



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



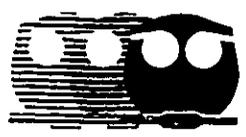
EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

FRECUENCIA DE ESPECIES DE ESTAFILOCOCOS EN DIVERSAS MUESTRAS CLINICAS Y SU COMPORTAMIENTO FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: MARIBEL MORALES GALISTEO

88 E F 62





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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Eida B. Peniche Quintana

Vocal: Prof. Ma. del Carmen Cortés Decuir

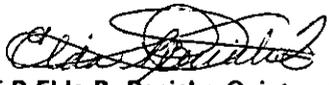
Secretario: Prof. Raúl Garza Velasco

1er. Suplente: Prof. Maite Astigarraga Zavaleta

2do. Suplente: Prof. Yolanda López Vidal

Sitio donde se desarrolló el tema: Cepario de la Facultad de Química.

Asesor:


Q.F.B Eida B. Peniche Quintana

Supervisor Técnico:


Biol. Luciano Hernández Gómez

Sustentante:


Maribel Morales Galisteo

AGRADECIMIENTOS

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

Instituto Nacional de Pediatría

Por su colaboración en el desarrollo del presente trabajo

Para aprender, no basta tener la capacidad para alcanzarlo, hace falta tener voluntad para lograrlo.

A mis padres

Carmen

y Raúl (Q.E.P.D.)

A mi tío

Gilberto (Q. E. P.D.)

A mis hermanos

Raúl e Israel

A mis amigos

Fabiola, Dulce, Miriam,

Adrián, Eiko y Patricia.

INDICE

Introducción	1
Objetivos	4
Capítulo I. Generalidades	5
Morfología y taxonomía	5
Composición química y antigénica	5
Afinidad tintoreal	9
Requerimientos nutricionales y medios de cultivo	9
Sustancias producidas	11
Enzimas estafilocócicas	16
Capítulo II. Importancia del Género <i>Staphylococcus</i> en salud pública	22
Enfermedades asociadas	22
Factores predisponentes para adquirir enfermedades por estafilococos	24
Factores exógenos	30
Factores endógenos	36
Impacto nosocomial	41
Capítulo III. Comportamiento frente los antimicrobianos	45
Cepas meticilina resistentes	46
Distintos mecanismos de resistencia bacteriana	47

Capítulo IV. Parte Experimental

Material de uso común en el laboratorio	55
Equipos	56
Material biológico	57
Medios de cultivos y reactivos	58
Metodología	61
Capítulo V. Resultados	67
Capítulo VI. Discusión	78
Conclusiones	92
Anexo 1	95
Anexo 2	106
Bibliografía	108

Introducción.

Los estafilococos se encuentran entre las bacterias patógenas más importantes para el humano. En la actualidad se han aceptado ya varias especies de *Staphylococcus* como causantes de enfermedades en el humano, aunque son dos las que se consideran las más frecuentes: una, *S. aureus*, que es productora de coagulasa, tradicionalmente es la especie más estudiada y de la que se han descrito diversos factores de virulencia; la otra, *S. epidermidis*, que no produce coagulasa y que se consideraba como integrante inocuo de la flora habitual de la piel y membranas mucosas.

Se pueden encontrar a los estafilococos en otros sitios anatómicos como son: orofaringe, tracto gastrointestinal y tracto urogenital. También es común la colonización de los recién nacidos en el muñón umbilical, superficie cutánea y el área perineal (3,4,28,45).

Actualmente se conocen más de 20 especies que no coagulan el plasma y que se denominan genéricamente, como *Staphylococcus* coagulasa negativa (ECN); algunas de ellas se pueden encontrar en el humano como parte de su flora habitual y/o como agentes etiológicos relacionados con algún proceso infeccioso, sobre todo en pacientes que cuenten con algunos factores predisponentes, como la inserción de catéteres y prótesis (por mencionar algunos), aunque las vías de transmisión y entrada también influyen en su patogenicidad.

En el trabajo de laboratorio rutinario, no se le da importancia al aislamiento de ECN ya que se les considera como contaminantes de las muestras clínicas como ya se ha mencionado son de flora habitual y pueden ser saprofitos con "bajo potencial patógeno"; en la actualidad, es ya conveniente cambiar esta forma de considerarlos pues se ha demostrado que pueden ocasionar algunas enfermedades como furúnculosis endocarditis, uretritis, conjuntivitis y otitis así como infecciones cutáneas y en el sitio de entrada de catéter, de las prótesis de válvula mitral así como cualquier otro dispositivo protésico (2,11,28,31,32,33,48,54,58,61).

Puesto que los estafilococos tienen una distribución ubicua, la diseminación de las bacterias resulta fácil, siendo comúnmente responsables de muchas infecciones adquiridas en el hospital que derivan en serias enfermedades y que son el resultado de la contaminación de un sitio quirúrgico por los microorganismos provenientes de la piel del mismo paciente, de su nasofaringe o del personal del hospital (2,6,26,45,64).

En el presente trabajo, con objeto de conocer qué especies del género *Staphylococcus* que no coagulan el plasma se presenta se realizó un estudio en algunos pacientes de tres instituciones hospitalarias (INER, INNSZ y el INP), se estudiaron 350 cepas de pacientes con procesos infecciosos. La identificación se hizo con las pruebas más representativas del esquema de Kloss y Bannerman (37); posteriormente, con un antibiograma se confirmó lo señalado en la literatura, que los estafilococos coagulasa negativa identificados en los aislamientos asociados a los nosocomios son resistentes a múltiples antibióticos, incluidas ya la meticilina y la vancomicina, lo cual -, no hay duda- constituye un

sumamente serio que obligará a la búsqueda de nuevas alternativas para la ,
antibioticoterapia.

Objetivos.

Objetivo general.

Determinar qué especies *Staphylococcus* coagulasa negativa están presentes en el ámbito hospitalario.

Objetivos específicos.

Establecer si las cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa aisladas de las muestras clínicas son los posibles agentes etiológicos o forman parte de la flora normal.

Evaluar la sensibilidad a los diferentes antimicrobianos que presentan las cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa aisladas de material clínico procedente de tres instituciones hospitalarias.

Capítulo I. Generalidades.

Taxonomía y Morfología.

La familia *Micrococcaceae* consta de cuatro géneros: *Planococcus*, *Stomatococcus*, *Micrococcus* y *Staphylococcus* (4,47).

Staphylococcus son cocos Gram positivos. Se trata de células esféricas con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm y se agrupan en pares, tetradas e inclusive cadenas cortas (de tres a cuatro células), la forma más frecuente de agrupación es en acúmulos irregulares semejando racimos de uvas aunque también pueden presentarse cocos aislados. Además, no poseen flagelos, ni esporas y sólo algunas especies pueden ser capsuladas (4).

Composición química y antigénica.

Los diferentes componentes de la pared del género *Staphylococcus* se resumen en la figura A.

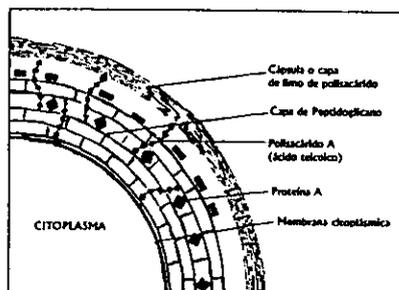


Figura A

La membrana citoplásmica es un complejo de proteínas, lípidos y una pequeña cantidad de carbohidratos, que forman una barrera osmótica para las células y proporcionan un sitio de anclaje para las enzimas biosintéticas y respiratorias celulares (47).

La capa de peptidoglicano, compuesto de cadenas de glicano entrecruzadas con péptidos, es el principal componente estructural de la pared celular estafilocócica. Las cadenas de glicano están constituidas por aproximadamente 10 a 12 subunidades alternas de ácido-N-acetilmurámico (NacMur) y N-acetilglucosamina (NacGlu). Las cadenas laterales tetrapeptídicas verticales (L-alanina, D-Glutamina, L-lisina y D-alanina) están unidas a las subunidades de ácido-N-acetilmurámico y las cadenas de glicano están entrecruzadas a su vez por puentes intrapeptídicos diagonales, como se muestra en la figura B. Esta capa puede atraer a los leucocitos polimorfonucleares (4,44,67,70).

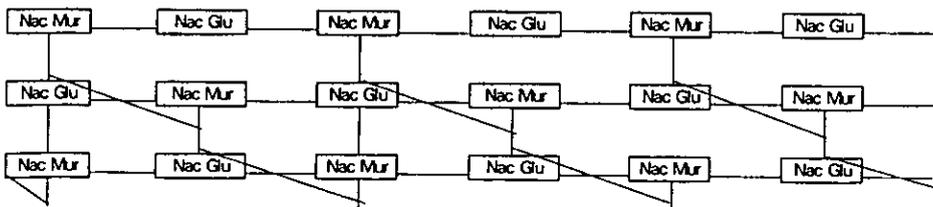


Fig B. La capa de peptidoglicano.

Los ácidos teicoicos son polisacáridos complejos, que contienen fosfatos unidos a la capa de peptidoglicano y a la membrana citoplásmica. Los ácidos teicoicos de la pared celular habitualmente contienen ribitol y en ocasiones glicerol y están unidos de forma covalente al peptidoglicano a través de grupos

fosfodiéster sustituido en el C-6 de los residuos de NacMur. Los ácidos de la membrana o lipoteicoicos son polímeros de glicerofosfato que terminan en glucolípido, el cual está fijado en la membrana citoplasmática. Los ácidos teicoicos están modificados de forma específica por el agregado a las unidades poli-ol de D-alanina unidos a galactosa y glucosa mediante enlaces O-glicosídicos. Los ácidos teicoicos sustituidos son importantes como antígenos específicos de superficie de especies de *Staphylococcus*. En la mayoría de las cepas de *S. aureus* de origen humano los ácidos teicoicos de su pared celular contienen ribitol unido a galactosamina -o glucosamina- denominado polisacárido A. Mientras que en *Staphylococcus epidermidis* y los otros estafilococos coagulasa negativa (ENC), es glicerol unido a glucosa y se denomina polisacárido B (70). Los ácidos teicoicos regulan la concentración catiónica en la membrana celular y en los estafilococos patógenos son receptores para bacteriófagos. La adherencia de los estafilococos a las superficies mucosas está mediada también por los ácidos teicoicos en su unión específica con la fibronectina.

Aunque los ácidos teicoicos son malos inmunógenos, sí estimulan una respuesta de anticuerpos cuando se unen al peptidoglicano (4,37,70).

La superficie de la mayoría de las cepas de *S. aureus* (pero no la de los estafilococos coagulasa negativa) está uniformemente rodeada por proteína A. Esta proteína se encuentra unida de forma covalente a la capa de peptidoglicano y tiene afinidad peculiar por el receptor Fc de las inmunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG4 con lo que evade al sistema inmunitario. La proteína extracelular se une también a las inmunoglobulinas, formando inmunocomplejos con consumo consiguiente de complemento (4,37,47,62,70).

La proteína A es un antígeno específico de las cepas de *S. aureus*. Un 90% de la proteína se encuentra en la pared celular unida al peptidoglucano por enlace covalente. Tiene una variedad de efectos biológicos por ser quimiotáctica, anticomplementaria y antifagocítica y genera reacciones de hipersensibilidad y lesión a las plaquetas. Es mitogénica y potencia la actividad destructora natural de los linfocitos T (47).

La superficie externa de la mayoría de las cepas de *S. aureus* contiene factor de aglutinación, antiguamente llamado coagulasa unida o ligada, esta proteína se une al fibrinógeno y puede hacer que *S. aureus* forme grumos o se agreguen las células entre sí (38,47).

En ocasiones, se observa una cápsula de naturaleza polisacárida en los estafilococos. Esta protege a las bacterias mediante inhibición de la quimiotaxis evitando la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares y la proliferación de las células mononucleares después de la exposición a mitógenos. También facilita la adherencia de las bacterias a los catéteres y a los dispositivos médicos que están constituidos por materiales sintéticos como silicón, poliuretano, cloruro de polivinil, etileno vinil, acetato, polietileno, acero inoxidable, titanio y aleaciones de titanio-aluminio, los más frecuentes son válvulas y articulaciones protésicas y catéteres e injertos así como cánulas de Hickman. Esta capacidad de adherirse tiene importancia para los estafilococos coagulasa negativa pues de esta manera contaminan los dispositivos y dañan al hospedero (4,8,11,15,20,27,30,32,47,53).

Afinidad Tintoreal.

La estructura de la pared celular estafilocócica es la responsable de retener el complejo cristal violeta-yodo-ribonucleato de magnesio, como ya se ha mencionado la pared celular tiene un mayor contenido de peptidoglucano y con numerosos enlaces transversales entre las cadenas de N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina, no pierden dicho complejo al ser tratadas con alcohol-acetona. Se ha supuesto que la permeabilidad de la pared celular disminuya el efecto de deshidratación al entrar en contacto con el decolorante por el bajo contenido de ácidos lipoteicoicos. Esta propiedad tintoreal permite determinar en el examen microscópico su morfología y la Gram positividad (4,47,35,67).

Requerimientos Nutricionales.

Los microorganismos del género *Staphylococcus* crecen en medios de cultivo ordinarios, tan sólo requieren en especial de cloruro de sodio (NaCl) al 8% ó 10%, razón por la cual se denominan halófilos extremos ya que poseen mecanismos fisiológicos para tolerar las concentraciones elevadas de sal. Estas adaptaciones fisiológicas son muy importantes, por el hecho de que este género se desarrolla en la piel del humano en donde la concentración de sal es algo elevada. También requieren de ácido nicotínico y tiamina, estas vitaminas las obtienen de los medios de cultivo naturales (4,47,64).

En la mayoría de los laboratorios se utiliza agar sangre como medio para el aislamiento primario por ser muy enriquecido; además, se pueden detectar los estafilococos hemolíticos al poner de manifiesto las hemolisinas estafilocóccicas como alfa (α), beta (β), gamma (γ) ó delta (δ). Estas hemolisinas son sintetizadas básicamente por estafilococos coagulasa positivos (4,33,35,65).

Tomando en cuenta la capacidad halófila, existen medios selectivos para los estafilococos como son: agar para estafilococos No. 110 que es altamente selectivo debido a que contiene 7.5% de NaCl; agar sal manitol, que además de NaCl tiene adicionado manitol, mismo que algunos estafilococos tiene la capacidad de fermentar (lo cual se puede visualizar por el vire del indicador rojo de fenol). Existen también el agar Vogel Johnson y el agar Baird Parker (agar glicina piruvato telurito yema de huevo), en los que el telurito de potasio adicionado al 1% actúa como agente inhibidor de la gran mayoría de los microorganismos, no así de *Staphylococcus* que tiene la capacidad de resistir la actividad reductiva de dicha sal (4,34).

Su desarrollo óptimo es de 30 a 37 °C en condiciones de aerobiosis, sin embargo estos microorganismos pueden crecer entre 18 y 40 °C. Este género tiene la capacidad de ser facultativo, con la excepción de una especie, *S. saprophyticus*, que es anaerobio (4).

Sustancias Producidas.

Toxinas.

S. aureus (el miembro más virulento y mejor conocido del género) produce un gran número de factores de virulencia que incluyen enzimas y por lo menos cinco toxinas citolíticas para las membranas, α , β , γ , δ y leucocidina, así como la toxina exfoliativa, toxina I del síndrome de choque tóxico y cinco tipos de enterotoxina (4,31,44, 47).

La α -hemolisina (α -toxina) muestra una amplia gama de actividades biológicas aparte de los efectos hemolíticos, como daño a los macrófagos y a las plaquetas, lesión del sistema circulatorio y del tejido de la corteza renal. Ninguna otra toxina bacteriana es tan versátil en sus efectos. La toxina se inserta en regiones hidrofóbicas de la membrana celular con la alteración subsiguiente de la integridad de la membrana. Se cree que la α -toxina es un mediador importante en la lesión tisular después del establecimiento de un foco de infección (11,12,30). Actúa sobre hematíes de conejo, carnero y humanos y es la principal presente en las cepas que afectan al humano. Además, todas las hemolisinas producen una zona amplia y clara por la destrucción total de los eritrocitos (4,33,35,47,65). La α -hemolisina y la leucocidina sintetizadas por *S. aureus* se encuentran entre las mejores caracterizadas en sus propiedades químicas y biológicas.

proteína termolábil que produce lisis en diversas células, incluyendo hematíes, leucocitos, macrófagos y fibroblastos. Cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana en las células susceptibles. Se cree que la β toxina, junto con la α , son responsables de la destrucción tisular y de la formación de abscesos, características de las enfermedades estafilocócicas y de la capacidad de *S. aureus* para proliferar en presencia de una respuesta inflamatoria vigorosa (33,64). La β -hemolisina produce una zona angosta de hemólisis, es rara vez aislada del humano, básicamente está presente en cepas de bovinos (33,65).

La δ -hemolisina (δ -toxina) es una proteína heterogénea y termoestable cuyas propiedades de detergente son responsables de sus efectos lesivos sobre la membrana. La δ -hemolisina también modifica las funciones de los leucocitos polimorfonucleares (PNM) y el metabolismo del factor activador de plaquetas (FAP). Estos efectos proinflamatorios son el resultado de incrementar: 1) el flujo de ión calcio (Ca^{2+}), 2) la generación de radicales de oxígeno y 3) la activación de acetiltransferasa, la que conduce a la formación de un potente mediador lipídico, el factor activador de plaquetas (FAP), (11,12). La δ -hemolisina tiene actividad sobre eritrocitos de muchos mamíferos, también es producida por la mayoría de las cepas que afectan al humano, generalmente las cepas de *S. aureus* producen la combinación de la α y δ hemolisinas (4,47).

La γ -hemolisina (γ -toxina) posee una pronunciada actividad hemolítica aunque se desconoce su mecanismo de acción. Consiste de dos componentes proteicos que actúan de forma sinérgica, los cuales son esenciales para la hemólisis y la toxicidad. La γ -hemolisina se sabe que actúa sobre eritrocitos de

humano, conejo y carnero, así como sobre las células linfoblásticas humanas, aunque no hay información detallada sobre ella (47).

