lleva a cabo, se obtiene el cultivo líquido de 24 h a partir del cual puede llevarse a cabo la prueba de la coagulasa en tubo; esto implica un considerable aumento en el tiempo de identificación, pero con ello se aumenta la confiabilidad del diagnóstico.

Fermentación de sacarosa (5, 36, 42, 48, 64)

Los hidratos de carbono se clasifican como: 1) monosacáridos, aldehídos polihidroxílicos o cetonas; 2) polisacáridos u oligosacáridos, productos de condensación de dos o más monosacáridos (polímeros de los monosacáridos), o 3) alcoholes polihídricos y ciclitoles (inositoles), productos de la reducción de los monosacáridos.

Los disacáridos ($C_6H_{12}O_{11}$) son polisacáridos (oligosacáridos) compuestos por dos unidades de monosacáridos, glucosa más otro monosacárido. Un ejemplo de éstos es la sacarosa, conformada por glucosa y fructosa.

La producción de ácido a partir de carbohidratos -vía Embden Meyerhof-, puede ser detectada fácilmente mediante métodos en placa. El agar para carbohidratos se prepara adicionando una cantidad adecuada de solución patrón del carbohidrato

-esterilizada por filtración-, en un medio de agar base con indicador rojo de fenol, púrpura de bromo cresol u otro, esterilizado en autoclave a una temperatura de 121°C y 15 libras de presión, por 5 minutos; no se aconseja someter a autoclave durante 15 minutos, ya que algunos hidratos de carbono, entre ellos la sacarosa, pueden descomponerse o resultar con algunas alteraciones. En el medio, la concentración final del carbohidrato debe ser cercana al 1%. El cultivo se incuba a 35 - 37°C en condiciones aerobias y se examina a las 24 h. para observar si existe acidez. lo cual es detectable mediante el vire del indicador que, respecto a los antes mencionados, es hacia amarillo.

Cabe señalar que la prueba también puede realizarse en medios líquidos y en ambas formas permite diferenciar a algunas especies de importancia clínica, resultando negativa para *S. schleiferi* y positiva para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. intermedius* y *S. hyicus*.

vi. Importancia clínica del género *Staphylococcus*

Hasta hace aproximadamente 12 años, en el campo de la salud se consideraba que, dentro del género *Staphylococcus*, la única especie patógena era *S. aureus*; de hecho, a los ECN se les clasificaba como saprófitos o de baja patogenicidad para los

humanos, e inclusive, a algunas especies de este grupo se les incluía dentro de una sola: *S. epidermidis*, cuya mención en los reportes de los laboratorios clínicos se interpretaba como contaminación de las muestras con miembros de la flora de piel y/o mucosas. Sin embargo, en los años recientes, todo el planteamiento antes señalado se ha modificado radicalmente, ya que varias cepas de ECN han mostrado un marcado incremento en padecimientos infecciosos, en especial cuando el paciente analizado se encuentra sometido a procedimientos médicos invasivos o es tratado con cuerpos extraños residentes, tales como sondas, catéteres y sus equivalentes (5, 18, 35, 39, 50, 65).

Patologías asociadas a *S. aureus*

Por lo que respecta a las infecciones debidas a *S. aureus*, éstas pueden relacionarse con la toxigenicidad y/o la reconocida invasividad de este microorganismo. En el primer caso, las principales afecciones son: el síndrome estafilocócico de la piel escaldada o SEPE -debido a la acción de la toxina exfoliativa-, las intoxicaciones alimentarias -ocasionadas por las enterotoxinas A, B, C₁, C₂, D, E y F- y el síndrome del choque tóxico o SST -producido por las enterotoxinas A y F- (1, 14, 17, 23, 38, 45, 52, 53, 60, 65, 68).

En cuanto a las enfermedades debidas a la invasividad de *S.*

aureus, éstas se caracterizan por localización, supuración y necrosis tisular -con cicatrización resultante- y una lesión muy frecuente, el furúnculo -que equivale a un absceso cutáneo-, actúa a menudo como fuente de diseminación del microorganismo, a partir de la cual ocurren posteriormente otras enfermedades en el individuo afectado. Entre ellas destacan: la faringoamigdalitis, sinusitis, otitis media, traqueítis, bronquitis y/o neumonía, septicemia, endocarditis, meningitis, artritis, osteomielitis, pielonefritis, cistitis, prostatitis, uretritis, vaginitis, cervicitis, salpingitis, abscesos pélvicos, diversas oftalmías, paroniquia, etc. (5, 6, 13, 18, 23, 27, 37, 41, 50, 55, 65).

No obstante, es importante hacer notar que dichas entidades clínicas también pueden adquirirse a través de otras vías de penetración al hospedador, siendo la inhalatoria una de las más comunes (4, 5, 34, 37, 65, 70).

En este sentido, las personas colonizadas vía aérea pueden manifestar síntomas relacionados con cuadros faríngeos, o bien, constituirse en portadores que no adquieren padecimientos de vías respiratorias, pero que transmiten el microorganismo a individuos susceptibles de desarrollar patologías en dicha región anatómica (23, 39, 65, 69).

De hecho, la frecuencia del estado de portador faríngeo se

estima entre 30 y 50 %, aunque en las poblaciones hospitalarias llega a acercarse al 100 %. El hecho de que dichos individuos puedan transportar y eliminar estafilococos patógenos durante períodos prolongados, indica que ellos y muchos de sus contactos poseen un grado importante de inmunidad. Por lo tanto, se considera que es tan sólo en ausencia o debilitamiento de las defensas normales cuando aumentan las posibilidades de invasión por parte de *S. aureus*; así pues, ocurre infección con más frecuencia a nivel de alguna lesión local, destacando las quemaduras, abrasiones u otros tipos de herida. Las anormalidades y padecimientos que producen inmunodepresión generalizada y que favorecen las infecciones estafilocócicas incluyen diabetes, leucemia, insuficiencia renal, terapia inmunodepresora y enfermedades por inmunodeficiencia que implican defectos en la respuesta de anticuerpo humoral (5, 39, 40, 47, 65).