Leucocidina Ponton-Valentine producida por muchos estafilococos patógenos, lesiona a los leucocitos polimorfonucleares (PNF) y a los macrófagos pero no a otros tipos de células. Esta toxina tiene un componente proteico F y otro S que actúan de manera sinérgica para provocar cambios estructurales de la membrana celular, formación de poros y aumento de permeabilidad. Las bacterias que la producen muestran mayor resistencia a la fagocitosis (4,30,35,47).

La mayoría de las cepas de *S. aureus* que se asocian con el Síndrome Estafilocócico de Piel Escaldada (SEPE) pertenecen al grupo de fagos II. Se ha identificado la toxina exfoliativa (conocida también como exfoliatina o toxina epidermolítica), que se subdivide en la toxina exfoliativa A (ETA) y toxina exfoliativa B (ETB), las dos formas con diferencias exclusivamente desde el punto de vista inmunológico y bioquímico. El gen para ETA es cromosómico, mientras que el gen para ETB reside en una familia de plásmidos (4,47,33,35).

Los estudios ultraestructurales han demostrado que la exposición a la toxina provoca división de los puentes intercelulares en la capa granulosa de la epidermis externa. Las toxinas no se asocian con citolisis o inflamación. Tras la exposición a la toxina aparecen anticuerpos para disminuir el proceso tóxico. El SEPE se observa en niños pequeños y rara vez afecta a niños mayores o adultos, lo que quizá se debe a la presencia de un alto título de anticuerpos

(inmunoglobulinas de clase IgG) o a insensibilidad de la epidermidis adulta frente a la toxina (47).

El síndrome de choque tóxico, caracterizado por fiebre, hipotensión, exantema seguido de descamación y afectación de múltiples sistemas orgánicos, está mediado por una toxina. Al parecer esta toxina está asociada a cepas que contienen fagos del grupo I. La toxina I del síndrome de choque tóxico (TISST), llamada antes exotoxina C pirogénica y enterotoxina F, es una exotoxina secretada durante el crecimiento de cepas *S. aureus*, está comprometida la toxina en la mayor parte de los casos asociados con el período de menstruación o dentro de los cuatro días posteriores a ella; se relaciona con el uso de tampones superabsorbentes, es una exotoxina de 22 Kda con diversos y pronunciados efectos inmunológicos. Estos incluyen la inducción de expresión de receptores para la interleucina 2 (IL-2), síntesis de interleucina 1 (IL-1), proliferación de células T y la estimulación de síntesis IL-1 por los monocitos del humano (33,35,47).

Algunas cepas de *S. aureus* sintetizan sustancias denominadas estafilococcina y micrococcina las cuales son agentes bacteriostáticos y/o bactericidas para otras especies del género *Staphylococcus* u otras bacterias. Estas cepas transportan determinantes genéticos extracromosómicos y la producción está limitada a las cepas de fagos del grupo II de *S. aureus* y varía cuantitativamente con la cepa y condiciones de crecimiento. La estafilococcina es una proteína termoestable y es fagoespecífica (4,70).

Enterotoxina.

Se han descrito cinco enterotoxinas estafilocócicas distintas desde el punto de vista inmunológico (A-E). Las enterotoxinas son resistentes a la acción hidrolítica de las enzimas gástricas y yeyunales y se muestran estables al calentamiento hasta 100 °C durante 30 minutos (4,44,47).

Estas enterotoxinas se encuentran en *S. aureus* y entre 30% a 50 % de las cepas producen alguna enterotoxina. Están asociadas principalmente con fagos del grupo III. La enterotoxina A es la que se asocia más frecuentemente con la intoxicación alimentaria. Las C y D se encuentran en productos lácteos contaminados y la B está relacionada con la enterocolitis pseudomembranosa estafilocócica. No se conoce el mecanismo de acción de las enterotoxinas, puesto que no se dispone de un modelo animal satisfactorio. Las enterotoxinas estimulan la interleucina II-1, el peristaltismo intestinal y tienen efecto sobre el sistema nervioso central, que se manifiesta con vómitos intensos asociados a daño gastrointestinal (4,33,47,70).

Enzimas Estafilocóccicas

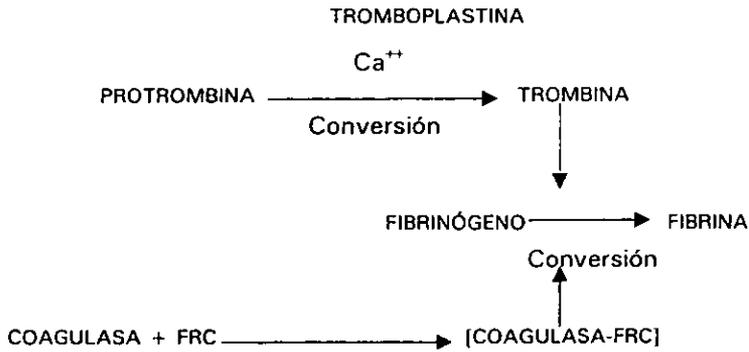
Coagulasa.

Entre las especies patógenas al humano que producen la enzima coagulasa se encuentran *S. aureus* y *S. schleiferi subsp coagulans* así pues, todas las demás especies del género se conocen habitualmente como estafilococos coagulasa negativa (ENC). Tratándose de la medicina veterinaria, se ha encontrado que *S. intermedius* y *S. hyicus variable*, son también capaces de sintetizar coagulasa (4,47,33,35).

Existe el llamado factor de aglutinación, que está unido a la pared celular estafilocóccica, puede convertir directamente el fibrinógeno en fibrina insoluble y hacer que *Staphylococcus* forme trombos (pequeños coágulos), cuando se pone en contacto con plasma, este factor está presente en un número no grande de cepas.

En el caso de la coagulasa, ésta se libera al medio donde se encuentra *S. aureus* combinándose con un factor plasmático globulínico denominado factor de reacción de la coagulasa (FRC), para formar un compuesto similar a la trombina, la estafilotrombina, que cataliza la conversión del fibrinógeno en fibrina insoluble. La coagulasa se usa como marcador de virulencia para *S. aureus*, puesto que la enzima puede provocar la formación de una capa de fibrina alrededor de lesiones (abscesos) estafilocóccicas, localiza la infección y protege a los microorganismos de la fagocitosis y de la destrucción dentro de las células

fagocitarias. A continuación se presenta el diagrama en el cual se muestra el mecanismo asociado a la enzima estafilocócica (4,47).



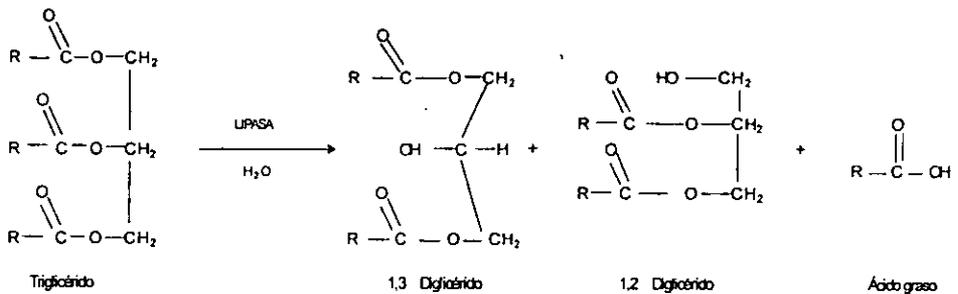
Catalasa.

Todos los estafilococos tanto patógenos como no patógenos producen catalasa, una enzima protectora que cataliza la destrucción del peróxido de hidrógeno tóxico que se acumula durante el metabolismo bacteriano y se libera después de la fagocitosis, para convertirse en agua y oxígeno por la acción de dicha enzima. La reacción es catalizada por la catalasa (4,47,35,63). A continuación se muestra dicha reacción.



Lipasas.

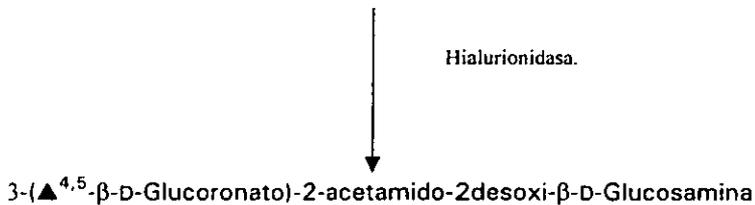
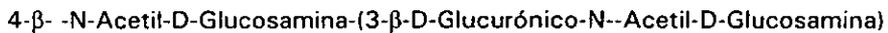
Todas las cepas de *S. aureus* y más del 30 % de los estafilococos coagulasa negativa producen varias enzimas lipídicas hidrolizantes, que de manera colectiva se denominan lipasas (47). El mecanismo asociado a la enzima estafilocócica se muestra en a continuación.



Las lipasas contribuyen a la supervivencia y a la intensa colonización de los estafilococos, son activas sobre varios substratos, sobre los que tienen gran afinidad, entre ellos el plasma y las grasas y aceites que se acumulan en la superficie del hospedero proveniente de las glándulas sebáceas del cuerpo. La utilización de estos materiales permite que los estafilococos sobrevivan sin dificultad y explica la intensa invasión de los tejidos cutáneos y subcutáneos y la formación de infecciones cutáneas superficiales (p.ej. furúnculos y abscesos) (44,47).

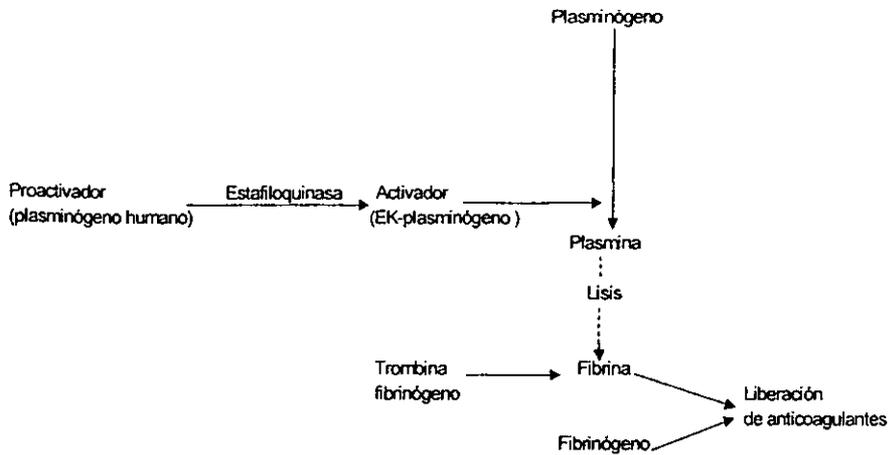
Hialuronidasa.

Más del 90% de las cepas de *S. aureus* producen hialuronidasa. Esta enzima hidroliza el ácido hialurónico o mucopolisáridos presentes en la matriz celular del tejido conectivo facilitando así la diseminación del microorganismo (35,47,69). A continuación se muestra la reacción.



Fibrinolisisina.

Esta enzima, llamada también estafiloquinasa, es producida por los estafilococos patógenos. Su actividad fibrinolítica se manifiesta al desintegrarse los coágulos de fibrina, porque activa el plasminógeno produciendo la plasmina que es propiamente la responsable de la licuefacción del coágulo (4,35). En el siguiente esquema se muestra la secuencia de fibrinólisis.



DNAsa.

Esta enzima denominada también nucleasa es una fosfodiesterasa con propiedades endonucleolíticas y exonucleolíticas que pueden desunir las hebras de ADN y ARN formándose el 3´ fosfomononucleótido (4,47).

Algunas especies de *Staphylococcus* pueden elaborar una nucleasa termo resistente (termoestable) y/o una nucleasa termolábil (4,69).

La DNAsa termoestable mantiene su actividad biológica después de haber sido expuesta a una temperatura de 90 a 100 °C. Es un indicador para la detección de *S. aureus* tanto en la industria alimentaria y farmacéutica, como en el laboratorio clínico (4,16).

S. aureus no es la única especie de importancia en el humano que sintetiza ambas nucleasas, sino que también está la especie *S. shleiferi* y de interés en medicina veterinaria tenemos a *S. intermedius* y *S. hyicus* (4).

Capítulo II. Importancia del género *Staphylococcus* en salud pública.

Durante la última década se han reconocido a los estafilococos como patógenos oportunistas dada su ubicuidad, causando con ello brotes de enfermedades intrahospitalarias, mismas que han incrementado a las septicemias nosocomiales a causa de las infecciones que ocasionan estos microorganismos (20,28,31,33,42,52,59).

Las especies asociadas más frecuentemente con infecciones humanas son *S. aureus* (el miembro más virulento y mejor conocido del género), *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. auricularis*, *S. capitis* y *S. caprae*. Las especies menos frecuentes como foco de infección son *S. cohnii*, *S. xilosus*, *S. simulans*, *S. capitis subsp capitis* y *S. cohnii subsp cohnii* (3,59).

Los estafilococos coagulasa negativa forman parte de la flora normal de las membranas mucosas y de la piel. Por ende, estas bacterias se aíslan frecuentemente en los laboratorios de microbiología clínica (3,31,54,57).

Enfermedades Asociadas.

S. epidermidis y los demás estafilococos coagulasa negativa relacionados, infectan válvulas naturales por inoculación de microorganismos en una estructura dañada (p.ej. malformaciones cardíacas, cardiopatía reumática). Las endocarditis

que con mayor frecuencia causan los estafilococos es por contaminación de válvulas artificiales. Los microorganismos se introducen en el momento de la cirugía y la infección se caracteriza por un curso sin dolor, aunque puede afectar la propia válvula, es más común en el lugar donde la válvula se sutura al tejido cardíaco. Así pues, la infección con formación de abscesos puede conducir a la separación de la válvula en la línea de sutura, con insuficiencia cardíaca mecánica. La embolia séptica y la septicemia persistente, son menos comunes en la endocarditis estafilocócica de válvulas protésicas que en otras formas de endocarditis, debido a la naturaleza y localización de las infecciones. Esta enfermedad también es causada por el uso de drogas intravenosas en pacientes de edad avanzada (2,9,31,34,42,64).

En estos últimos cinco años, el 45% a 65 % de todas las infecciones de dispositivos protésicos y catéteres han sido causadas por estafilococos coagulasa negativa. Esta complicación se ha convertido en un problema importante por la introducción de catéteres permanentes para alimentación, para cambio ambulatorio continuo de diálisis (CACD) y para el tratamiento de pacientes críticos. En general, se observa septicemia persistente, puesto que los microorganismos tienen acceso continuo al torrente sanguíneo. Los pacientes con enfermedad de larga evolución pueden desarrollar glomerulonefritis (28,30,59).

Las infecciones de las prótesis articulares, en particular la de las caderas, ocasionan el fracaso mecánico (2).

Las infecciones que se presentan en pacientes (CACD) ocasionan peritonitis (26,59,60).

Se considera a los estafilococos coagulasa negativa —entre los cocos Gram positivos— como los segundos microorganismos en infectar el tracto urogenital, puesto que *Escherichia coli* es el primero con un mayor porcentaje sobre todo en la mujer, debido a los cambios hormonales así como a las fluctuaciones del pH vaginal (51,55).

Se sabe de un caso de adenitis cervical causada por *S. epidermidis* en una niña inmunocomprometida (CACD) (21).

Factores predisponentes para adquirir enfermedades por estafilococos coagulasa negativa.

Edad

La defensa óptima del hospedero en la superficie mucosa depende de la respuesta inmunitaria de la mucosa intacta y de las funciones protectoras no inmunitarias.

La función del sistema inmunitario de las mucosas, es evitar la entrada de microorganismos patógenos a través del sistema de inmunidad mediada por células (IMC). Aparte de esto, el sistema inmunitario de las mucosas contiene linfocitos T reguladores que disminuyen la respuesta sistémica hacia los antígenos que rompen la barrera de las mucosas (63).

La desnutrición es una causa frecuente de deficiencia inmunitaria, con efectos en particular, en IMC y sistema de complemento. Una deficiencia inmunitaria podría volver a la persona inmunocomprometida.

La colonización del infante por los estafilococos tiene lugar pocos días después de su nacimiento debido a la deficiencia de inmunoglobulinas de la clase

IgG, junto con la disminución del complemento provocan opsonización deficiente en el recién nacido, pero a causa de los anticuerpos recibidos de manera pasiva a través de la placenta la tasa de colonización disminuye durante los dos primeros años de vida (1,2,8).

La infección por *S. aureus* es la más común en los infantes y se presenta en el muñón umbilical, en la superficie cutánea y en el área perineal, aunque no quedan exentos de provocarla también los estafilococos coagulasa negativa que pueden hasta originar septicemias en niños inmunocomprometidos, sobre todo en la unidad de terapia intensiva (UTI) por nacimiento prematuro con desnutrición debido a que en neonatos graves se favorece la colonización orofaríngea por el nivel bajo de inmunoglobulinas de tipo IgG e IgM (4,47,30,62).

En las células fagocíticas de los ancianos hay una notable disminución en el número de leucocitos que predomina en el torrente sanguíneo; durante la fase inicial de la infección predominan los neutrófilos, en este tiempo son las células fagocíticas más activas. Sin embargo, como continúa el proceso de infección se activan los macrófagos, y éstos fagocitan a las bacterias vivas y muertas (62,64).

Además, se considera que en los ancianos las células T han disminuido la secreción de mediadores solubles (citocinas e interferones) que, en conjunto con otros mediadores secretados por otras células, modulan la respuesta inmune. La interleucina IL-10 induce la proliferación de anticuerpo dependientes de linfocitos T. La interleucina IL-12 secretada por los linfocitos B, macrófagos y mastocitos, activa la síntesis de interferón—y el cual tiene múltiples efectos, entre ellos la activación de macrófagos.

Los ancianos y los pacientes inmunocomprometidos son más susceptibles que los jóvenes y adultos a desarrollar enfermedades infecciosas de gravedad creciente y están en más riesgo de desarrollar cáncer y enfermedades autoinmunitarias. Una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad en esta población es la infección causada por el género *Staphylococcus* (4,47,31,56,59).

Depósitos férricos.

La mayoría de los adultos hospitalizados se someten a la extracción de sangre con fines diagnósticos. Los pacientes con problemas complejos que requieren determinaciones frecuentes de los gases sanguíneos y hemocultivos repetidos, experimentan pérdidas hemáticas con la consecuente movilización de depósitos férricos (51). El hierro es el constituyente básico de formas funcionales como son la hemoglobina, mioglobina, citocromos, transferrina y de formas de almacenaje (ferritina y hemosiderina). La deficiencia es más frecuente, debido a un aumento en su requerimiento (como en lactantes, niños, embarazo) o cuando se presenta una pérdida mayor (menstruación, lactancia, hemorragias)

En la sangre, el hierro es transportado por una proteína llamada transferrina, que ingresa en el citoplasma por endocitosis después de interactuar con un receptor específico para la transferrina localizado en la membrana plásmica de la célula (cada molécula puede acumular hasta un máximo de unos 4,000 átomos de hierro) (8,14). Además, la ferritina es la principal forma de hierro que entra en la célula, convirtiéndose en el sustrato para la elaboración

de hemoglobina (14). Cuando aumenta la concentración de hierro en el citosol, el número de receptores disminuye debido a que el ARNm que codifica a esos receptores es degradado por una nucleasa específica. En este mecanismo regulatorio interviene la aconitasa que reconoce una señal ubicada en el extremo 3' del ARNm, cuando la concentración de hierro es baja, la aconitasa se combina con la señal, lo cual desactiva a la nucleasa.(9).

Ambos, *S. aureus* y *S. epidermidis*, reconocen el receptor específico de la transferrina, captan así hierro mediante la vía receptor-mediado por un sidéforo (45).

El mecanismo bacteriano férrico elabora una molécula denominada sidéforo, la cual tiene afinidad por el ión fierro que se encuentra en las proteínas ya mencionadas, así como las enzimas que contienen hierro, como la catalasa, peroxidasa, citocromos y citocromos-peroxidasa (16,45,64).

Sexo.

El género femenino es el más susceptible a adquirir infecciones estafilocócicas que cursan de manera asintomática. Algunos factores que predisponen a la infección, principalmente son los métodos empleados para el control natal, el período menstrual y, en general, la gran actividad hormonal (4,47,55).

Se han asociado estas infecciones con el período menstrual de la mujer sexualmente activa. La especie que con mayor frecuencia coloniza el tracto urogenital es *S. saprophyticus* (42% de casos) que presenta tropismo por el

epitelio que tapiza este sitio anatómico comprometiendo principalmente el tracto superior. También *S. haemolyticus* se ha visto que puede ocasionar infección en el tracto urinario (4,36,55).

Al parecer, si la mujer presenta un cuadro de candidiasis puede causar alteraciones en el microambiente de la vagina con lo que se incrementa la posibilidad de que colonice *S. saprophyticus* (47,55).

Se ha determinado que *S. klossi*, *S. cohnii* y *S. xylosus* pueden colonizar igualmente, aunque con poca frecuencia se han aislado en infecciones del tracto genital.

En la colonización de este sitio anatómico influye el mecanismo bacteriano del hierro ya mencionado, puesto que le proporciona a la bacteria un nutriente para su crecimiento y para mantener así una concentración baja de dicho ión que favorece la producción de factores de virulencia (síntesis de enzimas y expresión de sus antígenos). Una disminución del hierro sérico se asocia con los estados infecciosos e inflamatorios (11,12).

Las infecciones del tracto urinario causadas por estos microorganismos son menos frecuentes en los varones que en las mujeres. Pueden presentarse a cualquier edad, pero son más comunes en pacientes adultos y jóvenes.

Las infecciones por *S. saprophyticus* en el sexo masculino se han reportado en casos en que este microorganismo es causante de uretritis asociada con enfermedades de transmisión sexual. Los sitios anatómicos que infecta este microorganismo son recto, uretra y vías urinarias en este orden. La capa limosa de polisacáridos que inhibe la capacidad de los granulocitos para funcionar

adecuadamente está presente en los aislamientos a partir de estos sitios anatómicos.

Inmunocompromiso.

En un hospedero comprometido su resistencia a la infección disminuye aún más por enfermedad, terapias o quemaduras. Dos condiciones principales pueden comprometer al hospedero: 1) piel o membranas mucosas lesionadas y 2) un sistema inmune deprimido (63).

Los pacientes con inmunocompromiso se asocian a deficiencias hematopoyéticas, cuando la médula no produce suficiente cantidad de células o las que se elaboran adolecen de alguna deficiencia en su capacidad fagocitaria, o bien existen estados de pérdida proteica, en los cuales ésta es superior a la cantidad que se está sintetizando. Se presentan también deficiencias de los factores del complemento C3 y C5, que se han asociado con una menor resistencia a las infecciones. Igualmente, pacientes con falla renal y diabéticos se sabe que tienen un aumento de susceptibilidad a las enfermedades infecciosas. La respuesta inmune natural se reduce intencionalmente antes, durante y después de la cirugía de trasplantes (11,15,47,59,62,64).

Cuando se hace referencia a un paciente hospitalizado se sabe que tiene una respuesta inmune disminuida dado que su nivel sérico de anticuerpos es bajo contra los antígenos y toxinas de los estafilococos coagulasa negativa. Las causas más comunes de este tipo de respuesta son intervenciones quirúrgicas y tratamientos inmunosupresores (como quimioterapia, radioterapia, uso de

corticoides y antibióticos) (22,60,64,68). Sin embargo, se sabe también que en el caso de edad avanzada, se presentan deterioros por enfermedades debilitantes (hipertensión, diabetes, leucemia, colesterolemia y enfermedades inmunes). El uso indiscriminado de fármacos, el consumo de alcohol (que inhibe directamente la proliferación de leucocitos), el tabaquismo y el uso de drogas intravenosas, son factores que propician la actividad y funcionamiento inadecuados de los órganos que llevan a cabo la proliferación y madurez de las células que participan en la respuesta inmune. La desnutrición en estos pacientes inmunocomprometidos causa dificultad en la fagocitosis y limita la depuración de las bacterias por los macrófagos, por lo tanto, tiene una incidencia mayor que la normal a las enfermedades por *Staphylococcus*. (51,62,64).

Factores exógenos.

Entre los factores exógenos que condicionan el inmunocompromiso del hospedero se encuentra el empleo de catéteres intravenosos, de prótesis de articulaciones y de válvulas cardíacas naturales y protésicas que han llegado a ser una de las modalidades terapéuticas fundamentales en el ámbito hospitalario (12,15,20,27,28,29,31,32,41,48,58,60,65).

Varias especies de estafilococos coagulasa negativa tienen predilección peculiar por los biomateriales que constituyen los cuerpos extraños que son susceptibles de ser contaminados durante su implantación y que puedan generar septicemias en el postoperatorio (2,29,32,58).

A continuación, se mencionarán algunos aspectos que tienen relación y participación entre los factores exógenos y que se ha encontrado son importantes por su intervención en el riesgo inherente de los pacientes inmunocomprometidos.

A. Receptores proteicos.

Se han identificado varios sitios específicos de unión para proteínas del humano en la superficie celular de los estafilococos. Estos receptores proveen al microorganismo de un mecanismo de adherencia por medio del cual se establecen los focos de infecciones. Entre las proteínas plasmáticas que se unen de manera específica a los estafilococos figuran la fibronectina, el fibrinógeno, la inmunoglobulina G y el componente del complemento C1q (47). Los estafilococos también se unen a componentes de la matriz extracelular (MAC), la cual está constituida por una serie de proteínas y proteoglucanos localizados por fuera de la membrana plasmática y que son producidos y secretados por las células. Ciertos tejidos como los conectivos y los de la piel, son especialmente ricos en MAC (9,14).

Los componentes macromoleculares de las matrices extracelulares son:

1) los proteoglucanos, 2) las proteínas extracelulares (principalmente el colágeno), 3) las proteínas de adhesión (como laminina y fibronectina entre otras), que interactúan con las glucoproteínas transmembranas conocidas como moléculas de adhesión celular (CAMs) (14).

Proteoglucanos. Están constituidos por varias proteínas asociadas a diversos glucosaminoglucanos (9). Estos son polisacáridos en los que existe una

unidad de disacárido repetitiva que contiene un aminoazúcar (sea N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina). A causa de la presencia de grupos COO^- y SO_4^- éstos polisacáridos son moléculas muy ácidas. Los proteoglucanos son amorfos y se caracterizan por formar geles capaces de retener agua en las matrices extracelulares.

Proteínas extracelulares. Colágeno, representa el grupo de proteínas más abundante que se encuentran en el humano. Además de formar una capa amorfa en la lámina basal de ciertos tejidos, más frecuentemente constituye las fibras colágenas y reticulares que se localizan en los espacios extracelulares. Estas fibras sirven de sostén mecánico a los vertebrados.

Las interacciones del colágeno a nivel supramolecular comienzan en el interior de la célula y continúan en el espacio extracelular.

Proteínas de adhesión. Fibronectinas, comprende una familia de glucoproteínas dimericas involucradas en las adhesiones célula-matriz y célula-célula. La fibronectina es una proteína dimerica de 440 kDa en forma de filamento largo y flexible con múltiples isoformas. Posee numerosos sitios de fijación mediante los cuales se une al colágeno, la heparina y otras macromoléculas, así como también a proteínas de la membrana celular de la familia de las integrinas (9).

La liberación de fibronectina por la célula contribuye a la formación de matrices extracelulares que se encuentran en casi todos los tejidos de las heridas. Regula la adherencia de células como los fibroplastos, células epiteliales y monocitos, al sitio lesionado. Al unirse de manera específica a *S. aureus* y *S. epidermidis*, la fibronectina sirve como un puente entre el microorganismo y el

tejido de la herida del hospedero (47,64,65). La variedad de proteínas presentes en el hospedero, capaces de unirse de manera específica a *S. aureus* y *S. epidermidis* es una fuerte sugerencia de la existencia de más de un gen de adherencia para estas cepas (11). Si los genes de adherencia están localizados en plásmidos y pueden movilizarse con facilidad, proveen un mecanismo para la distribución de rasgos de virulencia entre las cepas de estafilococos y una explicación para la amplia diversidad del potencial patogénico entre los aislamientos de las muestras clínicas (15,16,30,36,64).

Los receptores de la fibronectina son regulados durante la inflamación e infección por una glucoproteína, la tromboplastina, que es un mediador importante para la adhesión de los estafilococos debido a que activa a las plaquetas para dar inicio a la formación del coágulo durante la infección de la matriz extracelular (20,39,53,70).

La liberación del factor plaquetario en la lesión vascular es necesaria para la formación de la tromboplastina activada y posteriormente para la formación de la fibrina. Esta última proteína se encarga de erradicar los antígenos circulantes (49,64).

B. Proteínas.

Las proteínas tienen una carga primaria en la superficie que está en contacto con su medio polar (H_2O) por lo que se explica su origen en la ionización o adsorción de iones (9,18).

Las proteínas presentan todas las características del estado coloidal, aún cuando su medio de dispersión molecular es el agua.

Entre las propiedades coloidales de las proteínas se puede citar (18).

□ Algunas proteínas globulares y algunos compuestos orgánicos (p.ej. polisacáridos) forman coloides liófilos.

□ Las proteínas no atraviesan las membranas naturales.

□ Las moléculas de las proteínas son relativamente grandes y forman una fase distinta del medio acuoso de suspensión.

□ Las interacciones de las fuerzas activas de superficie en las interfases moleculares de las proteínas se traducen en una elevada viscosidad, que es característica de los sistemas coloidales liófilos. La viscosidad es un índice de la resistencia de la molécula de proteína a desplazarse en relación con otras, cuando se aplica una fuerza a la solución en un espacio cerrado. Estas fuerzas pueden ser efecto de atracciones mutuas de las moléculas, o de asimetrías estructurales.

□ Según la distancia que las separe, las moléculas de proteínas presentan a la vez atracción y repulsión recíprocas. La repulsión se debe a que ambas partículas presentan la misma carga global (positiva o negativa). Pero si las moléculas se aproximan un espacio suficiente, en el punto de mayor

proximidad empiezan a actuar fuerzas de valencia locales residuales, de suerte que las dos moléculas pueden atraerse hasta formar un enlace de hidrógeno entre cargas o radicales electronegativos. Estos enlaces son dinámicos, se forman y desaparecen continuamente quedando definidos para los sistemas soles (también llamados coloides liófilos). El sol es fluido porque las partículas solas pueden formar enlaces momentáneos.

Este fenómeno fisicoquímico de superficie, como se ha mencionado, involucra otros eventos como son una fuerza de atracción (fuerza de Van der Walls) y una fuerza de repulsión (energía electrostática). Estos parámetros se asocian con la teoría de Derjaguin-Landau-Verwer-Oberbeek (DLVO) la cual establece que, a menor energía libre no existen cambios espontáneos en el medio, hay mayor equilibrio y es más estable el sistema (19,63).

Las proteínas son coloides estables, es decir no requieren agentes estabilizadores. Esto obedece a dos razones, en primer lugar, los iones proteínicos en solución se repelen mutuamente. En segundo lugar, cada ión proteínico atrae y orienta en el espacio a las moléculas de agua que lo rodean. Cada molécula actúa como dipolo, con extremos positivos y negativos (18,62).

Factores endógenos

Colonización de la superficie.

El mecanismo de adherencia de los estafilococos coagulasa negativa, por ser flora habitual en el humano, se realiza en un lapso breve puesto que son cortas las distancias de separación entre la superficie y su rango de fuerzas iónicas es bajo (18).

Otro factor que contribuye a la adherencia es la producción de un exopolisacárido por algunas cepas de *Staphylococcus*, que puede ser un factor crítico para la colonización exitosa de biomateriales como son, válvulas cardíacas, cánulas, catéteres intravenosos así como las prótesis (14,17,20,28,31,45,58,61). En el medio natural competitivo, la producción de glicocálix bacteriano (47,62,63,57,60) interviene en la formación de microcolonias y contribuye a la formación de biopelículas. *S. epidermidis* contiene el gen que codifica la producción de una adhesina intercelular del polisacárido (AIP), el cual es un operón y está organizado en el loci ADBC (adhesión intercelular). Esta AIP es un factor importante en la colonización de dispositivos médicos (31).

El polisacárido está constituido por proteínas y lípidos y estos mismos le proporcionan estabilidad al sol liófilo (42,52).

La adhesión también está regulada por los cambios fenotípicos que se presentan en la célula bacteriana (19).

La presencia de iones en los líquidos corporales genera la fuerza iónica difusa que puede atraer a los iones de carga opuesta que presentan la bacteria y los biomateriales, estos últimos ubicados en la capa subyacente como por ejemplo, en infecciones de tejidos pulmonares si el flujo dinámico ocasiona presión en los iones, los que quedan suspendidos van a fluir a través de estas capas subyacentes que están asociadas con dispositivos médicos.

La capacidad de estos microorganismos para formar glicocálix (limo de polisacáridos) facilita la colonización de las superficies inertes (material de plástico y acero inoxidable); tras adherirse a la superficie, los microorganismos son capaces de erosionarla (31,36,47,54,57,60). La interacción de la superficie con el limo de polisacáridos, vuelve al microorganismo resistente a los mecanismos de inmunidad natural y a la actividad antibiótica (25).

Formación de biopelículas.

La carga existente en la superficie de las proteínas así como la de las bacterias y substratos son la causa de la formación de la doble capa eléctrica difusa (62).

La fuerza dinámica de los fluidos se encarga de dispersar a las bacterias uniformemente a lo largo de una fase líquida, además, concentra a las bacterias suspendidas en la proximidad de la superficie a la capa viscosa límite (lesión). Los mismos microorganismos generarán sus nichos en una superficie áspera la cual disminuye la presión de las fuerzas dinámicas y de este modo se inicia la adhesión a la superficie de la proteína del hospedero (19,28).

La teoría de DLVO explica las fases iniciales de colonización bacteriana en la superficie de las proteínas del hospedero. La teoría describe los cambios de energía de Gibbs en función de la distancia entre dos objetos, entonces la interacción total se deriva de la suma de la fuerza de Van der Waals y las interacciones electrostáticas (62).

La naturaleza de la superficie de células bacterianas y substratos es predominantemente negativa (19,32). Las fuerzas de repulsión electrostáticas son afectadas por la fuerza iónica de los fluidos y operan encima de distancias más pequeñas, conforme aumenta la fuerza iónica, disminuye la distancia entre la bacteria y la proteína. Cuando la fuerza iónica aumenta el rango de efectividad para la energía de repulsión se reduce el gasto energético, por lo tanto, la energía libre de Gibbs total disminuye y la bacteria se adhiere (mínimo secundario) de manera reversible. Entonces las bacterias comienzan a crecer sobre la proteína y los biomateriales (19).

Probablemente se experimenten fuerzas iónicas intermedias en ecosistemas naturales con lo que las células bacterianas se acercan a la superficie y con ello se presente la adherencia reversible.

La adhesión de *Staphylococcus* y el hospedero se lleva a cabo mediante moléculas presentes en la superficie del patógeno que se llaman adhesinas o ligandos y que se unen específicamente a las proteínas como la fibronectina, fibrinógeno y colágeno, la adhesión es mediada por estas adhesinas que expresan receptores (14,16,43,63). La unión de las adhesinas a las proteínas de la matriz extracelular depende del ión Ca^{+2} . *S. epidermidis* expresa la proteína Fbe que es el ligando para la fibronectina y que inicia la formación de la biopelícula

(65). Las adhesinas pueden también localizarse en el glicocálix de los estafilococos coagulasa negativa (14,61,63). Este mecanismo que emplea la bacteria para fijarse a la proteína le permite adherirse irreversiblemente disminuyendo las fuerzas electrostáticas y el movimiento browniano, aumentando así las fuerzas de atracción entre la bacteria y la proteína. Otro mecanismo es que las bacterias, como células individuales, pueden poseer energía suficiente para su unión a la proteína (9).

Estabilidad de la biopelícula.

Las proteínas son macromoléculas (soles liófilos) que están rodeadas por iones que forman un polielectrolito; influyen en la fuerza motriz que actúa sobre la partícula coloidal, estos iones permiten que las bacterias puedan aglutinarse y existen dos razones principales para que esto suceda (61,62).