Sin embargo, por razones todavía desconocidas, algunos individuos aparentemente sanos experimentan episodios repetidos de furunculosis, a veces durante largos años (5, 17, 23, 37, 39, 65, 67).

En todo caso, parece existir consenso sobre que la colonización estafilocócica de los tegumentos está limitada, en condiciones normales, por el antagonismo que ejercen los miembros de la flora habitual, aunque después de los

tratamientos intensivos con antibióticos de amplio espectro, las condiciones temporales que se generan favorecen una colonización extensa por *S. aureus* (5, 37, 39, 58, 65, 69).

Cabe mencionar que, dentro de las instituciones nosocomiales, esta especie sólo es superada por *Pseudomonas aeruginosa* entre los principales agentes etiológicos de infecciones intrahospitalarias, las cuales generalmente inician a nivel de tejidos cutáneo y/o subcutáneo pero se extienden al torrente circulatorio, ocasionando septicemias muy graves, e inclusive, otros padecimientos serios que tienen su origen en la diseminación hematógena del microorganismo -endocarditis, meningitis, artritis, osteomielitis, etc.- (5, 13, 18, 25, 27, 39, 50).

Importancia clínica de los ECN

De todas las especies de ECN, *S. epidermidis* es el principal patógeno potencial y el agente etiológico más destacado de sepsis nosocomial en las unidades oncológicas y neonatales. De hecho, en países desarrollados se lo ha detectado en 74 a 92 % de las bacteremias causadas por ECN dentro de las unidades hospitalarias, atribuyéndosele este hecho a causas diversas, tales como la colonización intestinal por este microorganismo tras la administración prolongada de antibióticos por vía oral y a la colocación de catéteres intravenosos para la administración de quimioterapia (5, 15, 18, 22, 24, 40, 50, 56).

Por otra parte, se ha observado que numerosas infecciones cardíacas debidas a esta especie suceden a los procedimientos de cirugía de válvulas cardíacas, cirugía cardiovascular y cardiectomía, incluyendo mediastinitis, infecciones por injertos vasculares, endocarditis asociadas a válvulas prostéticas de corazón y prolapsos de válvula mitral. En cuanto a la endocarditis de válvulas naturales, *S. epidermidis* es responsable del 5 al 10 % de los casos y otro 30 % se debe a otras especies de ECN. Contrastando con ello, en la endocarditis de válvulas prostéticas, *S. epidermidis* es responsable del 40 % de los casos y otros ECN causan del 40 al 50 %. Sin embargo, los cuadros ocasionados por *S. epidermidis* se consideran más peligrosos, debido a que se trata de cepas resistentes a muchos antibióticos y, por lo tanto, su índice de mortalidad puede llegar al 60 % (5, 9, 19, 21, 22, 27, 58).

Adicionalmente, *S. epidermidis* es el patógeno principal de infecciones originadas por los circuitos de derivación del líquido cefalorraquídeo, siendo responsable hasta en el 60 % de las afecciones de los ventriculoarticulares y ventriculoperitoneales, los cuales se invaden para efectuar el tratamiento de la hidrocefalia. Otros dispositivos parecidos que se utilizan para la administración de quimioterapia y los catéteres que se emplean para descomprimir el líquido cefalorraquídeo en casos de elevaciones agudas de la presión intracraneal, también se encuentran contaminados con

frecuencia por esta especie (5, 18, 28, 33, 50, 57, 65).

Por otro lado, *S. epidermidis* es responsable de aproximadamente el 40 % de las infecciones debidas a articulaciones prostéticas, pudiéndosele aislar de una gran variedad de aparatos ortopédicos (5, 22, 56, 57, 65).

Otros padecimientos en los que su participación es menos relevante son osteomielitis, peritonitis -sobre todo durante diálisis peritoneal ambulatoria continua-, e infecciones del tracto urinario -tales como cistitis, uretritis y pielonefritis- (5, 65).

En general, las cepas de ECN aisladas en cultivos de sangre de pacientes hospitalizados muestran una resistencia por arriba del 56 % a la meticilina. En este sentido, los aislamientos nosocomiales de *S. epidermidis* resistentes a la meticilina (MRSE) representan un serio problema clínico, particularmente en los pacientes con válvulas prostéticas de corazón y en quienes se han sometido a otras formas de cirugía cardíaca. A este respecto, cabe señalar que esta clase de trastornos se ha tratado exitosamente mediante terapias combinadas que incluyen el empleo de vancomicina más rifampicina o un aminoglucósido (5, 9, 19, 21, 29, 49).

S. haemolyticus es la segunda especie de ECN, entre las que se

encuentran con mayor frecuencia en las infecciones clínicas, destacando las endocarditis de válvulas naturales, septicemia, peritonitis, las afecciones del tracto urinario y las de heridas traumáticas (5, 19, 36, 49, 64).

Dos nuevas especies de ECN: *S. lugdunensis* y *S. schleiferi*, aparecen como oportunistas muy significativos, ya que contaminan con suma frecuencia los materiales de implantación, catéteres y sondas (5, 18, 34, 65).

A *S. lugdunensis* se le ha comprobado una incidencia considerable en endocarditis de válvulas naturales y prostéticas, septicemia, abscesos cerebrales, osteomielitis, osteoartritis crónica, infecciones de vasos prostéticos, de tejidos profundos, de heridas, de la piel, de líquido peritoneal y de muchos otros tejidos cateterizados. En todos estos casos, un buen número de pacientes presenta factores predisponentes a la infección, tales como diabetes mellitus, traumatismos por cirugía, cáncer, SIDA, eczema o soriasis, y enfermedades múltiples subyacentes (5, 9, 18, 22, 34).