En primer lugar, las moléculas de alto peso molecular (proteínas) pueden ser absorbidas en la superficie de partículas, como las bacterias. Las partículas o células aglutinadas pueden tener superficies separadas a distancias muy cortas y las pequeñas fuerzas de repulsión a estas distancias están equilibradas por las fuerzas de adsorción en cada extremo de la macromolécula que actúa de puente. Las células vivas se aglutinan también por la presencia de varios polisacáridos (p. ej. la cápsula y el glicocálix bacteriano) o de moléculas de proteínas, que al parecer forman puentes entre ellas.

El segundo mecanismo para aglutinarse está dado por la formación de puentes de iones polivalentes entre grupos con carga en las dos superficies.

Consiste en que las bacterias se adhieren fuertemente a grupos aniónicos en la superficie de la proteína en presencia de indicios de iones metálicos polivalentes, como Ca^{2+} y Fe^{3+} . Estos iones son adsorbidos específicamente por los grupos COO^- ; es digno de mención el hecho de que el Mg^{2+} presenta una adsorción específica más débil y, por tanto, no tan eficaz como el Ca^{2+} para enlazar bacterias a las proteínas.

El Ca^{2+} interviene en la coagulación sanguínea y como segundo mensajero en la señalización intercelular (p ej en la activación de la trombina mediante las plaquetas) (51).

Se debe recordar que el potencial de la membrana se controla por conducciones iónicas y transporte electromagnético de iones e influye de forma importante en el estado contráctil. La entrada de calcio a través de sus propios canales es esencial para la contracción tanto prolongada como corta. También es importante la liberación de Ca^{2+} o la recaptación del mismo, del retículo sarcoplasmático (lugar de almacenaje y liberación principal de calcio) en el centro y próximo a la superficie celular (14,51).

Estos iones polivalentes no sólo forman puentes fuertes entre las superficies aniónicas, sino que también reducen las fuerzas de repulsión que actúan como barrera de energía para evitar el estrecho acercamiento de superficies cargadas. Este tipo de puentes se caracteriza por un acercamiento muy íntimo de las superficies y una gran sensibilidad para secuestrar agentes y formar complejos, lo cual haría ineficaces a los iones polivalentes en cuestión (51).

Impacto nosocomial.

Las infecciones adquiridas como resultado de la estancia en el hospital se denominan infecciones nosocomiales. La palabra, nosocomial se deriva de la palabra griega que designa al hospital; el término también incluye infecciones adquiridas en cuneros y otros medios de salud relacionados (63).

Las infecciones nosocomiales son el resultado de la interacción de varios factores: (1) los microorganismos en el ambiente del hospital, (2) el estado de compromiso del hospedero (debilitado), y (3) la cadena de transmisión en el hospital.

El ambiente del hospital es el mejor reservorio para la variedad de microorganismos patógenos, a pesar del esfuerzo que se hace para erradicar el crecimiento de microorganismos en estos. De hecho, la mayoría de las bacterias patógenas que causan las infecciones nosocomiales en personas cuyas defensas han sido debilitadas a través de enfermedades o terapias.

Todos los humanos transportan *Staphylococcus* como parte de la flora habitual de la piel, por consiguiente, el hombre sirve como una fuente exógena de contaminación para otro y, a la vez, para sí mismo como una fuente endógena (1,31,56).

El uso de drogas, terapia con radiación, terapia con esteroides, quemaduras, diabetes, leucemia, insuficiencia renal, estrés y desnutrición, todos pueden adversamente afectar las acciones de linfocitos T y B y comprometer al hospedero (4,47,28,54,57,63).

Una persona con su estado de salud normal tiene sus membranas superficiales y mucosas intactas, éstas le proporcionan barreras físicas formidables contra la mayoría de los patógenos. Quemaduras, heridas quirúrgicas, traumas (como heridas accidentales), extracción sanguínea, terapia intravenosa y catéteres, pueden todos romper la primera línea de defensa y hacer a un individuo más susceptible de enfermar dentro de los hospitales. Los pacientes con quemaduras son especialmente susceptibles a infecciones nosocomiales (47,64). Las infecciones quirúrgicas pueden ser causadas por relativamente pocos microorganismos de los que contaminan el área quirúrgica, debido a la presencia de cuerpos extraños y tejido desvitalizado. Un aspecto importante para prever que los estafilococos coagulasa negativa puedan, infectar los tejidos lesionados, son los agentes desinfectantes para limpiar la piel del sitio involucrado (60).

Los agentes antisépticos deben ser inocuos para el hospedero, entre los más empleados están la tintura de yodo al 2%, alcohol etílico al 70%, el alcohol isopropílico al 70% a 90%, la solución de yodo con polivinilpirrolidona al 2%, la nitrofurazona al 0.2% y, por último, el peróxido de cloro Cl_2O_2 .

Se realizó un ensayo comparativo entre yodo con polivinilpirrolidona al 2% y el peróxido de cloro Cl_2O_2 para cuantificar cuál de los dos disminuye en forma más efectiva la contaminación en las muestras tomadas de piel y de catéteres. El resultado de este ensayo entre los dos agentes antisépticos en el caso de asepsia con Cl_2O_2 de 26 muestras de herida se obtuvo 1.3% de placas (de agar sangre) contaminadas; y en el caso de la asepsia con yodo polivinilpirrolidona, de 26 muestras de herida, fue 2.3% placas contaminadas. En los casos de

catéteres sólo se reportaron los ensayos con Cl_2O_2 . los resultados fueron los siguientes, de 46 muestras se obtuvo un 1.7% de placas contaminadas. Los autores del artículo consideran que el mejor agente antiséptico es Cl_2O_2 .

Dada la variedad de patógenos (y potencialmente patógenos) en el hospital y el estado comprometido del hospedero, las rutas de transmisión de infecciones nosocomiales son, la transmisión por contacto directo del personal del hospital al paciente, la transmisión por contacto indirecto a través de fomites y el sistema de ventilación de hospital (64).

Ciertas áreas del hospital son reservadas para el cuidado especializado, incluyen quemaduras, hemodiálisis, recuperación, cuidado intensivo, y unidades de oncología. Desgraciadamente, en estas unidades también se agrupan a los pacientes y mantienen ambientes que permiten propagarse las epidemias de infecciones nosocomiales de paciente a paciente (64).

Muchos métodos de diagnóstico y procedimientos terapéuticos en los hospitales proporcionan una ruta de transmisión de los fomites. Los catéteres intravenosos, los que pasan en una vena a través de la piel proporcionan fluidos, nutrientes y medicamentos, pero también pueden transmitir infecciones nosocomiales. Los equipos respiradores pueden ayudar a introducir fluidos contaminados en los pulmones. Las agujas pueden introducir microorganismos de flora habitual o patógenos en músculo o sangre y pueden infectarse preparaciones quirúrgicas y promoverse enfermedades.

El estetoscopio es reservorio para los estafilococos coagulasa negativa que causan infecciones nosocomiales. Esto se pudo comprobar mediante un estudio de estos instrumentos médicos se reportó la siguiente relación, 48

especies de 22 eran *S. aureus* y 26 especies de 48 eran *S. epidermidis* (60). Los porcentajes de contaminación que se encontraron en los estetoscopios de los integrantes del equipo de salud de varios hospitales fueron los siguientes: 90% médicos, 65% enfermeras, 82% personal de unidad de terapia intensiva, 35% en estudiantes de medicina y 35% el terapeuta respiratorio.

Los pacientes hospitalizados con lesiones que drenan restos celulares muertos (pus) al exterior, son sumamente peligrosos a causa de su capacidad de diseminar el microorganismo entre los pacientes del hospital y de los mismos familiares. Debido a que las lesiones pueden no desarrollarse hasta después del alta hospitalaria, los pacientes con heridas postoperatorias infectadas pueden transmitir las cepas hospitalarias de *Staphylococcus* a la comunidad (47,64).

Además de la amenaza de los microorganismos oportunistas en el hospital, algunos de ellos presentan resistencia a las drogas antimicrobianas que normalmente se usan en dichos hospitales. Estas cepas pueden ser flora de pacientes y del personal del hospital y esto hace que progresivamente sean más resistentes a la terapia antimicrobiana.

Entre los antibióticos que se habían empleado con éxito para el tratamiento de las estafilococcias estaba la meticilina, pero actualmente también suele ser difícil el control de la diseminación de los microorganismos que son resistentes a la meticilina, debido a que los portadores nasofaríngeos asintomáticos constituyen la fuente más común de los estafilococos (47).

Capítulo III. Comportamiento frente los antibióticos.

En los años recientes se han hecho frecuente las infecciones nosocomiales y la colonización de pacientes y personal del hospital con cepas resistentes a múltiples antibióticos y /o con cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* resistentes a la meticilina (1,12,21, 29,43,56,59).

Por lo general, las enfermedades de que son responsables las infecciones por los estafilococos coagulasa negativa y que se presentan en pacientes hospitalizados, han adquirido importancia, particularmente las bacteremias nosocomiales según datos reportados por la NNIS y que se han incrementado de 20% a 27% en una década. Además, durante este período, ha habido también un incremento en la resistencia de los estafilococos a los antibióticos de 20% a 60% (1). La antibioticoterapia puede suprimir la flora habitual dando como resultado una infección, a pesar de la existencia de un sistema inmunitario intacto (62,64).

Hay que recordar que una cualidad de los estafilococos coagulasa negativa es infectar los tejidos lesionados debido a intervenciones quirúrgicas, inserción de catéteres y válvulas cardiovasculares así como en quemaduras graves, ocasionando formación de abscesos y pus (13,15,31). Todo este tipo de lesiones puede absorber medicamentos y de esta forma impedir su contacto con los microorganismos.

Cepas meticilina resistentes.

Hoy en día, son susceptibles a la penicilina menos del 10 % de las cepas. La resistencia está mediada por la presencia de la enzima penicilinasasa. La información para la producción de esta enzima está codificada por plásmidos transmisibles, lo que facilita su rápida diseminación entre los estafilococos (1,29,43,59).

La propagación de la resistencia a agentes antimicrobianos en las poblaciones de *Staphylococcus* puede clasificarse en forma convencional como cromosómica, o bien por la presencia de fragmentos extracromosómicos o plásmidos, con material genético libre en el citosol y que es la base de la transferencia extracromosómica de la resistencia.

Los tipos de penicilinasasa producidos por las cepas de *S. aureus* que contienen plásmidos, se correlacionan con la tipificación de la cepa particular basándose en su sensibilidad a los bacteriófagos. Las penicilinasas tipo A y C son producidas por miembros de los grupos I y III de fagos, las de tipo B son producidas por miembro del grupo II. La β -lactamasa de tipo D es relativamente rara, es inmunológicamente diferente de los tipos A, B y C, se produce constitutivamente y se encuentra en células de *S. aureus* de los grupos I, II y III (70).

Los plásmidos que codifican la producción de penicilinasasa transportan determinantes de resistencias a otros antibióticos por ejemplo, la resistencia a la eritromicina, estreptomycinina, tetraciclina, neomicina y al ácido fusídico.

El problema de los estafilococos resistentes a la penicilina condujo al desarrollo de penicilinas semisintéticas resistentes a la hidrólisis por β -lactamasas por ejemplo metilicina, nafcilina, isoxazolilpenicilinas, cloxacilina, dicloxacilina y oxacilina. Sin embargo, en la actualidad ya apareció también resistencia a esos antibióticos, primero en Japón, luego en Europa y posteriormente en Estados Unidos (1). Las cepas resistentes se reconocen ahora como *S. epidermidis* y *S. aureus* metilicina resistente MRSE y MRSA, respectivamente. Se ha visto que los estetoscopios son reservorio para estas cepas como ya se mencionó. En un estudio de estos instrumentos médicos se reportó la siguiente relación, 4 especies de 24 eran *S. aureus* y 13 especies de 48 eran *S. epidermidis* (60).

Distintos mecanismos de resistencia bacteriana.

No obstante que la utilización de antimicrobianos ejerce una presión selectiva que estimula la proliferación y el desarrollo de cepas resistentes. La resistencia de las cepas de *Staphylococcus* a los antibióticos puede ocurrir por diversos mecanismos. (1,16,70).

a) Los microorganismos pueden sintetizar una enzima que destruya al principio activo, tal es el caso de la producción de β -lactamasas (penicilinasas/cefalosporinasas).

b) Los microorganismos pueden alterar su permeabilidad a un medicamento dado, como en la acumulación de tetraciclina en los estafilococos susceptibles, que puede ser controlada por el transporte activo a través de la membrana celular; por lo tanto, esto les confiere resistencia.

c) La resistencia puede deberse igualmente a la alteración de una vía metabólica, como es el desarrollo de la capacidad para usar ácido fólico preformado y, por tanto, adquirir resistencia a sulfonamidas.

d) Los microorganismos pueden alterar sus receptores del principio activo. La resistencia a aminoglucósidos ocurre por pérdida de una proteína fijadora en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano.

e) La alteración de la enzima blanco, si una enzima normal del microorganismo es inhibida por un antibiótico específico, es posible que la enzima adquiera una conformación diferente la cual le permita a la bacteria sobrevivir.

La antibioticoterapia que elimina la flora normal puede dar como resultado una infección, a pesar de la existencia de un sistema inmunitario intacto, las infecciones de las mucosas son frecuentes en estados inmunodeficiencia congénita o adquirida, inclusive en presencia de factores normales no inmunitarios (62,64).

Por estudios moleculares basados en el análisis de su ADN se ha determinado que el genoma de *Staphylococcus* diverge en distintas clonas en cada resiembra, dependiendo de su ubicación geográfica y el sitio anatómico.

S. epidermidis lleva consigo el plásmido que contiene el gen Mec A que codifica la proteína de alta afinidad (PBP2a) para el mecanismo de resistencia (1).

Los estafilococos coagulasa negativa tienen los genes que codifican para la misma enzima bifuncional y esta también se encuentra en *S. aureus*. Los genes que codifican la enzima, son AAC (6') - APH (2"), que son fundamentales en la resistencia a gentamicina, se ha encontrado que los dos fragmentos

extracromosómicos pertenecen principalmente a la familia de plásmidos de conjugación. Los estafilococos coagulasa negativa en su genoma tienen el trasposón Tn4031 que inactiva a los aminoglucósidos y se aisló *S. epidermidis*. Este trasposón es análogo a Tn4001, un elemento común entre *S. aureus* aislados en Australia (1).

La eficacia de los macrólidos, lincosamidas y estreptomicina de tipo B ha disminuido en los estafilococos coagulasa negativa por dos razones: la primera es por la presencia de la enzima N⁶ dimetilasa que actúa en la subunidad 23S del RNAr. Esta metilasa es codificada por el gen erm que están en plásmidos (ermC) o por un trasposón Tn554 (ermA) o Tn551 (ermB). El gen de la metilasas que se halla en los estafilococos coagulasa negativa es ermC, pero también el ermA es común en MRSE, el gen ermB no se ha aislado aún en cepas de origen humano. Entre un 70% a 80% de resistencia a eritomicina se debe a la inducción del gen erm C y la segunda causa es por resistencia cruzada entre estos antimicrobianos.

Más del 70% de ENC son resistentes a tetraciclina y dicloxacilina, datos obtenidos en el Hospital de la Universidad Médica de Virginia en 1993.

Hay dos mecanismos de resistencia a tetraciclina que se hallaron para ENC. El primero es por la presencia de una proteína presente en la membrana de los microorganismos que controla el mecanismo de transporte activo del antimicrobiano y, el segundo, es por la de una proteína citoplasmática que reduce la sensibilidad del ribosoma al antimicrobiano. El gen que se ha encontrado principalmente en los estafilococos coagulasa negativa para el transporte activo es el tet K, que normalmente es codificado por plásmidos para

dar la resistencia a tetraciclina y dicloxacilina. El gen que codifica la proteína de protección del ribosoma es tet M y éste lo llevan en el cromosoma. El gen que predomina en las muestras clínicas al parecer, es el tet K.

Para el antibiótico trimetoprim-sulfametoxazol, las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* llevan consigo el plásmido que contiene el gen *dfrA* el cual codifica la enzima dihidrofolato reductasa (DHRFS1). Este gen tuvo origen en Austria y se ha extendido entre ENC en los Estados Unidos desde la década de los 80.

Desgraciadamente, se ha presentado la emergencia y diseminación de resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol entre ENC presentes en hospitales, por lo ya que se está evitando el uso de este antimicrobiano para el tratamiento de muchas infecciones estafilocócicas.

Resistencia Intermedia a la Vancomicina.

Las instalaciones de salud que tratan infecciones por MRSA tienen pocas opciones aparte de la vancomicina. A la vancomicina, la mayoría de los investigadores se refieren ampliamente como el antibiótico de última elección, particularmente contra estas cepas (24).

Sin embargo, se han reportado tres casos de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA) (23). El primero fue un bebé de cuatro meses de edad en quien se desarrolló un MRSA después de una cirugía de corazón en un hospital de Tokio en mayo de 1996 (24,25). El paciente fue tratado con vancomicina por 29 días sin mostrar curación. El investigador japonés Keiichi

Hiramatsu fue quien descubrió esta cepa (VISA), presentando un nivel de resistencia intermedia con una concentración inhibitoria (CMI) de ocho. Por definición, es necesario una CIM de treinta y dos para que un microorganismo se clasifique como completamente resistente a la vancomicina (24).

Hiramatsu observó el mecanismo de resistencia a este antimicrobiano, el cual consiste en que la vancomicina actúa al fijarse a la pared celular bacteriana, e interferir con su síntesis por lo que se tiene que usar una mayor cantidad de vancomicina para suprimir el crecimiento de la célula (26).

Se ha encontrado una cepa llamada Mu50 en Japón la cual ha desarrollado una pared celular con el doble de grosor que la de *S. aureus* descubierta por Hiramatsu. Este investigador no ha encontrado ningún otro aislamiento clínico de Mu50 en Japón; sin embargo, ha detectado una clona que prevalece y que se llamó Mu3, la cual tiene una CIM a la vancomicina entre 2 y 4. Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades establecen que el aislamiento de *S. aureus* con una CIM de cuatro o mayor debe considerarse como una cepa con susceptibilidad reducida (VISA). La Mu3 y Mu50 muestran el mismo patrón al realizar una electroforesis, lo cual indica una clona de la misma cepa. Al realizar experimentos con la cepa Mu3 *in vitro* frente a varias concentraciones de vancomicina, se llega al mismo nivel de resistencia que el mostrado por la cepa Mu50 *in vitro*. Por lo tanto, Mu3 es una cepa heterogénea considerada como precursor de un MRSA resistente a la vancomicina debido a que muestra la capacidad de desarrollar una CIM de ocho —esencialmente volviéndose un Mu50— cuando se expone a una gran dosis de vancomicina en los experimentos realizados por Hiramatsu (25,26).