Por lo que respecta a *S. schleiferi*, esta especie se encuentra con menor frecuencia que la anterior, tanto en el ambiente de los hospitales como fuera de ellos. No obstante, se le ha observado como agente etiológico de empiema cerebral, infecciones de heridas, bacteremias con osteitis de columna

vertebral y de otras enfermedades asociadas a sondas craneales de desague y a catéteres de la vena yugular (5, 18, 34).

A otro ECN. *S. saprophyticus*, se le considera el segundo agente causal de infecciones del tracto urinario en los jóvenes, principalmente en las mujeres sexualmente activas. Algunos investigadores lo proponen como responsable de prostatitis y uretritis no gonocócica en varones, aunque también se le ha aislado de heridas infectadas y septicemias (17, 36, 39, 43, 49, 56, 64, 65).

Finalmente, existen otros ECN, como *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. saccharolyticus*, *S. capitis* y *S. xylosum*, que aparecen con baja frecuencia en una gran variedad de infecciones humanas. *S. warneri*, por ejemplo, se ha reportado como agente causal de osteomielitis vertebral e infecciones del tracto urinario en ambos sexos (5, 23, 36, 56, 64).

vii. Algunos aspectos sobre el tratamiento de las estafilococcias

Hasta hace algunos años, la mayoría de los estafilococos que causaban enfermedades a la comunidad era sensible a la penicilina y sólo las cepas que ocasionaban infecciones intrahospitalarias resultaban resistentes a dicho antibiótico.

No obstante, en la actualidad ha desaparecido esta diferencia basada en el lugar de adquisición del microorganismo (6, 8, 16, 48, 58, 61, 65).

Antes de que surgieran las cepas resistentes a la penicilina, este antibiótico era considerado el de elección para instituir el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*. Sin embargo, ahora se sabe que el 85 al 90 % de los aislamientos de esta especie no es susceptible a este antimicrobiano, debido principalmente a que dichas cepas poseen plásmidos que codifican para la producción de β -lactamasas, las cuales inactivan algunas formas del antibiótico (2, 8, 29, 30, 33, 65, 70).

En este sentido, cabe señalar que la meticilina es una penicilina resistente a la acción de las β -lactamasas y, por ello, constituye una de las fórmulas utilizadas durante la terapia de las estafilococcias provocadas por cepas de *S. aureus* resistentes a las penicilinas tradicionales. Sin embargo, recientemente se ha reportado un número progresivo de aislamientos no susceptibles a este antibiótico, a los cuales se les ha diferenciado como *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) (6, 12, 16, 29, 30, 36, 39).

En 1980, sólo el 4.9 % de los ECP aislados a partir de infecciones nosocomiales no resultó susceptible a este antimicrobiano. No obstante, hoy en día esta cifra se ha

incrementado notablemente, observándose que la mayoría de las cepas de este grupo es resistente a todos los antibióticos β -lactámicos, incluyendo a las cefalosporinas de la tercera generación; adicionalmente, se ha comprobado su falta de susceptibilidad a la acción de la estreptomina, tetraciclina y sulfonamidas (6, 7, 12, 29, 30, 36, 37, 51).

Cabe subrayar que la resistencia a la meticilina no depende de la producción de β -lactamasas -aunque generalmente los MRSA sintetizan este tipo de enzimas-, sino de las proteínas de membrana externa de estas cepas, las cuales no funcionan como receptoras del antibiótico (12, 16, 29, 30, 36, 39).

Los MRSA se han venido reportando tanto en infecciones adquiridas en el medio hospitalario, como en las que la comunidad adquiere en otros ámbitos. Sin embargo, se han presentado grandes brotes nosocomiales en aproximadamente un tercio de los hospitales afiliados a las escuelas de Medicina, considerándose que los microorganismos son introducidos a las instituciones por pacientes infectados y se diseminan vía las manos del personal médico que recorre las habitaciones de esos y otros nosocomios. En contraste, los MRSA encontrados en la consulta externa se han concretado preferentemente en las poblaciones adictas a las drogas (5, 30, 36, 39, 61, 70).

La vancomicina es comúnmente el antibiótico de elección para

tratar los cuadros debidos a MRSA. De hecho, dentro de los hospitales que enfrentan mayores problemas asociados a estos microorganismos se emplea dicho antimicrobiano para establecer la terapia inicial empírica, la cual se puede modificar posteriormente de acuerdo a las pruebas de susceptibilidad correspondientes (5, 8, 10, 16, 29, 36, 48, 62, 63, 70).

Otros antibióticos efectivos utilizados con este fin son el mupirocín -cuando la colonización representa un fuerte riesgo de infección-, y los del grupo de las quinolonas (10, 29, 36).

Estudios referentes a ECN de una gran variedad de procedencias, demuestran que estos microorganismos presentan una resistencia del 26 % al 74 % a las penicilinas aunque, en ciertas poblaciones, por arriba del 67 % de las cepas puede ser resistente a la meticilina. En el caso de *S. epidermidis*, se ha encontrado que 5 a 20 % de los aislamientos resiste a este antibiótico; adicionalmente, se ha observado que la mayoría de MRSE (*S. epidermidis* resistentes a meticilina) tampoco son susceptibles a sulfametoxazol, estreptomicina, eritromicina, y tetraciclina. De hecho, recientemente se han reportado aislamientos de *S. epidermidis* asociados a endocarditis por válvulas infectadas, los cuales revelan una resistencia de hasta 79 % a la meticilina, mismos que responden adecuadamente a los tratamientos combinados con rifampina y vancomicina (6, 12, 21, 29, 36, 49, 65).

S. epidermidis, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, y *S. warneri* son especies muy resistentes a múltiples antibióticos, especialmente en pacientes que reciben terapia prolongada con penicilina, tetraciclina o eritromicina (2, 21, 29, 36, 40, 49, 51, 65).

En general, dado el amplio espectro de resistencia, tanto de ECP como de los ECN, es importante la realización adecuada de las pruebas de susceptibilidad a los aislamientos. En este sentido, es importante considerar que, para reconocer confiablemente a los MRSA y MRSE, el Comité Nacional de Estándares del Laboratorio Clínico de los E.U.A., recomienda emplear métodos de microdilución en caldo (21, 29, 36, 37, 48, 49).

II. PARTE EXPERIMENTAL

i. Equipo, material, reactivos y medios de cultivo.

Autoclave

Balanza analítica

Balanza granataria

Campana de flujo laminar

Incubadora ajustada a 35°C

Microscopio estereoscópico

Microscopio óptico

Refrigerador (4°C)

Abatelenguas

Asa bacteriológica

Cajas Petri desechables

Espátulas

Hisopos estériles

Matraces Erlenmeyer de 500 y 1000 ml

Mechero Bunsen

Mechero tipo Fisher

Portaobjetos

Probetas de 500 y 1000 ml

Tripié con tela de alambre

Tubos de ensaye de 13 x 100

Acido clorhídrico 0.1 N
Agar S110
Caldo Manitol Rojo de Fenol
Colorantes y reactivos de Gram
Hidróxido de sodio al 0.5 %
Manitol sal agar
Plasma humano citratado

ii. Metodología

En este trabajo se realizaron los análisis microbiológicos de 150 exudados faríngeos practicados a otras tantas personas sin patologías aparentes en el tracto respiratorio: 36 varones y 114 mujeres, todos ellos entre los 18 y 25 años de edad.

Recolección y cultivo de las muestras

Los especímenes se recolectaron con hisopos de algodón estériles a partir de la faringe, tomándose en consideración las precauciones recomendadas para no incrementar la carga microbiana con microorganismos presentes en boca y úvula.

Posteriormente, se procedió a descargar el contenido de los hisopos en placas de Agar S110 y Manitol sal agar y a estriar la superficie de las mismas con asas esterilizadas a la flama.

Los incubaciones correspondientes se llevaron a cabo a 35°C durante 24 a 48 h.

Identificación de las bacterias aisladas

Las colonias que sugerían la presencia de *Staphylococcus* -redondas, de 1 a 3 mm de diámetro, convexas, de bordes regulares y consistencia butirácea-, se observaron a inmersión -previo frotis al Gram- para comprobar que se trataba de dicho género y, a continuación, se sembraron en caldo manitol rojo de fenol, incubándose a 35°C durante 24 h. Una vez que se leyó la prueba de la manitolasa, se procedió a realizar la de la coagulasa, previa neutralización del pH a los cultivos que manifestaban acidez o alcalinidad -de acuerdo al vire del indicador rojo de fenol y, finalmente, se realizaron las lecturas de la prueba de la coagulasa, a los 30, 60, 120, 180 y 240 minutos, e inclusive, a las 18-24 h cuando en los lapsos anteriores el resultado había sido negativo.

iii. Resultados

De las 150 muestras analizadas, en 111 se detectó la presencia del género *Staphylococcus*: 33 contenían tanto *S. aureus* como ECN, 46 sólo presentaron ECN y en las 32 restantes únicamente se observó a *S. aureus* (consultar la tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia del género *Staphylococcus* en la faringe de personas sin patología respiratoria aparente.

MICROORGANISMO	No. DE POSITIVOS	% DEL TOTAL DE MUESTRAS	% ENTRE LOS CASOS POSITIVOS
ECN y <i>S. aureus</i>	33	22.00	29.73
Sólo ECN	46	30.67	41.44
Sólo <i>S. aureus</i>	32	21.33	28.83
TOTALES	111	74.00	100.00

Con respecto a las características epidemiológicas analizadas en el trabajo, las tablas 3 y 4 resumen la distribución de casos positivos, considerando sexo, tabaquismo, habitación y frecuencia de cuadros faríngeos en las personas sometidas a estudio.

Tabla 3. Número de personas sanas en cuya faringe se detectaron ECN.

VARIABLE	No. DE PERSONAS MUESTREADAS	No. DE POSITIVOS	% DE POSITIVOS
Mujeres	114	59	51.8
Hombres	36	20	55.6
Fumadores	30	13	43.3
No fumadores	120	66	55.0
Noroeste‡	10	3	30.0
Noreste‡	21	10	47.6
Centro‡	9	3	33.3
Suroeste‡	71	42	59.2
Sureste‡	39	21	53.8
Faring. frec.	77	44	57.1
No faring.	73	35	48.0

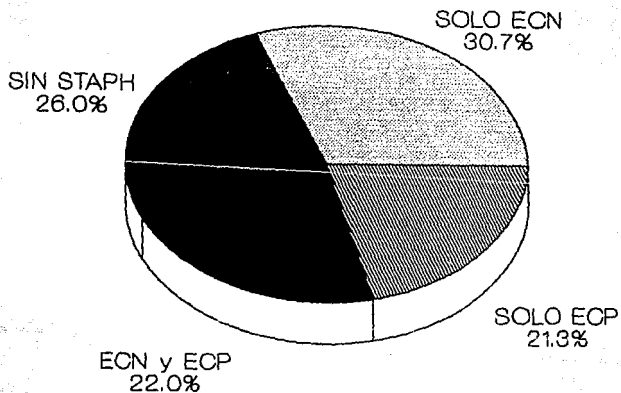
CLAVE: ‡ = parte de la ciudad en la que tienen su domicilio, Faring. frec. = que padecieron 2 ó más cuadros faringicos anuales durante los 3 últimos años, No faring. = que padecieron 1 ó ningún cuadro faringico anual durante los últimos 3 años.

Tabla 4. Número de personas sanas en cuya faringe se detectó la presencia de *S. aureus*.