En Japón se ha encontrado que el 8.8% de los aislamientos de MRSA de siete hospitales Universitarios fueron cepas Mu3. Este hallazgo reviste mucha importancia porque en Japón se ha encontrado que el 8.8% de los aislamientos de MRSA de siete hospitales Universitarios fueron cepas Mu3. Se sabe que al menos, diez pacientes japoneses inmunocomprometidos murieron de infecciones por MRSA del tipo Mu3.

El segundo caso fue el de un paciente con diálisis peritoneal; este tipo de pacientes son susceptibles de adquirir infecciones por estafilococos y la vancomicina es uno de los tratamientos tradicionales para los pacientes con falla renal. Un paciente de Michigan desarrolló infección por VISA después de un tratamiento intermitente y prolongado (entre enero y julio de 1996) con vancomicina debido a una peritonitis causada por MRSA. Cuando se estudió la primera cepa norteamericana de VISA, se vió que era resistente también a rifamicina, clorafenicol, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina (26).

Inmediatamente después de la aparición del primer caso de *S. aureus* de susceptibilidad reducida a la vancomicina (VISA) en Michigan, se detectó un segundo caso de infección en el Centro Médico de Nuestra Señora de Lourdes, en Camden, en un paciente de New Jersey. De acuerdo al reporte del Centro de Control y Prevención de Infecciones sobre el caso, en agosto de 1997 se diagnosticó una infección por VISA asociada con el torrente circulatorio de un paciente, que había tenido colonización por *S. aureus* resistente a la metililina (MRSA) por un período prolongado, y tenía infecciones repetidas por el mismo MRSA desde febrero. Además, desde febrero había tenido una colonización con *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (VRE). De marzo a agosto de 1997, el

paciente había sido tratado con terapias sucesivas de vancomicina para erradicar la infección del torrente circulatorio causada por MRSA. En ambos casos de los Estados Unidos se reportó una concentración mínima inhibitoria de ocho (26).

Investigadores americanos al tener el conocimiento de los tres aislamientos de la cepa VISA consideraron que *Enterococcus* y *Staphylococcus* pudieron haber intercambiado genes. Lo anterior lo demostraron con experimentos en el laboratorio viendo que efectivamente, la resistencia a la vancomicina es transferida genéticamente de *Enterococcus faecalis* a *S. aureus*, se considera que esta transferencia ocurrirá inevitablemente entre las dos especies en la naturaleza, en particular porque ahora hay hospitales con brotes nosocomiales a niveles endémicos.

La resistencia a la vancomicina en los estafilococos meticilina-resistentes puede presentar problemas terapéuticos potenciales, por lo que investigadores del Departamento de Patología y del Laboratorio de Medicina en el Centro Médico Albania, en Nueva York USA, han efectuado ensayos para explicar y entender el impacto de resistencia a la vancomicina con niveles bajos de concentración; el primer paso fue seleccionar una cepa de estafilococos coagulasa negativa y sembrarla en medios con diferentes concentraciones encontrando *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus epidermidis* muestran crecimiento en medios con niveles bajos de concentración de vancomicina. Algo similar puede ocurrir con el resto de las cepasECN (10).

Si *S. aureus* con susceptibilidad reducida a la vancomicina comienza a circular entre los hospitales y aún dentro de las comunidades que los rodean y sí además se establecen, esto sería un problema tanto para pacientes

hospitalizados como para los que están inmunocomprometidos aumentando así el problema del nosocomio, debido a que se espera que las cepas VISA sigan líneas epidemiológicamente similares a las de las cepas MRSA.

Capítulo. IV Parte Experimental

Material de uso común en el laboratorio.

Algodón (Zumm)

Asa bacteriológica

Cajas de Petri desechables estériles (laboratorios LS y M)

Canastillas metálicas

Espátulas de acero inoxidable

Filtros Millipore de 0.45 μm

Fascos de boca ancha

Fascos gotero

Gasas

Gradillas metálicas

Hisopos estériles

Jeringas de 20 y 5 mL (Becton Dickinson)

Masking Tape (Tuck)

Matraz Erlenmeyer de 1000 mL (Pyrex)

Mechero

Pinzas de Millipore

Pipetas

Pipetas Pasteur

Plantilla diseñada para medir los halos de inhibición

Portaobjetos

Tela de asbesto

Tijeras

Tubos de ensaye 12 × 100 mm (Pyrex)

Tubos de ensaye 13 × 100 mm (Pyrex)

Varilla en forma ovalada

Vasos de precipitado de 100 mL (Pyrex)

Equipos

Autoclave vertical (Aparatos Científicos)

Balanza analítica (Analytical Plus [OHAUS])

Balanza digital (Portable Advanced [OHAUS])

Campana de Flujo Laminar (VECO)

Incubadora a 37°C (RIOSSA)

Microscopio Zeiss (Industrias Carl Zeiss S.A. de C.V.)

Parrilla con calor y agitación (NUOVA II)

Potenciómetro digital portátil (Conductronic S.A. Mod 10)

Refrigerador (AMERICAN)

Material Biológico

Se estudiaron 350 cepas aisladas de material clínico procedente de los siguientes centros hospitalarios:

PROCEDENCIA	TOTAL
INER	60 CEPAS
INNSZ	130 CEPAS
INP	160 CEPAS

Abreviaturas

INER : Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
INNSZ : Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubirán "
INP : Instituto Nacional de Pediatría.

Se utilizaron 2 cepas de referencia proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química.

CEPAS
<i>S. aureus</i> ATTC25973
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228

Discos de Novobiocina 5µg (Sanofi Diagnostics Pasteur S.A.)

Multidiscos para Gram positivos (Sanofi Diagnostics Pasteur S.A.)

Medios de Cultivo

Agar para DNAsa (MERCK)

Agar Estafilocoço 110 [S-110] (BIOXON)

Agar Infusión Cerebro-Corazón (BIOXON)

Agar Mueller Hinton (BIOXON)

Base para Agar Sangre (BIOXON)

Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BIOXON)

Caldo Soya Trypticasa (BIOXON)

Medio Base para Carbohidratos (BIOXON)

Medio MIO (BIOXON)

Reactivos

Aceite de inmersión (Química Industrial Carmo)

Aceite mineral (Química Industrial Carmo)

Acetona (MERCK)

Acido acético (J.T. BAKER)

Acido clorhídrico (MERCK)

Acido sulfanilico(J.T. BAKER)

Acido sulfúrico (J.T. BAKER)

Agua destilada

Alcohol- etílico (MERCK)

α -naftilamina (MERCK)

α -naftol (SIGMA)

L-Arginina (DIFCO)

Azul de Orto-Toluidina (MERCK)

Cloruro de bario (MERCK)

Cloruro de sodio (J.T.BAKER)

Cristal violeta (MERCK)

Dextrosa anhidra (Química Industrial Carmo)

Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (SIGMA)

Extracto de levadura (BIOXON)

Fenol (J.T. BAKER)

Fosfato de potasio monobásico (J.T: BAKER)

Hidróxido de potasio (SIGMA)

Lactosa (SIGMA)

Maltosa monohidratada (MERCK)

D-Manosa (SIGMA)

Manitol (DIFCO)

Neopeptona (BIOXON)

Peptona de caseína (BIOXON)

Peróxido de hidrógeno (Laboratorio AZTECA)

Púrpura de bromocresol (MERCK)

Sacarosa (J.T. Baker)

Safranina (MERCK)

Trealosa (MERCK)

Urea (MERCK)

Yodo (Química Barsa)

Yoduro de potasio (J.T. Baker)

Metodología

A. Identificación de especie

Se obtuvieron 350 muestras de *Staphylococcus sp.* aisladas de material clínico procedente de los siguientes centros hospitalarios: 60 cepas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), 130 cepas del Instituto Nacional de la Nutrición (INN) "Salvador Zubirán" y 160 cepas del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

A cada uno de los estafilococos se les realizó un frotis para verificar que fueran cocos Gram positivos, la prueba de la catalasa para confirmar el género (4,33,34,59,70) y posteriormente se sembraron para tener los microorganismos puros en Agar S-110. A partir de los estafilococos puros en este medio selectivo, se procedió a determinar la especie correspondiente, iniciando con la prueba de la coagulasa la cual nos permite establecer la diferencia y saber si se trata de *Staphylococcus aureus* o de estafilococos coagulasa negativa (SNC) (4,11,13,38,47,53). A continuación se describe en qué consistió dicha prueba:

En condiciones asépticas, con una asa se tomaron de 1 a 2 colonias aisladas del Agar S-110 con el mismo tipo morfológico y se inocularon en 2 mL de medio caldo soya triptica incubándose a 37 °C durante 24 h. En este cultivo líquido y puro de 24 h se adicionaron asépticamente 2 mL de plasma humano mediante una jeringa estéril desechable. Se mezcló el contenido rotando el tubo con suavidad, teniendo la precaución de no sacudir la mezcla. El tubo se

colocó en una gradilla para incubarlo a 37°C observándolo cada 30 minutos durante 4 h (40).

La identificación de las especies que se citan con más frecuencia en la literatura como los agentes etiológicos, se hizo de acuerdo a varias de las pruebas bioquímicas más comunes en el laboratorio de Bacteriología. Tanto las pruebas como el criterio con que se manejaron los resultados se llevó a cabo como lo describen Kloss y Bannerman (32,33,37) como se adjunta en la tabla que contiene las pruebas empleadas, basándose algunas, en las propiedades fenotípicas moleculares de las especies como son la producción de las enzimas.

Pruebas bioquímicas.

Tabla A

Especie	<i>S. aureus</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. warneri</i>
Coagulasa	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Termonucleasa	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	+	-	-	+	-	+	d	+	+
Reducción de nitratos	+	(d)	d	+	+	d	+	-	d
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	(d)	-	-	+	-	-
Resistencia a novobiocina ^h	-	-	-	-	-	-	-	+	-
α-Lactosa	+	-	-	d	d	d	+	d	d
D-Maltosa	+	(+)	-	+	+	+	+	+	(+)
D-Manitol	+	-	+	-	d	-	-	d	d
D-Manosa	+	-	+	(+)	-	-	+	-	-
Sacarosa	+	d	(+)	+	+	(+)	+	+	+
D-Trealosa	+	(+)	-	-	+	d	+	+	+
Producción de acetoina	+	-	d	+	+	d	+	+	+
Utilización de arginina	+	d	d	d	+	d	-	-	d
Pigmento	+	-	-	-	d	d	d	d	d
Hemólisis ^g	+	-	(d)	(d)	(+)	-	(+)	-	(d)

Simbología: d, 11 a 89% de cepas dan la prueba positiva.

El (i) indica una reacción retardada.

Positive; más de 90% de las cepas dan la prueba positiva

g Positiva, con zona amplia de hemólisis entre 24 a 36 h. g (+) reacción retardada con una zona de hemólisis delimitada entre 48 a 72 h. (d) da hemólisis delimitada.

k: crecimiento con una zona de inhibición ≥ 16 mm con disco de Novobiocina de 5µg.

Para comprobar el comportamiento adecuado de las bioquímicas, se emplearon dos cepas de referencia proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química, fueron las siguientes: *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. aureus* ATCC 25973. Una vez confirmado el comportamiento y con las cepas de *Staphylococcus* puras, se procedió a la identificación de las especies de los coagulasa negativa.

Entre las 350 muestras proporcionadas, diez de ellas dieron positiva la prueba de la coagulasa, no obstante, se les realizaron las pruebas bioquímicas dando todas ellas, como era de esperarse, los resultados que indican la presencia de *S. aureus*.

Para realizar las pruebas bioquímicas se requirió transferir en condiciones asépticas de una a dos colonias aisladas del agar S-110, e inocularlas en 6 mL de medio de cultivo caldo soya tripticasa e incubarse a 37 °C durante 24 h. Con este cultivo líquido y axénico, se preparó una suspensión semejante a la que da el 0.5 de la escala de McFarland. La turbidez se ajusta con solución isotónica estéril al 0.9 % la cual se adiciona a través de una pipeta Pasteur estéril. De esta suspensión, se transfirieron en condiciones asépticas alícuotas de 0.5 mL para inocular cada uno de los tubos conteniendo 3 mL de cultivo para las siguientes pruebas:

- (a) Fuente de Carbono (fermentación de lactosa, maltosa, manosa, manitol, sacarosa y trealosa).
- (b) Aminoácido (utilización de arginina).
- (c) Aminoácido (ornitina descarboxilasa).

(d) Voges-Proskauer (producción de acetoina [acetil-metil carbinol])

(e) Reducción de nitratos.

(f) Urea (presencia de la enzima Ureasa)

Al caldo Rojo de Metil/ Voges-Proskauer (RM/VP), para la determinación de acetoina al medio de cultivo se sustituyó la sal de fosfato ácido de potasio ($K_2 HPO_4$) por Cloruro de sodio (NaCl) manteniéndose la cantidad requerida.

Ya sembrados los tubos de las bioquímicas se incubaron a 37 °C durante 24 h para realizar las lecturas e interpretación.

Se inoculó de la manera mencionada por las siguientes razones; la primera para evitar contaminación cruzada, la segunda, para prever la exposición prolongada de las cepas y con ello evitar la contaminación en el laboratorio y al personal que labora en él y, finalmente, por el número de cepas que se manejaron, con la finalidad de obtener los resultados en las mismas condiciones de trabajo.

Para la prueba de la Novobiocina se inoculó en condiciones asépticas una placa de gelosa sangre utilizando un hisopo estéril, el cual se humedeció con la suspensión, se quitó el exceso de caldo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo, haciendo un estriado cerrado y continuo para tener un inóculo uniforme, una vez seco, se procedió a colocar el disco de Novobiocina de 5µg.

El disco se tomó con pinzas estériles y colocándose sobre el medio, se presiona ligeramente para asegurar el contacto con la superficie.

En el caso de la prueba de la desoxirribonucleasa, se esterilizó un asa recta para tomar el inóculo del agar S-110, el cual se sembró por estría recta descargándolo con suavidad en la superficie del agar DNA, se invirtió la caja y se incubó a 37 °C durante 24 h.

Para llevar el inóculo de los microorganismos al cultivo semisólido que contiene el aminoácido L-ornitina se hizo de la misma manera que la prueba anterior, con la modalidad de introducir y depositar el inóculo dentro del medio semisólido.

B. Prueba de susceptibilidad

Para realizar la prueba de susceptibilidad se requirió de un cultivo en fase exponencial de crecimiento para tener a las células metabólicamente activas. Se emplearon los siguientes antimicrobianos a las concentraciones indicadas: Ampicilina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Ceftazidima (30µg), Cefuroxima (30 µg), Dicloxacilina (1µg), Eritromicina (15 µg), Gentamicina (10 µg), Pefloxacina (5µg), Penicilina (10 U), Tetraciclina (5µg) y Trimetoprim-sulfametoxazol (25µg).

En forma previa se resembraron en Agar BHI por agotamiento, las cepas en estudio con la finalidad de evitar falsos positivos por envejecimiento del cultivo.

Se tomaron con una asa de 1 a 2 colonias aisladas, se inocularon en 3 a 4 mL de caldo soya tripticasa, incubándose a 37 °C hasta que apareció una turbidez ligera (aproximadamente en 2h), la turbidez se ajustó con solución salina

Un hisopo estéril de algodón se humedeció con la suspensión antes mencionada, se quita el exceso de caldo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo, por arriba del nivel del caldo, se estrió el medio (Agar Muller-Hinton) en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie de agar, para obtener un inóculo masivo uniforme, se efectuó un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de Petri y el agar. Cuando el inóculo estuvo ha seco (3 a 5 minutos) se procedió a colocar el disco con los antibióticos.

Los multidiscos se tomaron con pinzas flameadas y se colocaron sobre del medio.

Después de 15 minutos de haber colocado los discos, invertir la caja de Petri e incubán a 37 °C, de 16 a 18 horas.

La medición de los distintos halos de inhibición se realizó con una plantilla diseñada para este propósito, viendo por el fondo de la caja que se iluminó con luz reflejada.

Las cepas se clasificaron en Resistentes (R), Intermedias (I), o Susceptibles (S), dependiendo del diámetro del halo de inhibición (incluyendo los 6 mm disco), según el antibiótico de que se tratataba y de acuerdo al inserto de la casa comercial de los Multidiscos para Gram Positivos empleados.

Capítulo V. Resultados.

De los 350 aislamientos de estafilococos en los tres diferentes centros hospitalarios, 10 resultaron ser ECP (*S. aureus*) al realizarles las pruebas bioquímicas de identificación y el resto ECN, los ECP sirvieron, a la vez, como control.

Como se puede ver en la tabla 1 y el gráfico No. 1, la procedencia de los aislamientos fue muy variada pero predominan los que proceden de catéteres y después con una gran diferencia, las procedentes de otros sitios anatómicos. Igualmente, la procedencia y el número de los aislamientos se observan en la tabla No. 1 y gráfico No. 1.

Tabla No. 1 Procedencia de las cepas de *Staphylococcus sp* aisladas de material de los diferentes centros hospitalarios.

Procedencia	Institución			Total
	INER	INNSZ	INP	
Catéter	21	50	83	154
Herida	2	32	14	48
Ex. Nasal	13	7	16	36
Tracto respiratorio inferior	19	4	8	31
Ex. vaginal	0	3	17	20
Sonda	3	11	1	15
Otras muestras	0	5	8	13
Diversas muestras	2	0	6	8
Otico	0	2	6	8
Urocultivo	0	8	0	8
Riñón	0	6	0	6
Tracto genital	0	2	1	3
Total	60	130	160	350

Abreviatura:

Ex.=Exudado

Otras muestras : Aspiración de peritono, aspiración percutánea, ectimangrenosa, fistula gástrica, gastrotomía, líquido sinovial, líquido de tambor y meningocele.