VARIABLE	No. DE PERSONAS MUESTREADAS	No. DE POSITIVOS	% DE POSITIVOS
Mujeres	114	47	41.2
Hombres	36	18	50.0
Fumadores	30	11	36.7
No fumadores	120	54	45.0
Nordeste*	10	3	30.0
Noreste*	21	9	42.9
Centro*	9	7	77.8
Suroeste*	71	35	49.3
Sureste*	39	11	28.2
Faring. frec.	77	35	45.5
No faring.	73	30	41.2

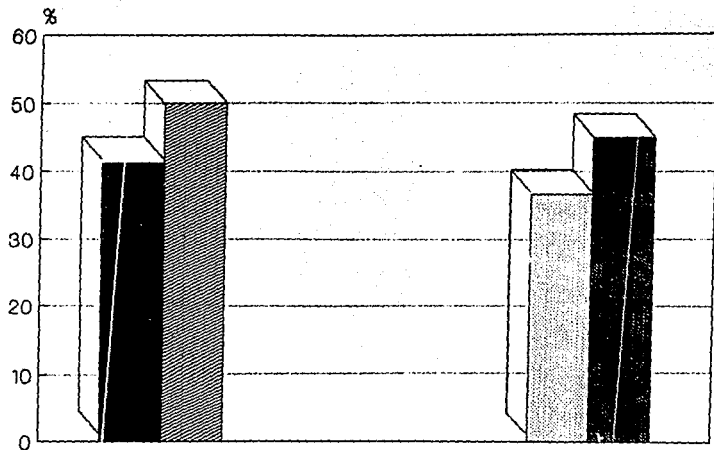
CLAVE: * = parte de la ciudad en la que tienen su domicilio,
 Faring. frec. = que padecieron 2 ó más cuadros faríngeos anuales durante los 2 últimos años, No faring. = que padecieron 1 ó ningún cuadro faríngeo anual durante los últimos 2 años.

**FRECUENCIA DE LOS ESTAFILOCOCOS
EN LA FARINGE DE INDIVIDUOS SANOS**



GRAFICA No. 1

FRECUENCIA DE *S. aureus* EN LA GARGANTA DE PERSONAS SANAS

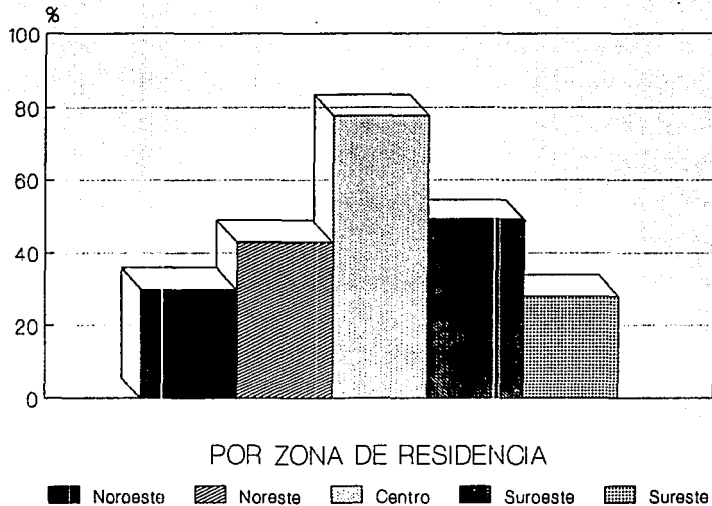


VARIABLES EPIDEMIOLOGICAS

■ MUJERES ▨ HOMBRES ▤ FUMADORES ■ NO FUMAD

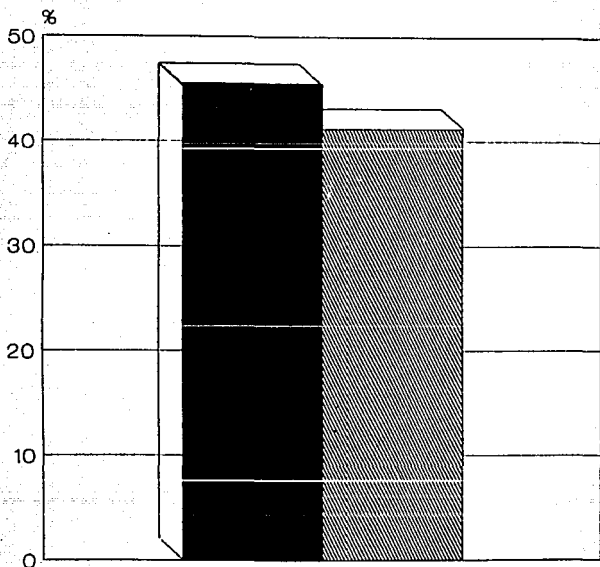
GRAFICA No. 2

FRECUENCIA DE *S. aureus* EN LA FARINGE DE PERSONAS SANAS



GRAFICA No. 3

FRECUENCIA DE *S. aureus* EN PERSONAS SANAS



SUSCEPTIBLES O NO DE FARINGITIS

■ FARING. FREC. ▨ NO FARING.

GRAFICA No. 4

DISCUSION

Como se puede observar en la Tabla 2, la frecuencia del género *Staphylococcus* en la faringe de las personas aparentemente sanas es muy elevada ($111/150 = 74 \%$). En relación a los ECN, las cifras indican que poco más de la mitad de los individuos ($79/150 = 52.67 \%$) se encuentra colonizada por estos microorganismos, lo cual no resulta extraño porque, en general, se acepta que ellos figuran entre los miembros más constantes de la flora habitual.

Por lo que respecta a *S. aureus*, los datos obtenidos sobre su presencia en la faringe de personas sanas ($65/150 = 43.33 \%$) reflejan la legitimidad de las controversias que existen dentro del equipo de salud sobre su patogenicidad en las vías respiratorias altas: como es sabido, la detección de esta especie en los exudados faríngeos de personas enfermas carece comúnmente de significado para numerosos médicos, quienes sólo la consideran como un integrante más de la flora habitual; en contraparte, la mayoría de los químicos clínicos le reconoce capacidad para ocasionar faringitis y/o amigdalitis, por lo cual la incluye en los reportes asociados a las muestras de las que la aísla e identifica.