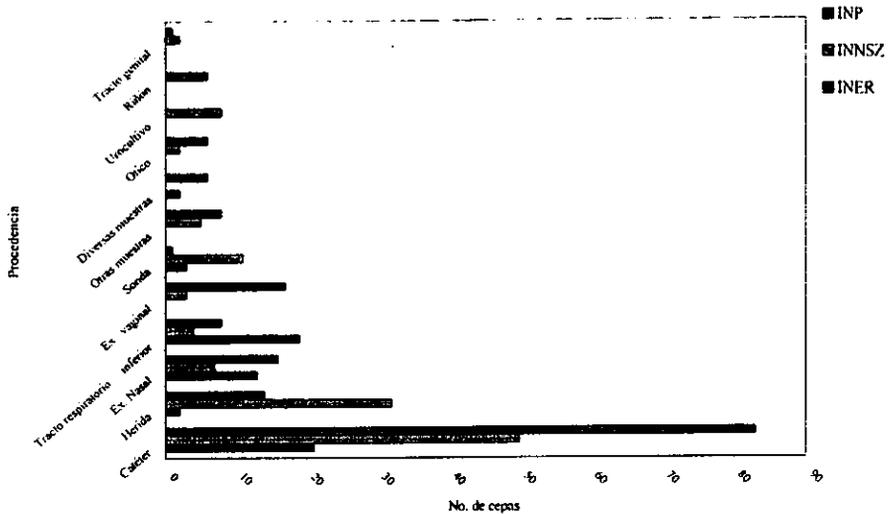
Diversas muestras: bucal, conjuntival, cultivo faringeo y traqueotomía.

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

INNSZ: Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubirán. "

INP : Instituto Nacional de Pediatría

Grafico No. 1 Procedencia de las 350 cepas de Staphylococcus sp aisladas de material clínico de las diferentes instituciones hospitalarias.



Las diez muestras de ECP se pudieron identificar como *S. aureus* y de las 340 cepas de estafilococos coagulasa negativa restantes se identificaron seis especies diferentes, siendo *S. epidermidis* la que predominó con un 81.18%.

Tabla No. 2.

Las seis especies de ENC se identificaron conforme a las pruebas bioquímicas que aparecen en la tabla A y que se diseñó tomando como base el esquema de Kloss y Bannerman; los resultados de dichas pruebas bioquímicas coincidieron en su totalidad con las señaladas en el esquema mencionado.

Tabla No. 2 Especies de *Staphylococcus* sp coagulasa negativa aisladas en los tres centros hospitalarios.

Especie	INER		INNYS		INP		Total	
	#	%	#	%	#	%	#	%
<i>S. auricularis</i>	0	0	0	0	5	3.14	5	1.5
<i>S. capitis</i>	0	0	0	0	1	0.63	1	0.30
<i>S. epidermidis</i>	40	80.00	100	76.92	136	85.00	276	81.18
<i>S. hominis</i>	9	18.00	26	20.00	17	10.62	52	15.00
<i>S. lugdunensis</i>	1	2.00	2	1.54	1	0.63	4	1.18
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	2	1.54	0	0	2	0.60
Total	50	100	130	100	160	100	340	100

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

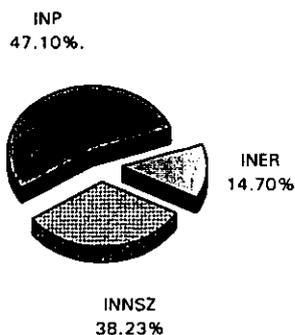
INNYS: Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubiran. "

INP : Instituto Nacional de Pediatría.

= número total de cepas encontradas.

El mayor número de especies (cinco) se identificó en las muestras provenientes del Instituto Nacional de Pediatría, aunque es importante señalar que fue de este centro hospitalario de donde se obtuvo el mayor porcentaje de muestras. Gráfico No. 2.

Gráfico No. 2
Frecuencia de estafilococos coagulasa negativa en los distintos hospitales.



En la tabla No. 3, se muestra la frecuencia y distribución de los estafilococos coagulasa negativa en todos aquellos casos en que se señala su presencia como integrantes de la flora habitual. En la tabla No. 4 se muestran los casos en que su presencia tiene significado clínico, pues en estos sitios pueden ser patógenos potenciales.

Tabla No. 3 Frecuencia y distribución de estafilococos coagulasa negativa.

Muestras donde se pueden considerar parte de la flora habitual.

Especie	Piel	Diversas muestras	Otíco	Exudados		Total
	Herida			Nasal	vaginal	
<i>S. auricularis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	39	6	8	33	17	103
<i>S. hominis</i>	8	0	0	3	3	14
<i>S. lugdunensis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	0	0	0	0
Total	47	6	8	36	20	117

Diversas muestras: bucal, conjuntival y traqueotomía.

Tabla No. 4

Muestras donde se podrían considerar patógenos potenciales.

Especie	Biomateriales		Tracto Respiratorio bajo	Riñón	Urocultivo	Tracto Genital	Otras	Total
	Catéter	Sonda						
<i>S. auricularis</i>	4	0	1	0	0	0	0	5
<i>S. capitis</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. epidermidis</i>	115	15	21	6	3	0	13	173
<i>S. hominis</i>	33	0	2	0	3	0	0	38
<i>S. lugdunensis</i>	1	0	0	0	0	3	0	4
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	0	0	2	0	0	2
Total	154	15	24	6	8	3	13	223

Otras: Aspiración de peritoneo, aspiración percutánea, ectima-gangrenosa, fistula, gastrotomía, líquido de tambor, líquido sinovial y meningoccle.

En la tabla No. 5 se muestran los resultados de porcentaje de resistencia obtenidos en los antibiogramas realizados a las 340 cepas.

Tabla No. 5

Porcentaje de resistencia de todas las cepas aisladas frente a los diferentes antimicrobianos.

ANTIBIÓTICO	<i>S. auricularis</i> n= 5		<i>S. capitis</i> n= 1		<i>S. epidermidis</i> n= 276		<i>S. hominis</i> n= 52		<i>S. lugdunensis</i> n= 4		<i>S. saprophyticus</i> n= 2	
	# de cepas	(%)	# de cepas	(%)	# de cepas	(%)	# de cepas	(%)	# de cepas	(%)	# de cepas	(%)
Ampicilina	5	100	1	100	271	98.18	52	100	4	100	2	100
Cefalotina	1	20	0	0	7	2.50	1	1.92	0	0	0	0
Cefotaxima	2	40	0	0	49	17.75	7	13.46	0	0	0	0
Cefazidima	5	100	1	100	258	93.48	44	84.62	3	75.00	2	100
Cefuroxima	2	40	0	0	51	18.47	6	11.54	0	0	0	0
Dicloxacilina	4	80	0	0	158	57.25	24	46.15	1	25.00	2	100
Eritromicina	4	80	1	100	209	75.72	37	71.15	3	75.00	2	100
Gentamicina	3	60	1	100	66	31.16	16	30.77	0	0	0	0
Peftoxacina	3	60	1	100	92	33.33	11	21.15	0	0	0	0
Penicilina	5	100	1	100	249	90.22	49	94.23	4	100	1	50
Tetraciclina	1	20	1	100	131	47.46	32	61.54	3	75.00	2	100
Trimetoprim-Sulfametoxazol	4	80	1	100	138	50.00	17	32.69	0	0	0	0

n= número total de cepas encontradas a las que se les realizó el antibiograma.

El porcentaje de resistencia a los doce antimicrobianos para cada una de las cepas encontradas se calcula de la siguiente manera, %Resistencia = # de cepas dividido entre el total de las cepas de la misma especie, el cociente se multiplica por 100.

Las primeras tablas del No. 6 al No. 13, comprenden los resultados de *S. epidermidis*, siguiendo *S. hominis* del No. 14 al No. 18, *S. lugdunensis* tabla No. 19, *S. saprophyticus* No. 20, *S. auricularis* No. 21 y por último, *S. capitis* No. 22.

Porcentaje de las cepas *Staphylococcus epidermidis* de acuerdo a su procedencia

Porcentaje de resistencia

Tabla No 6

Catéter.

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INER												
n = 11	100	0	0	63.63	100	63.63	63.63	18.18	18.18	81.81	18.18	63.63
INNSZ												
n = 38	100	0	0	100	13.75	57.89	94.74	13.15	21.05	92.10	65.79	0
INP												
n = 66	100	15.84	42.42	98.48	43.93	78.78	74.24	69.70	59.10	93.94	43.94	81.82

Tabla No 7

Sonda.

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INER												
n = 3	100	0	0	33.33	0	100	0	66.67	66.67	100	0	0
INNSZ												
n = 11	100	0	0	100	0	0	81.80	0	0	90.90	81.80	0
INP												
n = 1	100	0	0	100	0	100	0	100	0	100	100	0

Tabla No. 8

Tracto respiratorio inferior

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INER												
n = 12	100	0	81.82	90.90	0	72.73	27.27	0	0	100	0	81.80
INNSZ												
n = 3	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0
INP												
n = 5	80.00	0	40.00	100	40.00	80.00	60.00	20.00	60.00	100	60.00	60.00

Tabla No 9

Herida

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INER												
n = 1	100	0	0	100	0	100	100	100	0	100	0	100
INNSZ												
n = 24	100	64.30	0	100	64.70	29.16	100	0	4.16	45.83	62.50	0
INP												
n = 10	80.00	0	40.00	100	30.00	80.00	70.00	40.00	40.00	90.00	50.00	80.00

Tabla No 10

Ex. Nasal

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INER												
n = 13	100	0	53.84	100	61.53	84.61	53.84	53.84	84.61	100	0	46.15
INNSZ												
n = 5	100	0	6.25	100	0	7.70	100	0	0	100	23.07	0
INP												
n = 16	100	0	40.00	100	12.50	50.00	25.00	25.00	93.75	100	25.00	87.50

Tabla No 11

Oído

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INNSZ												
n = 2	50.00	0	0	100	13.75	0	50.00	0	0	100	65.79	0
INP												
n = 6	66.66	0	18.42	100	43.93	33.33	33.33	16.66	16.16	66.66	33.33	50.00

Tabla No 12

Riñón

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INNSZ												
n = 6	100	0	0	100	0	0	100	0	0	50.00	66.66	0
	Urocultivo											
n = 3	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	66.66	0

Tabla No 13

Ex. Vaginal

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INP												
n = 15	100	0	0	100	0	0	100	0	0	50.00	66.66	0
INNSZ												
n = 2	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	100	0

Antibióticos

AM	Ampicilina	ER	Eritromicina
CF	Cefalotina	GE	Gentamicina
CTX	Cefotaxima	PEF	Pefloxacina
CAZ	Ceftazidima	PE	Penicilina
CXM	Cefuroxima	TE	Tetraciclina
DC	Dicloxacilina	SXT	Trimetropim-sulfametoxazol

n = número total de cepas encontradas de *Staphylococcus epidermidis*.

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

INNSZ: Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubirán. "

INP: Instituto Nacional de Pediatría

Porcentaje de cepas de *Staphylococcus hominis* de acuerdo a su procedencia

Porcentaje de resistencia

Tabla No. 14

Antibióticos	Catteter											
	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INER n = 9	100	0	0	11.11	0	44.44	66.67	55.56	77.78	100	0	56.56
INNSZ n = 12	100	0	0	100	0	29.20	66.66	91.66	0	0	0	0
INP n = 12	100	0	50.00	100	41.57	50.50	50.00	66.66	25.00	91.67	33.33	58.33

Tabla No 15

Antibióticos	Ex. Nasal											
	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INNSZ n = 2	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	50.00	0
INP n = 1	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	100

Tabla No. 16

Antibióticos	Ex. Vaginal											
	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INNSZ n = 1	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	100	0
INP n = 2	100	0	0	100	0	100	50.00	100	50.00	100	50.00	100

Tabla No. 17

Antibióticos	Urocultivo											
	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INNSZ n = 3	100	0	0	100	0	0	100	0	0	33.33	100	0

Tabla No. 18

Antibióticos	Herida											
	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INNSZ n = 7	100	0	0	100	100	50.00	100	0	0	50.00	50.00	0

Antibióticos

AM	Ampicilina	ER	Eritromicina
CF	Cefalotina	GE	Gentamicina
CTX	Cefotaxima	PEF	Pefloxacina
CAZ	Ceftazidima	PE	Penicilina
CXM	Cefuroxima	TE	Tetraciclina
DC	Dicloxacilina	SXT	Trimetropim-sulfametoxazol

n = número total de cepas encontradas de *Staphylococcus hominis*.

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

INNSZ: Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubirán. "

INP: Instituto Nacional de Pediatría

Porcentaje de las cepas de *Staphylococcus lugdunensis* de acuerdo a su procedencia

Porcentaje de resistencia

Tabla No. 19

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INER	Catéter											
n = 1												
	100	0	0	100	0	0	0	0	0	100	100	0
INNSZ	Tracto genital											
n = 2												
	100	0	0	50.00	0	50.00	100	0	0	100	50.00	0
INP												
n = 1												
	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	100	0

n = número total de cepas encontradas de *Staphylococcus lugdunensis*.

Porcentaje de las cepas de *Staphylococcus saprophyticus* de acuerdo a su procedencia

Porcentaje de resistencia

Tabla No. 20

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INNSZ	Urocultivo											
n = 2												
	100	0	0	100	0	100	100	0	0	50.00	100	0

n = número total de cepas encontradas de *Staphylococcus saprophyticus*.

Porcentaje de las cepas de *Staphylococcus auricularis* de acuerdo a su procedencia

Porcentaje de resistencia

Tabla No. 21

Antibióticos	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
n = 1	100	20.00	25.00	100	50.00	75.00	75.00	75.00	50.00	100	25.00	75.00
INP	Catéter											
n = 4												
	100	0	25.00	100	50.00	75.00	75.00	75.00	50.00	100	25.00	75.00
n = 1	Tracto respiratorio inferior											
	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100

n = número total de cepas encontradas de *Staphylococcus auricularis*.

Porcentaje de las cepas de *Staphylococcus capitis* de acuerdo a su procedencia

Porcentaje de resistencia

Tabla No. 22

Antibióticos	Catéter											
	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	SXT
INP												
n = 1	100	0	0	100	0	100	100	100	100	100	0	0

n = número total de cepas encontradas de *Staphylococcus capitis*.

Antibióticos

AM	Ampicilina	ER	Eritromicina
CF	Cefalotina	GE	Gentamicina
CTX	Cefotaxima	PEF	Peftoxacina
CAZ	Ceftazidima	PE	Penicilina
CXM	Cefuroxima	TE	Tetraciclina
DC	Dicloxacilina	SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

INNSZ: Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubirán. "

INP: Instituto Nacional de Pediatría

En el tabla No. 23 se muestra la frecuencia de resistencia a los diferentes antibióticos enumerados de todas las cepas aisladas en cada uno de los centros hospitalarios.

Número de cepas de estafilococos coagulasa negativa resistentes de acuerdo al hospital.

Tabla No 23

	Antibióticos											
	AM	CF	CTX	CAZ	CXM	DC	ER	GE	PEF	PE	TE	STX
INER n= 50	49	0	0	34	0	34	26	16	11	48	50	31
INNSZ n= 130	130	0	0	130	0	47	122	5	0	107	95	0
INP n= 160	157	9	59	159	58	109	94	85	63	153	68	128

n es el número total de cepas encontradas

Capítulo VI. Discusión.

Por los resultados obtenidos se puede ver la participación de los estafilococos coagulasa negativa en las infecciones asociadas con catéteres venosos se ha incrementado de 20% a 65%, gracias a su capacidad de sintetizar glicocálix, que es el mecanismo de patogenicidad que les permite colonizar e infectar los biomateriales que forman estos cuerpos extraños (1,4).

Es evidente que las muestras provenientes de catéteres venosos son las que predominaron con 154 cepas aisladas de este material clínico, la mayoría provienen del Instituto Nacional de Pediatría con 83 aislamientos. Confrontando el número de cepas aisladas en el ensayo se tiene 44% (154/350); los datos de la literatura revisada, son similares. Tabla 1 y gráfico 1.

Los estafilococos coagulasa negativa son microorganismos que normalmente se encuentran en piel y membranas mucosas. En muchas ocasiones no se puede prever la introducción de estas bacterias a través de fisuras cutáneas y subcutáneas, la presencia de suciedad, cuerpos extraños (una astilla o un punto de sutura) y tejido desvitalizado pueden originar infecciones de las heridas. Esto puede explicar las 48 muestras clínicas con procedencia de heridas, en las tres instituciones. Tabla No.1 y gráfico No 1.

S. aureus y *S. epidermidis* son flora habitual del tracto respiratorio superior por lo que es común encontrar estas bacterias en el ámbito hospitalario sin interesar cuál sea la especialidad de la institución. En el presente trabajo, el Instituto Nacional de Pediatría se tiene aislamientos 16 y en el Instituto Nacional

de Enfermedades Respiratorias con 13 aislamientos de las 36 muestras clínicas.

Tabla No. 1.

En condiciones de salud el tracto respiratorio inferior es estéril y su invasión por estafilococos coagulasa negativa es por infecciones persistentes de las vías respiratorias, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas por consumo excesivo de tabaco (fumar), estancia hospitalaria y por inmunocompromiso.

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias se obtuvieron 19 aislamientos de este sitio anatómico, ya que este hospital atiende principalmente enfermedades del tracto respiratorio inferior y superior. Tabla No. 1 y gráfico No. 1.

Los estafilococos coagulasa negativa son miembros de la flora habitual en la vulva, vagina y cérvix, estos microorganismos pueden causar infecciones en la vagina con facilidad por los cambios hormonales en la mujer, mismos que dependen de la edad, aunque también influyen el pH y las alteraciones que produce la administración de antibióticos. La institución con más aislamientos es el Instituto Nacional de Pediatría con 17. Tabla No.1 y Gráfico No. 1.

En el rubro de "Otras muestras" quedan incluidos sitios anatómicos estériles en condiciones de salud, sin embargo los estafilococos coagulasa negativa pueden extenderse a otros órganos como el tracto digestivo inferior a partir de infecciones recurrentes en nasofaringe y en las amígdalas. La presencia de ECN en líquido sinovial proviene posiblemente de los puntos de sutura, que facilitan la adherencia y la colonización por dichos estafilococos.