En este problema, una posición intermedia es, al parecer, la más adecuada, dado que si bien puede observarse la

considerable frecuencia con la que *S. aureus* coloniza la garganta de los individuos sanos, no debe soslayarse su comprobada participación en los cuadros faríngeos de numerosos enfermos. Por ello, es preciso que el laboratorio continúe reportando su presencia en las muestras involucradas y que el médico instituya el tratamiento correspondiente, ya que aún en el caso de que esta bacteria no resulte la responsable de la afección, su erradicación resultará benéfica tanto para quienes sí pueden ser perjudicados por ella, después de adquirirla vía aérea a partir de las emisiones faríngeas asociadas a los estornudos y/o accesos tusígenos del paciente analizado, como para este último, puesto que se descartará el riesgo de que el microorganismo pueda acceder en el futuro a los senos paranasales o a las vías respiratorias bajas, en donde se ha demostrado su persistencia y peligrosidad, respectivamente.

Por lo que se refiere a las Tablas 3 y 4, es posible apreciar que la presencia de estafilococos no muestra afinidad por determinado sexo, a diferencia de lo que sucede con otros parámetros epidemiológicos analizados.

La frecuencia de ECN y *S. aureus* resultó mayor entre los no fumadores que en quienes practican el tabaquismo; este hecho, desde luego, debe analizarse separando a ambos grupos de microorganismos. Desde el punto de vista de los ECN, el

hallazgo sugiere que dicho hábito o costumbre altera la integridad de la flora faríngea -de la que estas bacterias se consideran miembros constantes- y si, además, se considera que el humo del cigarro muestra efectos paralizantes sobre vellos y cilios, independientemente de que irrita las mucosas del tracto respiratorio, es posible comprender las razones por las que el individuo fumador se encuentra menos protegido de las enfermedades respiratorias.

Por lo que respecta a *S. aureus*, podría pensarse que el tabaquismo neutraliza en algún grado su establecimiento en garganta; no obstante, es más probable que, una vez que haya ocurrido la colonización -dado que los resultados indican que ésta no es inhibida radicalmente-, el microorganismo ocasione enfermedades respiratorias porque el fumador presenta las alteraciones mencionadas anteriormente.

Los datos obtenidos en personas que padecieron frecuentes cuadros faríngeos en los últimos 3 años apoyan la hipótesis planteada puesto que, entre ellas, *S. aureus* se encontró en mayor grado que en las que no experimentaron constantemente este tipo de afecciones durante el lapso señalado (Tabla 4).

En cuanto a las zonas geográficas de la Ciudad, al parecer existe una mayor frecuencia de estafilococos en el Noreste. Centro y Suroeste, siendo muy notable la regularidad de la

especie *S. aureus* en la faringe de los individuos que habitan en ellas: 42.9, 77.8 y 49.3 %, respectivamente. A este respecto, sería muy interesante estudiar si estas cifras correlacionan con algunos indicadores de contaminación química en las zonas mencionadas.

En otro orden de ideas, es necesario recordar que las personas muestreadas se encontraban entre los 18 y 25 años de edad y que, por lo tanto, no se puede asegurar que los resultados obtenidos representen a toda la población de la Ciudad de México; no obstante, siendo éste un país en el que los jóvenes predominan, los análisis realizados pueden reflejar la problemática implicada en la interpretación que debe hacerse cuando se detecta a *S. aureus* en los exudados faríngeos de individuos que presentan cuadros patológicos en la garganta.

CONCLUSIONES

1. Los ECN forman parte de la flora faríngea en aproximadamente la mitad de los individuos sanos.
2. El número de portadores faríngeos de *S. aureus* asciende a cerca del 43 % de la población, pero ello no descarta la posibilidad de que participe en las patologías de faringe y amígdalas. Por tal motivo, el laboratorio debe reportar su hallazgo en los exudados faríngeos para que el médico intente su erradicación mediante el tratamiento correspondiente.
3. Las personas que practican el tabaquismo pueden resultar más susceptibles de contraer afecciones faríngeas, porque ese hábito altera mecanismos de defensa tales como la integridad de la flora habitual, entre algunos otros.
4. La presencia de *S. aureus* en la garganta podría favorecer los cuadros frecuentes de faringoamigdalitis, pues aquélla es mayor entre las personas que los presentan constantemente.
5. Resultaría interesante estudiar la probable influencia de las diferentes zonas geográficas de la Ciudad de México en la frecuencia de los cuadros faríngeos.

BIBLIOGRAFIA

1. Aliu B. and Bergdoll M. S.: Characterization of staphylococci from patients with toxic shock syndrome, *J Clin Microbiol*, 1988; 26(11): 2427-2428.
2. Al-Masaudi S. B., Day M. J. and Russell A. D.: Gene transfer in staphylococci: simulation and suppression by antibacterial agents, *Letters Appl Microbiol* 1991; 13: 1-2.
3. Almeida R. J. and Jorgensen J. H.: Use of Mueller-Hinton agar to determine novobiocin susceptibility of coagulase-negative staphylococci, *J Clin Microbiol*, 1982; 16(6): 1155-1156.
4. Bacterial pharyngitis, [editorial] *Lancet*, 1987; 1(8544): 1241-1242.
5. Balows A., Hausler W. J., Herrmann K. L., Isenberg H. D. and Shadomy H. J.
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
American Society for Microbiology, 5th. Edition
Washington D.C., 1991.