Los aislamientos que se designaron "Diversas muestras" y "ótico" (Tabla No. 1), provienen de sitios en donde los estafilococos coagulasa negativa constituyen la flora habitual. Sin embargo, nariz y garganta en ocasiones pueden presentar lesiones que ayudan a difundir la infección desde una región a otra y esto sucede porque los órganos del sistema respiratorio bajo -antes mencionados- se unen con senos, tubo auditivo, oído medio y ducto nasolagrimal.

En un individuo sano la orina dentro de la vejiga es estéril, pero como ésta pasa a través de la uretra, la cual tiene flora residente, hace que la orina se contamine con un número pequeño de microorganismos ($< 10^{-3}$ CFU /mL). Si la infección es persistente, la propia flora habitual del paciente puede diseminarse y colonizar la región periuretral antes de ascender de la uretra hacia la vejiga vía los ductos de ureteros que transportan la orina -al ser la orina un buen medio de cultivo- desde los riñones hasta la vejiga urinaria. En las mujeres jóvenes y adultas sexualmente activas, los estafilococos coagulasa negativa presentan un marcado tropismo por el epitelio que este el cual tapiza el tracto urogenital, siendo *S. saprophyticus* el segundo uropatógeno responsable de infecciones agudas de tracto urogenital. En el Instituto Nacional de la Nutrición se aislaron dos cepas *S. saprophyticus* de las 8 muestras clínicas. Tabla No. 1 y gráfico No. 1.

Las infecciones de tracto genital se ocasionan por dos razones. Primero, el número elevado de microorganismos de flora habitual provenientes de tracto gastrointestinal los cuales pueden colonizar la región periuretral. Segundo, las infecciones de tracto urinario y enfermedades sexuales transmitidas, estas dos

son las más comunes en jóvenes y adultos, principalmente mujeres. La incidencia de infecciones en el tracto urogenital en los nosocomiales, es la misma tanto las mujeres como para hombres. En estas infecciones, se caracterizan por un factor predisponente. En INNER y INP en las dos instituciones se obtuvieron muestras de tracto genital, siendo el Instituto Nacional de la Nutrición en donde se encontraron 2 cepas. Tabla No. 1.

Del total de 340 aislamientos obtenidos en los tres hospitales —después de quitar los diez que se reconocieron con todas las pruebas conducentes como *S. aureus*, — se identificaron seis especies de estafilococos coagulasa negativa que fueron las siguientes *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* y *S. saprophyticus*, observándose también que el microorganismo más frecuentemente aislado fue *S. epidermidis* (Tabla No. 2), que corresponde al 81.18% del total de las cepas aisladas. Las demás especies mostraron frecuencias diferentes dependiendo del centro hospitalario.

En el Instituto Nacional de Pediatría se encontró el 47.10% de microorganismos aislados (Gráfico No. 2), pero hay que tomar en cuenta que la mayoría de muestras se obtuvieron de esta institución.

En la piel y las membranas mucosas se hospeda siempre una gran variedad de microorganismos, entre ellos los estafilococos coagulasa negativa que son los más comunes y pueden representar un 90% de la flora habitual y/o transitoria, actualmente son ya responsables de ocasionar numerosas enfermedades y con frecuencia se ha visto que pueden contaminar muestras clínicas obtenidas de diversas áreas del cuerpo humano. Tabla No. 3.

Existen diversas muestras clínicas en donde los estafilococos coagulasa negativa se pueden considerar como los probables agentes infecciosos debido a que provienen de sitios normalmente desprovistos de microorganismos (área normalmente estéril), su presencia puede deberse a la autoinoculación en el momento de la inserción de biomateriales, fisuras subcutáneas o cutáneas, mala asepsia de la piel, por administración de agentes terapéuticos, inmunocompromiso y hospitalización por períodos largos. Tabla No. 4.

Los estafilococos coagulasa negativa se han vuelto los microorganismos patógenos aislados más frecuentemente a partir de catéteres intravenosos. *S. epidermidis* es responsable de un índice alto de infecciones relacionadas con dichos catéteres intravasculares.

En el presente trabajo se identificaron dos cepas de *S. lugdunensis* aisladas del tracto genital (próstata y vagina). Se han reportado en la literatura algunos casos de infecciones en glándula de Bartholin o glándula vulvovaginal, situada en las partes laterales y profunda de la vulva y por último, un caso de perineocele (hernia entre el recto y la próstata o entre el recto y la vagina), en ambos casos se presentó inmunocompromiso previo. Estas infecciones no son muy comunes, es más frecuente que *S. lugdunensis* sea el causante de endocarditis destructiva, inclusive con tasas de mortalidad considerables ya que puede ocasionar infección tanto a válvulas naturales como artificiales.

Respecto a su comportamiento frente a los antimicrobianos, de las seis especies de ECN aisladas, fue *S. epidermidis* la que presentó la mayor resistencia a los doce antimicrobianos probados (Tabla No.5), le siguen *S. hominis*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. saprophyticus* y, por último, *S. lugdunensis*.

En el caso de las cefalosporinas, la ceftazidima ya no es útil para prevenir el desarrollo de infecciones estafilocóccicas, debido a su intensa promoción y utilización desde 1986 en los nosocomios; al igual que las penicilinas, pertenecen a los antimicrobianos β -lactámicos por lo tanto, es muy posible que se pueda dar resistencia cruzada por la presencia de isoenzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico.

Es importante señalar que cefalotina, cefotaxima y cefuroxima son los antimicrobianos ideales contra pacientes portadores de cepas MRSA y MRSE. Estas cepas resistentes a β -lactámicos tienen en su genoma plásmidos que codifican diferentes genes de resistencia para diversos antimicrobianos. Los resultados obtenidos en este trabajo son los siguientes: *S. auricularis* presentó 20% (1/5) de resistencia a cefalotina, 40% (2/5) de resistencia a cefotaxima y 40% (2/5) de resistencia a cefuroxima. *S. epidermidis* mostró 2.50% (7/276) de resistencia a cefalotina, 17.75% (49/276) de resistencia a cefotaxima y 18.47% (51/276) de resistencia a cefuroxima. *S. hominis* 1.92% (1/52) de resistencia a cefalotina, 13.46% (7/52) de resistencia a cefotaxima y 11.54% (6/52) de resistencia a cefuroxima, se puede observar que estas cefalosporinas aún pueden prever infecciones estafilocóccicas.

Respecto a tetraciclina y dicloxacilina, al parecer, ya no pueden evitar el desarrollo de los ECN. En estos últimos 6 años se ha incrementado en 85% la resistencia a tetraciclina y en 55% a dicloxacilina, según datos revisados en la literatura (1). Este comportamiento es similar al de las cepas aisladas en el presente trabajo, en el caso *S. auricularis* se presenta 80.00% de resistencia a dicloxacilina (4/5) vs 20.00% de resistencia a tetraciclina (1/5); *S. capitis* 0% de

resistencia a dicloxacilina vs 100% de resistencia a tetraciclina (1/1); *S. epidermidis* 57.25% de resistencia a dicloxacilina (158/276) vs 47.46% frente a tetraciclina (131/276); *S. hominis* 46.15% de resistencia a dicloxacilina (24/52) vs 61.54% frente a tetraciclina (32/52); *S. lugdunensis* 25.00% de resistencia a dicloxacilina (1/4) vs 75.00% de resistencia a tetraciclina (3/4) y para *S. saprophyticus* se encontró resistencia total a ambos antimicrobianos.

El porcentaje de resistencia a eritromicina es definitivamente muy elevado, posiblemente pueda estar determinado por la presencia de cepas de ECN que tienen en su genoma plásmidos los cuales pueden sintetizar metilasa para inactivar al antibiótico. Esto se puede reflejar en los datos obtenidos en cada una de las especies aisladas, para *S. auricularis* 80.00% (4/5) de resistencia, *S. capitis* 100% (1/1), *S. epidermidis* 75.72 % (209/276) *S. hominis* 71.15% (37/52), *S. lugdunensis* 75.00% (3/4) y para *S. saprophyticus* 100% (2/2).

Los estafilococos coagulasa negativa incrementaron en un 70.00% su resistencia a gentamicina entre 1987 y 1991 (1). Los resultados obtenidos en este trabajo ya muestran un comportamiento con tendencia a aumentar su resistencia como es el caso de *S. auricularis* con 60.00% (3/5) de resistencia, *S. capitis* 100% (1/1) de resistencia; en los casos de *S. epidermidis* y *S. hominis*, 31.16% (86/276) y 30.77% (16/52), respectivamente de resistencia. Tanto *S. lugdunensis* como *S. saprophyticus* aún siguen siendo susceptibles.

Al igual que la gentamicina, la pefloxacilina comparte el mismo mecanismo de resistencia que inactiva al fármaco y es transmitido por plásmidos, esto puede ser la razón del comportamiento muy semejante entre gentamicina y

pefloxacilina, inclusive frente a las mismas especies, *S. auricularis* con 60.00% (3/5), *S. capitis* con 100% (1/1), *S. epidermidis* con 33.33% (92/276) y *S. hominis* con 21.55% (11/52) de resistencia.

La combinación de trimetoprim-sulfametoxazol, ya no es eficaz para prevenir las infecciones estafilocócicas, algunos autores consideran que este comportamiento se debe a uso excesivo (1). Los resultados encontrados en el presente trabajo indican su uso indiscriminado así, se tienen los siguientes porcentajes de resistencia, *S. auricularis* con 80.00% (4/5), *S. capitis* con 100% (1/1), *S. epidermidis* con 50.00% (138/276) y *S. hominis* con 32.69% (17/52).

De *S. capitis* sólo se aisló una cepa y, como ya se ha mencionado, únicamente es susceptible a las cefalosporinas (cefalotina, cefotaxima y cefuroxima), esto sucede también para *S. lugdunensis* y *S. saprophyticus*. Estos dos últimos microorganismos aún siguen siendo susceptibles a los antimicrobianos de la familia de los macrólidos como la eritromicina y de los aminoglucósidos (gentamicina y pefloxacilina) y así como a trimetoprim-sulfametoxazol, tal vez esto se deba a la procedencia de la muestra y a la institución hospitalaria de donde provengan las muestras.

Existen diferentes factores que pueden contribuir a que las cepas sean más resistentes, como son: edad, inmunocompromiso, sitio anatómico, patrones de prescripción de antibióticos, presencia de cepas portadoras de plásmidos y el ambiente hospitalario.

Las cepas de estafilococos coagulasa negativa que son resistentes a los antibióticos son particularmente comunes entre la flora habitual de las personas que laboran en los hospitales, donde los antibióticos están en uso constante.

Todos los días, en los hospitales se distribuyen volúmenes sorprendentemente grandes de antibióticos en forma de aerosoles por la práctica universal del aclaramiento de aire en las jeringas, antes de una inyección. Cuando estos aerosoles se inhalan, generalmente en cantidades pequeñas, los estafilococos que residen en la nariz de las enfermeras, médicos, pacientes y de los mismos familiares, pueden desarrollar resistencia. Si estos microorganismos resistentes se transfieren a las heridas quirúrgicas y otros sitios expuestos, pueden ser los responsables de los problemas nosocomiales.

En el Instituto Nacional de Pediatría la edad de la población va desde recién nacido hasta 12 años. La piel de los bebés recién nacidos adquiere a los ECN como flora habitual rápidamente durante los primeros días después del nacimiento. De igual forma, después del nacimiento, la colonización bacteriana de la garganta ocurre de tal manera que se propician invasiones subsecuentes. Los recién nacidos, sobre todo los niños de bajo peso al nacer, son más susceptibles para adquirir infecciones estafilocócicas, pues no han alcanzado la madurez inmunológica. Las enfermedades que se presentan como consecuencia de esto, han incrementado el índice de morbilidad y directamente se asocian a una mortalidad del 14% (62,65). Un factor predisponente más, es la hospitalización por períodos largos, durante la cual es frecuente la inserción de catéteres intravasculares y el uso indiscriminado de antibióticos (1,12,29).

Los problemas postoperatorios que se presentan con mayor frecuencia provienen de la inserción de cuerpos extraños, en conjunto con la presencia de un sistema inmunocomprometido y de un tiempo prolongado de hospitalización,

esto último tiene gran impacto porque favorece el que las cepas adquieran resistencia a los antibióticos.

La interacción con la superficie (del catéter y/o sonda) y la producción de la capa limosa, puede convertir a los estafilococos coagulasa negativa en resistentes a la actividad antibiótica. Esta puede ser la explicación de la resistencia a los antimicrobianos de las cepas aisladas de ECN en las tres instituciones (Tabla No. 6 y No. 14, No. 21 y No. 22).

Las enfermedades por ECN en vías respiratorias son frecuentes en niños, por lo que reciben constantemente tratamiento con antimicrobianos. Esto ha provocado que se extiendan cepas MRSA y MRSE al ser los infantes portadores de las mismas en su nasofaringe y tráquea.

En el Instituto Nacional de Pediatría, cepas aisladas de tracto respiratorio inferior y exudado nasal fueron resistentes a la mayoría de los antibióticos y tan solo susceptibles a cefalotina. Es importante mencionar que la edad y enfermedades de larga duración son factores de riesgo para originar enfermedades nosocomiales. Tabla No. 8, No. 12 y No. 21.

Las cepas de *S. epidermidis* aisladas de exudado nasal provenientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias son resistentes posiblemente por ser cepas MRSE y estas son predominantes patógenos nosocomiales, sin embargo, actualmente hay muchos casos de infecciones por MRSE en la comunidad, al igual que en los nosocomios. Esto sugiere que estos microorganismos se han diseminado entre la población humana. En el Instituto Nacional de la Nutrición las cepas aisladas de este sitio anatómico presentan más

susceptibilidad, por ende, se trata de pacientes en quienes su flora habitual sigue siendo *S. epidermidis*.

Las cepas *S. hominis* aisladas de exudado nasal en el INNSZ y en el INP, en ambas instituciones son susceptibles y esto se pudiera deber a dos razones. Primero, los pacientes no son portadores de cepas MRSA y MRSE. Segundo, no hay administración excesiva de antimicrobianos. Al parecer en el Instituto Nacional de Pediatría el desacierto en la prescripción ha permitido la supervivencia de las cepas MRSE que además tienen genes de resistencia, inclusive al trimetoprim-sulfametoxazol un antimicrobiano que se consideraba de emergencia para prever la probabilidad de desencadenar resistencia.

Los resultados de susceptibilidad indican que las cepas de *S. epidermidis* del Instituto Nacional de Pediatría procedentes de heridas están siendo ya resistentes a varios agentes antimicrobianos incluyendo trimetoprim-sulfametoxazol. Este comportamiento sugiere que las cepas MRSA y MRSE pudieron haber estado presentes, porque estos microorganismos son también resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas y aminoglucósidos y también pudiera indicar que los pacientes han adquirido las infecciones estafilocócicas en la comunidad.

Las cepas de *S. hominis* aisladas del Instituto Nacional de la Nutrición procedentes de heridas, son susceptibles porque se trata de cepas que lo más probable es que no han adquirido el plásmido que codifica el gen Mec A.

La mayoría de aislamientos de cepas de *S. epidermidis* a partir de muestras clínicas que provienen del oído procedente del Instituto Nacional de Pediatría son resistentes (Tabla No. 11). La resistencia pudiera deberse a dos

Las cepas de *S. saprophyticus* provenientes de urogenital del INN son susceptibles, sin embargo, es muy probable que estas cepas que se aíslan frecuentemente en tracto urinario puedan ser resistentes en el ámbito hospitalario ya que las infecciones de dicho tracto son muy comunes en pacientes con algún factor predisponente en los nosocomios.

En el caso de *S. epidermidis* aislados de riñón, también son susceptibles, esto indica que los pacientes no presentan infecciones recurrentes asociadas con hemodiálisis o diálisis, por lo tanto, no transportan cepas de ECN resistentes a los diferentes antimicrobianos. (Tabla No. 12).

En el caso de la mayoría de las cepas de *S. lugdunensis* aisladas del tracto genital procedentes del Instituto Nacional de la Nutrición y en el Instituto Nacional de Pediatría (Tabla No.19 y No. 20) presentan susceptibilidad. A través de un estudio de producción de penicilinas y susceptibilidad *in vitro* de *S. lugdunensis* se encontró que en 59 aislamientos clínicos, el 76.% fueron β -lactámicos negativos y el 24% β -lactámicos positivos y todas las cepas fueron susceptibles a cefalotina, gentamicina, eritromicina y vancomicina (13).

En la tabla No. 23 se puede ver que en el Instituto Nacional de Pediatría es donde se presenta mayor resistencia a los antimicrobianos. También se observa que frente a penicilina y ampicilina las cepas tienen un comportamiento de resistencia similar en las tres instituciones. Con respecto a la ceftazidima en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias se encontró una resistencia de 68.00% (34/50), en comparación con el Instituto Nacional de la Nutrición con 100% y con Instituto Nacional de Pediatría de un 98.38%. No obstante que cefalotina, cefotaxima y cefuroxima son de uso relativamente reciente, las cepas

aisladas en el Instituto Nacional de Pediatría ya están presentando resistencia 5.62% (9/160), 36.87% (59/160) y 36.85% (58/160), respectivamente.

La resistencia cruzada disminuye la eficacia de los antimicrobianos para el tratamiento de las enfermedades estafilocócicas. Esta puede ser la razón de la resistencia a dicloxacilina y tetraciclina.

Son pocas las cepas que muestran resistencia a eritromicina en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con respecto al Instituto Nacional de la Nutrición y al Instituto Nacional de Pediatría -52.00%- dato muy semejante a lo mencionado en la literatura (53.00%), la cual también reporta que un 37.00% de *S. epidermidis* tiene en su material genético el gen *msr A* que codifica la proteína que inactiva a este antimicrobiano.

Para prevenir que las cepas MRSE y MRSA se puedan diseminar de paciente a paciente, lo más importante es el manejo adecuado de pacientes portadores de dichas cepas por enfermeras y médicos quienes deberían usar guantes y cubre bocas.