6. Bernard H. J.
DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO CLINICOS POR EL LABORATORIO,
Tomo II
Salvat Editores, 8a. Edición
Barcelona, 1990.
7. Boyce J. M., Lonks J. R., Medeiros A. A., Papa E. F. and
Campbell S.: Spurious oxacillin resistance in
Staphylococcus aureus because of defective oxacillin
disks, J Clin Microbiol, 1988; 26(7): 1425-1427.
8. Boyce J. M., Medeiros A. A. and Rimland D.: Detection and
treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*
resistant to penicillinase-resistant penicillins, J
Infect Dis, 1988; 157(3): 602-603.
9. Caputo G. M., Archer G. L., Calderwood S. B., Dinubile M.
J. and Karchmer A. W.: Native valve endocarditis due to
coagulase-negative staphylococci, Am J Med, 1987;
83:619-625.
10. Casewell M. N. and Hill R. L. R.: Mupirocin for
eradication of nasal carriage of staphylococci. Lancet,
1989; 1(8630): 154.
11. Centor R. M., Meirer F. A. and Dalton H. P.: Pharyngitis
and penicillin, An Intern Med. 1987; 107(3): 430.

12. Chambers H. F.: Coagulase-negative staphylococci resistant to β -lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a, *Antimicrob Agents Chemother*, 1987; 31(12): 1919-1924.
13. Christensson B., Boutonnier A., Ryding U. and Fournier J.M.: Diagnosing *Staphylococcus aureus* endocarditis by detecting antibodies against *S. aureus* capsular polysaccharide types 5 and 8, *J Infect Dis*, 1991; 163: 530-533.
14. Clyne M., Azavedo De J. and Carlson E.: Production of gamma-hemolysin and lack of production of alpha-hemolysin by *Staphylococcus aureus* strains associated with toxic shock syndrome, *J Clin Microbiol*, 1988; 26(3): 535-539.
15. Collingnon P.: Coagulase-negative staphylococcal bacteremia, *Ann Intern Med*, 1989; 110(11): 945-946.
16. Cookson B., Peters B., Webster M., Phillips I., Rahman M. and Noble W.: Staff carriage of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol*, 1989; 27(7): 1471-1476.
17. Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H.N. y Ginsberg H.S.
 TRATADO DE MICROBIOLOGIA
 Salvat Editores, 3a. Edición
 Barcelona, 1985.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

18. Dugdale D. C. and Ramsey P. G.: *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with Hickman catheters, *Am J Med*, 1990; 89: 137-141.
19. Etienne J., Brun Y., Solh N. E., Delorme V., Mouren C., Bes M. and Fleurette J.: Characterization of clinically significant isolates of *Staphylococcus epidermidis* from patients with endocarditis, *J Clin Microbiol*, 1988; 26(4): 613-617.
20. Faller A. and Schleifer K. H.: Modified oxidase and benzidine tests for separation of staphylococci from micrococci, *J Clin Microbiol*, 1981; 13(6): 1031-1035.
21. Fass R. J., Helsel V. L., Barnishan J. and Ayers L. W.: *In vitro* susceptibilities of four species of coagulasa-negative staphylococci, *Antimicrob Agents Chemother*, 1986; 30(4): 545-552.
22. Fidalgo S., Vazquez F., Mendoza M. C., Pérez F. and Méndez F. J.: Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features, *Rev Infect Dis*, 1990; 12(3): 520-528.
23. Freeman B. A.
MICROBIOLOGIA DE BURROWS
Interamericana, 22a. Edición
Madrid, 1986.

24. Freeman J., Platt R., Sidebottom D. G., Leclair J. M., Epstein M. F. and Goldmann D. A.: Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in the changing neonatal intensive care unit population, *JAMA*, 1987; 258(18): 2548-2552.
25. Gleckman R., DeVita J., Hibert D., Pelletier C. and Martin R.: Sputum Gram stain assessment in community-acquired bacteremic pneumonia: *J Clin Microbiol*, 1988; 26(5): 846-849.
26. Goldstein J., Schulman R., Kelley E., McKinley G. and Fung J.: Effect of different media on determination of novobiocin resistance for differentiation of coagulase-negative staphylococci, *J Clin Microbiol*, 1983; 18(3): 592-595.
27. Greenberg D. P., Bayer A. S., Turner D. and Ward J. I.: Antibody responses to protein A in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis, *J Clin Microbiol*, 1990; 28(3): 458-462.
28. Gruskay J., Harris M. C., Costarino A. T., Polin R. A. and Baumgart S.: Neonatal *Staphylococcus epidermidis* meningitis with unremarkable CSF examination results, *AJDC*, 1989; 143(5): 580-582.
29. Hackbarth C. J. and Chambers H. F.: Methicillin-resistant

- staphylococci: detection methods and treatment of infections, Antimicrob Agents Chemother, 1989; 33(7): 995-999.
30. Haley R. W.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: do we just have to live with it?, Ann Intern Med, 1991; 114(2): 162-164.
31. Hamoudi A. C. and Hribar M. M.: Evaluation of a direct identification method for *Staphylococcus aureus* from blood culture broth, J Clin Microbiol, 1988; 26(12): 1404-1405.
32. Harrington B. J. and Goydos J. M.: Five-hour novobiocin test for differentiation of coagulase-negative staphylococci, J Clin Microbiol, 1984; 19(2): 279-280.
33. Hebert G. A., Growder C. G., Hancock G. A. and Jarvin W. R.: Characteristic of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and other members of the family *Micrococcaceae*, J Clin Microbiol, 1988; 26(10): 1039-1049.
34. Herrmann M., Vaudaux P. E., Pittet D., Auckenthaler R., Lew P. D., Schumacher-Perdreau F., Peters G. and Waldvogel F. A.: Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcus isolates to foreign material, J Infect Dis. 1988; 158(4): 693-701.

35. Houvinen P., Lahtonen R., Ziegler T., Meurman O., Hakkarainen K., Miettinen A., Arstila P., Eskola J. and Saikku P.: Pharyngitis in adults: the presence and coexistence of viruses and bacterial organisms, Ann Intern Med, 1989; 110(8): 612-616.
36. Howard B. J., Klaas J., Weissfeld A.S., Rubin S.J. and Tilton R.C.
CLINICAL AND PATHOGENIC MICROBIOLOGY
The C.V. Mosby Company, 1st. Edition
Missouri, 1987.
37. Jawetz E., Melnick J. L., Adelberg E. A., Brooks G. F., Butel J. S. and Ornston L. N.
MICROBIOLOGIA MEDICA
El Manual Moderno S.A. de C.V., 13a. Edición
México, 1990.
38. Jinich H.
Academia Nacional de Medicina
TRATADO DE MEDICINA INTERNA, Volumen 1
El Manual Moderno S.A., 1a. Edición
México 1987.
39. Joklik W. K., Willett H. P. and Amos D. B.
MICROBIOLOGIA ZINSSER
Editorial Médica Panamericana, 18a. Edición
Buenos Aires, 1990.

40. Jousimies-Somer H. R., Savolainen S. and Ylikoski J. S.: Bacteriological findings of acute maxillary sinusitis in young adults, *J Clin Microbiol*, 1988; 26(10): 1919-1925.
41. Jousimies-Somer H. R., Savolainen S. and Ylikoski J. S.: Macroscopic purulence, leukocyte counts, and bacterial morphotypes in relation to culture findings for sinus secretions in acute maxillary sinusitis, *J Clin Microbiol*, 1988; 26(10): 1926-1933.
42. Kloos W. E. and Schleifer K. H.: Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species, *J Clin Microbiol*, 1975; 1(1): 82-88.
43. Koneman E. W.
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
Editorial Médica Panamericana, 1a. Edición
México, 1985.
44. Lachica R. V. F., Hoerich P. D. and Genigeorgis C.: Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods, *Appl Microbiol*, 1972; 23(1): 168-169.
45. Lee J. C., Liu M. J., Parsonnet J. and Arbeit R. D.: Expression of type 8 capsular polysaccharide and production of toxic shock syndrome toxin 1 are associated among vaginal isolates of *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol*, 1990; 28(12): 2612-2615.

46. Lehninger A. L.
BIOQUIMICA
Ediciones Omega S.A., 2a. Edición
Barcelona, 1990.
47. Lund G. C., Green D. W. and Ackerman N. B.: Elimination of *Staphylococcus aureus* carriage, *Ann Intern Med*, 1991; 114(11): 990-991.
48. Mac Faddin J. F.
PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA
Editorial Médica Panamericana, 1a. Edición
México 1990.
49. Marsik F. J. and Brake S.: Species identification and susceptibility to 17 antibiotics of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens, *J Clin Microbiol*. 1982; 15(4): 640-645.
50. Meyers B. R., Sherman E., Mendelson N. H. and Velásquez G.: Bloodstream infections in the elderly, *Am J Med*, 1989; 86: 379-384.
51. Menzies R. E., Cornere B. M. and MacCulloch D.: Cephalosporin susceptibility of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987; 31(1): 42-45.

52. Nahass R. G. and Gocke D. J.: Toxic shock syndrome associated with use of a nasal tampon, *Ann J Med*, 1988; 84(3): 629-631.
53. Opal S. M., Johnson-Winegar A. D. and Cross A. S.: Staphylococcal scalded skin syndrome in two immunocompetent adults caused by exfoliatin B-producing *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol*, 1988; 26(7): 1283-1286.
54. Peniche G. E., Garza V. R. y Castellanos Ch. N.: La reacción pseudoimmune y su aplicación en el diagnóstico de laboratorio de los padecimientos ocasionados por *S. aureus*, *Lab-acta*, 1990; 2(4): 39-41.
55. Pitts J.: Bacterial pharyngitis, *Lancet*, 1987; 2(8549): 45.
56. Plastic devices: new fields for old microbes, [editorial] *Lancet*, 1988; 1(8575-6): 30-31.
57. Quie P. G. and Belani K. K.: Coagulase-negative staphylococcal adherence and persistence, *J Infect Dis*, 1987; 156(4): 543-547.
58. Rahal J.J. and Muder R.R.: Resistant staphylococcal infections, *Ann Intern Med*, 1991; 114(10): 911-912.
59. Ratner H. B. and Stratton C. W.: Thermonuclease test for

same-day identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures, J Clin Microbiol, 1985; 21(6): 995-996.

60. Reiser R. F., Denzin L. K. and Bergdol M. S.: Effects of blood and different media on the production of toxic shock syndrome toxin I by *Staphylococcus aureus* in the tampon sac method, J Clin Microbiol, 1988; 26(12): 2672-2674.
61. Roberts J. I. S. and Gaston M. A.: Protein A and coagulase expression in epidemic and non-epidemic *Staphylococcus aureus*, J Clin Pathol, 1987; 40: 837-840.
62. Schaeffler S.: Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* resistant to quinolones, J Clin Microbiol, 1989; 27(2): 335-336.
63. Schaeffler S., Jones D., Perry W., Ruvinskaya L., Baradet T., Mayr E. and Wilson M. E.: Emergence of gentamicin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in New York City hospitals, J Clin Microbiol, 1981; 13(4): 754-759.
64. Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E. and Holt J. G. BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Volume 2 Williams and Wilkins, 1st. Edition Baltimore, 1984.

65. Stein J. H.
MEDICINA INTERNA, Tomo II
Salvat Editores, 2a. Edición
Barcelona, 1987.
66. Valenstein P. N.: Semiquantitation of bacteria in sputum
Gram stains, J Clin Microbiol, 1988; 26(9): 1791-1794.
67. Volk W. A. and Wheeler M. F.
BASIC MICROBIOLOGY
J. B. Lippincott Company, 4th. Edition
Philadelphia, 1980.
68. Wald E. R.: Toxic shock syndrome and staphylococcal
infection, J Infect Dis, 1991; 163(3): 678.
69. Winkler J., Block C., Leibovici L., Faktor J. and Pitlik
S. D.: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*:
correlation with hormonal status in woman, J Infect Dis,
1990; 162: 1400-1402.
70. Wlodaver C. G. and McNabb S. J. N.: MRSA in perspective,
Ann Intern Med, 1991; 114(8): 704-705.