Conclusiones

1. Las pruebas empleadas en el esquema de identificación utilizado, permitieron caracterizar el 100 % de las cepas, por lo que el método demostró ser adecuado para identificar *Staphylococcus* aislados de muestras clínicas.
2. En México se desconoce qué especies de estafilococos coagulasa negativa se encuentran en personas aparentemente sanas y cuáles son las aisladas del material clínico de pacientes con problemas infecciosos, este trabajo permitió conocer las que están presentes en un cierto núcleo de la población.
3. En el presente trabajo se encontraron seis especies diferentes de *Staphylococcus* coagulasa negativa, por lo que es conveniente eliminar la creencia subjetiva de que *S. epidermidis* es el único que puede ser el agente etiológico en procesos infecciosos.
4. Aún cuando se aislaron pocas cepas de *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. saprophyticus* y *S. lugdunensis*, se puede ver que ya están presentes en los nosocomios.
5. Es necesario llevar a cabo estudios en los que se correlacionen la especie aislada, su fuente de aislamiento y su posible participación como agente etiológico en infecciones nosocomiales.
6. En la actualidad, los estafilococos coagulasa negativa se consideran agentes etiológicos oportunistas y ubicuotas, con capacidad para

elaborar una biopelícula adherente, de naturaleza polisacárida, que contribuye a su patogenicidad.

7. Es imperativo realizar una prueba de sensibilidad del microorganismo patógeno para seleccionar el medicamento apropiado.
8. No deben usarse antimicrobianos indiscriminadamente y las concentraciones empleadas siempre deberán ser las dosis óptimas para que se minimicen las oportunidades de supervivencia de mutantes resistentes.
9. El administrar un antibiótico puede deprimir tanto la reacción inflamatoria como la respuesta inmunitaria y, consecuentemente conducir a una susceptibilidad aumentada a la infección y una respuesta disminuida a los antimicrobianos.
10. Los antimicrobianos no sólo afectan a los microorganismos patógenos sino también a los de la flora habitual provocando un desequilibrio microbiano lo cual conduce a la infección. Esta situación primordialmente sucede con pacientes hospitalizados, en quienes los estafilococos coagulasa negativa pueden ocasionar graves infecciones mostrando además, resistencia a un espectro amplio de antibióticos y con ello apareciendo los brotes nosocomiales.
11. El exceso de duración de la estancia hospitalaria puede ser responsable de un mayor número de enfermedades estafilocócicas, siendo así una causa importante de morbilidad.
12. La dificultad para controlar las infecciones intrahospitalarias, se debe a la resistencia a varios agentes antimicrobianos.

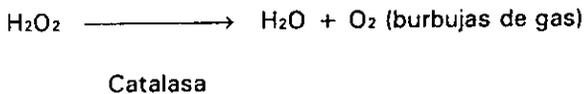
13. Una implicación clínica de los plásmidos es que, en las cepas de estafilococos coagulasa negativa, ocasionan que el tratamiento con un solo antibiótico no sea eficaz.
14. Una forma alternativa para reducir el hecho de que las cepas desarrollen resistencia a un antibiótico es administrar simultáneamente dos antimicrobianos.
15. La presencia de cepas MRSA y MRSE sugiere transmisión cruzada tanto en pacientes externos como internos. Los principales sitios de infección incluyen biomateriales (catéteres, sondas, cánulas, prótesis y válvulas mitrales), heridas y el tracto respiratorio bajo y alto.
16. Las cepas MRSA y MRSE hoy en día son persistentes y se han hecho endémicas en los centros de salud, los resultados hacen suponer que en un futuro no lejano puedan mencionarse cepas metilina resistente entre los otros estafilococos coagulasa negativa.

Anexo 1

Pruebas bioquímicas

Prueba de la Catalasa.

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos. Si se acumula, es letal para las células bacterianas. La catalasa actúa como se muestra en la siguiente reacción química:



Procedimiento

Prueba en portaobjetos

De manera aséptica transferir células desde el centro de una colonia bien aislada a la superficie de un Portaobjetos de vidrio con una asa de inoculación. De manera paralela, tener como control positivo una cepa de *S.aureus* ATCC 25973.

Agregar una o dos gotas de H₂O₂ al 3% y observar el desprendimiento de burbujas para una prueba positiva.

Prueba de la Coagulasa.

Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezcla con igual cantidad de plasma en un tubo de ensayo, se forma un coágulo visible como resultado de la utilización de los factores plasmáticos de coagulación.

Procedimiento

En forma aséptica, se colocan 0.5 mL de plasma humano en el fondo de un tubo de ensayo estéril. Se agregan 0.5 mL de cultivo puro de 24 horas del microorganismo. De manera similar, se debe disponer de un tubo control negativo al cual no se adiciona plasma. y un tubo control positivo en las mismas condiciones que la muestra de estudio, pero inoculado con la cepa de *S. aureus* ATTC 25973.

Se mezcla con suavidad rotando el tubo, teniendo precaución de no sacudir la mezcla.

Se coloca el tubo en una gradilla y se incuba a 37 °C observándolo cada 30 minutos durante 4 horas. Las cepas coagulasa positiva por lo general producen un coágulo visible entre una o cuatro horas. Si el tubo de ensayo continúa siendo negativo después de este tiempo se deja a hasta 24 horas.

Debido a que la bacteria puede producir enzimas fibrinolíticas, los coágulos formados después de 4 horas pueden disolverse si la incubación es prolongada. La incubación de los tubos coagulasa negativa durante la noche, permite la detección de cepas de producción lenta de coagulasa.

Prueba de las Descarboxilasas.

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas sustrato-específicas capaces de reaccionar con la porción carboxilo (COOH) de los aminoácidos formando aminas de reacción alcalina. Esta reacción, conocida como descarboxilación, forma dióxido de carbono (CO₂) como producto secundario. Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y sus respectivos productos de descomposición son los siguientes:

lisina → cadaverina

ornitina → putrescina

arginina → citrulina

Descarboxilasas de L-ornitina

El medio MIO contiene L-ornitina para determinar la capacidad de descarboxilación de los estafilococos. De manera paralela, se debe disponer de un tubo control negativo que consiste sólo en la base (elaborado por componentes) sin el aminoácido y un control positivo que consiste en una cepa

con la capacidad enzimática. Ambos tubos, así como el problema, se incuban de forma anaerobia cubriéndolos con aceite mineral. Durante los estadios iniciales de incubación, los dos tubos se vuelven amarillos debido a la fermentación de la pequeña cantidad de glucosa en el medio. Si el aminoácido es descarboxilado, se forman aminas alcalinas y el medio revierte a un color púrpura oscuro.

Procedimiento

A partir de una colonia aislada del microorganismo en estudio, se inocula un tubo con medio MIO. De manera paralela, se debe tener tubo de control negativo al cual no se adiciona L-ornitina y en el tubo control positivo que se inocula con cepa de *Enterobacter cloacae* ATTC 29971.

Se cubren los tubos con aceite mineral estéril hasta 1 cm por encima de la superficie y se incuban a 35°C durante 18 a 24 horas.

Prueba de la Utilización de la Arginina.

La conversión de arginina en citrulina es una reacción de dihidrolasa más que de descarboxilasa, en la cual se elimina un grupo NH_2 es removido de la arginina.

El procedimiento es el mismo que el del aminoácido L-ornitina.

Prueba de la Desoxirribonucleasa.

La presencia de ácido desoxirribonucleico se detecta en agar para DNAsa con 0.001 % de azul de O-toluidina. A medida que el microorganismo crece y produce DNAsa, el agar que rodea las colonias de las bacterias cambia de color azul a rosa, lo que indica la hidrólisis del ADN.

Procedimiento

En forma aséptica, se siembra en estría recta una sección de la placa del agar DNAsa y se incuba a 37 °C durante 24 horas. De manera semejante se tiene una placa control negativo de (*S. epidermidis* ATCC 12228) y un control positivo (*S. aureus* ATCC 25973).

Prueba de la Fermentación de los Hidratos de Carbono.

El término fermentación se usa para referirse a la utilización de hidratos de carbono por parte de las bacterias. Por definición, la fermentación es un proceso metabólico de oxidorreducción que ocurre en medio ambiente anaerobio y, en lugar de O₂, un substrato orgánico sirve como el aceptor final de hidrógeno (electrones). En los sistemas de prueba bacteriológicos este proceso se detecta observando cambio de color con el indicador rojo de fenol, que cambia a color amarillo para la disminución de pH a medida que se forman productos ácidos.

Procedimiento

En forma aséptica, se depositan 3.0 mL de caldo básico rojo de fenol adicionado en forma individual cada uno de los carbohidratos en un tubo de ensayo.

Se agregan 0.5 mL de cultivo puro de 24 horas del microorganismo en solución isotónica. De manera semejante, se tiene un tubo control negativo al cual no se adiciona carbohidrato y un tubo control positivo con cada uno de los carbohidratos que está en las mismas condiciones que la muestra de estudio, pero inoculado con una cepa de *S. aureus* ATTC 25798.

Se incuba a 37 °C durante 24 horas.

Los distintos carbohidratos que se adicionan son los siguientes.
--

Lactosa

Maltosa

Manitol

Manosa

Sacarosa

Trealosa

Prueba de la Producción de Acetoína

El ácido pirúvico, un compuesto fundamental formado en la degradación fermentativa de la glucosa, se metaboliza a través de cierto número de vías metabólicas, según los sistemas enzimáticos de las diferentes bacterias. Una de

estas vías da como resultado la producción de acetoína (acetil-metil carbinol), un producto final de reacción neutra. En presencia de oxígeno (O₂) atmosférico e hidróxido de potasio (KOH) la acetoína se convierte en diacetilo y el α -naftol sirve como catalizador para producir un complejo de color rojo.

Procedimiento

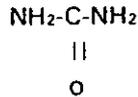
En forma aséptica, se depositan 3.0 mL de caldo MR/VP en un tubo de prueba estéril.

Se agregan 0.5 ml de cultivo puro de 24 horas del microorganismo en solución isotónica. De manera paralela, se debe disponer un tubo control negativo al cual no se adiciona glucosa y un tubo control positivo que está en las mismas condiciones que la muestra de estudio, pero inoculado con la cepa de *S. epidermidis* ATTC 12228.

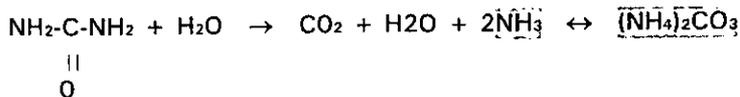
Se incuba a 37 °C durante 24 horas. Luego de este lapso, se pasa una alícuota del caldo a un tubo de ensayo estéril así mismo como a los tubos controles. Se agrega una gota de α -naftol al 5%, seguida por una gota de KOH al 40%. El tubo se agita suavemente para exponer el medio al oxígeno (O₂) atmosférico; luego se dejan reposo durante 15 minutos. La aparición de color rojo.

Prueba de la Ureasa (Caldo de Christsensen).

La urea es una diamina de ácido carbónico con la formula



La ureasa es una enzima que posee muchas especies de microorganismos que tienen la capacidad de hidrolizar la urea siguiendo la reacción química:



Todas las amidas se hidrolizan fácilmente con la liberación de amoníaco el cual reacciona en solución para formar carbonato de amonio, lo que como resultado que el medio sea alcalino y este incremento de pH en el medio se observa por el cambio de color amarillo originalmente a un medio de color rosa.

Procedimiento

En forma aséptica, se depositan 3.0 mL de caldo urea en un tubo de ensayo estéril.

Se agregan 0.5mL de cultivo puro de 24 horas, del microorganismo en solución isotónica. Se incuba a 37 °C durante 24 horas. De manera similar, se debe dispone de un tubo como control negativo al cual no se le adiciona urea y un tubo control positivo que está en las mismas condiciones que la muestra en estudio, pero inoculado con la cepa de *S. aureus* ATTC 25973.

Hemólisis.

Cuando crecen los estafilococos en agar sangre desfibrinada (agar de tripticasa soya con 5% eritrocitos de carnero) se puede poner de manifiesto las cepas productoras de hemolisinas; las cuales forman alrededor de las colonias una zona traslúcida lo que indica lisis celular.

Prueba de susceptibilidad a la Novobiocina.

La prueba se realiza para mostrar la susceptibilidad de un microorganismo a la novobiocina. Dicho antibiótico pone a prueba la fragilidad de la membrana celular bacteriana. La mayor parte de las cepas de *Staphylococcus saprophyticus* son resistentes a la novobiocina, característica que se ha utilizado para diferenciarlo de *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa negativos que son sensibles.

La prueba de susceptibilidad a la novobiocina es un método confiable para la identificación presuntiva de *S. saprophyticus*. Aunque existen dos especies estafilocócica coagulasa negativas (*S. cohnii* y *S. xylosus*) que también son resistentes a la novobiocina, pero que no se encuentran con frecuencia en muestras clínicas.

Procedimiento

Para realizar la prueba se prepara una suspensión similar a la que da el estándar 0.5 de la escala de McFarland, se sumerge un hisopo estéril que se humedece con dicha suspensión, se quita el exceso del caldo presionando y girando el hisopo

sobre la pared interna del tubo, enseguida en la superficie de la caja con medio, se hace un estriado continuo para tener un inóculo uniforme. Entonces se coloca un disco con 5 µg de novobiocina sobre el inóculo, se invierte la caja Petri y se incuba a 35 °C durante 24 horas. De manera similar se corre el control negativo que es una cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 y/o *S aureus* ATCC 25973. Las cepas resistentes, como *S. saprophyticus*, mostrarán una zona de inhibición ≤ 16 mm. Mientras que los estafilococos susceptibles presentarán zonas de 17 a 27 mm.

Anexo 2

Reactivos.

1) Prueba de la catalasa

Peróxido de hidrógeno 30 mL

Agua destilada 1000 mL

Se mide la cantidad indicada de peróxido de hidrógeno y se mezcla perfectamente con el agua destilada.

2) Producción de acetoína.

α -naftol 5.0 g

Etanol 100.0 g

Agua destilada 100.0 g

Hidróxido de potasio 40.0 g

Agua destilada 100.0 g

Se prepara una solución etanólica al 5% de α -naftol (no usar después de 48 horas) y una solución al 40% de hidróxido de potasio.

3) Reducción de nitratos.

Reactivo A:

Acido sulfanílico 8.0 g

Ac. acético 5N, 30 % 2,000 mL

Se disuelven 8 g de ácido sulfanílico en 1000 mL de ácido acético 5N.

Reactivo B:

α -naftilamina 5.0 g

Ac. acético 5N, 30 % 2,000 mL

Se disuelven 5 g de α -naftilamina en 1,000 mL de ácido acético 5N.

4) Reactivo para la densidad 0.5 de la escala de McFarland.

El estándar se prepara mezclando 0.5 mL de BaCl_2 0.048M (1.175% peso /volumen de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) con 99.5 mL de H_2SO_4 al 1 % v/v (0.36N), que es la mitad de la densidad de la escala 1 de MacFarland, (se denomina frecuentemente escala 0.5 de MacFarland), esta solución corresponde aproximadamente 10^8 microorganismos por mL.

Bibliografía

- 1 - Archer L. Gordon. and Michael W. Climo "Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci*" J.Clin.Microbiol.38/2:2231-2237 (1994).

2. - Atkins L. Bridget, Nicholas Athanasou, Jonathan J. Deeks, Derrick W. M. Crook, Hasmish Simpson, Timothy E. Peto, Peter Mclardy- Smith, Anthony R. Berendt, and The Osiris Collaborative Study Group "Prospective evaluation of criteria for microbiology diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty" J.Clin.Microbiol.36/10:2932-2939 (1998).

3. - Bannerman L. Tammy, Karl T. Kleeman, and Weslye E. Kloss "Evaluation of the Vitek system Gram-positive identification card for species identification of coagulase-negative *Staphylococci*" J.Clin.Microbiol.31/5:1322-1325 (1993).

4. - B. Peter and Michael S. Nauri.
BERGEY 'S MANUAL OF SYTEMATIC BACTERIOLOGY
Chap. 12 "Gram-positive cocci"
Vol. two
Ninth Edition
Williams and Wilkins
U.S.A (1996).

5. - Bhakdi S. A. Valeva, Walev A. Zitzer and M. Palmer "Pore-forming bacterial cytolysins" J. Applied.Microbiol./Suppl 84:15-25 (1998).

6. - Braude Abraham, Charles E. and Davis Joshua Fiere
ENFERMEDADES INTRAHOSPITALARIAS
Primera Edición
Editorial Médica Panamericana,
Argentina (1984).

7. - Burriel A. R. "Resistence of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from sheep to various antimicrobial agents" Res. Vet. Sci. 63/2/:189-190 (1997).

8. - De Hondt G., Leven M. Vandermersch and Colaert J. "Destructive endocarditis caused by *Staphylococcus lugdunensis*" J.Hosp.Infect. 52/1/:27-30 (1997).

9. - De Robertis, Hib Ponzio.
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
Cap.6 "Membranas y señales intracelulares"
12° Edición
Editorial El Ateneo
Argentina (1996).

10. - Domaracki B.E., Evans A, Preston K.E, Fraimow H., Venezia R.A.
"Increased oxacillin activity associated with glycopeptide in coagulase-negative *Staphylococci*." Eur.J.Clin. Microbiol.Infect.Dis. 17/3/:143-150 (1998).

11. - Egebo K., P. Toft and C. J. Jackobsen "Contamination of central venous cathetheres. The skin insertion wound is a major source of contamination" J.Hosp.Infect. 32/2/:99-104 (1996).

12.- Entanza M. José, Ursula Fluckiger, Michael P. Glad and Philippe Morcillon "Antibiotic treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*" J.infect.Dis.170/:100-109 (1994).

13. - Fleurette J, M., Brun, Y.,J. Freney J. M. Coulet., M.E. Reverdy and J. Etienne "Clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis* and *S. schleiferi*: bacteriological characteristics and susceptibility to antimicrobial agents." J.infect. Dis. 140/2/:107-118 (1989).

14. - Foster J. Timothy and Magnus Höök "Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus* " Trends Microbiol.6/12/:484-488 (1998).

15. - Francois Patrice, Pierre Vaudaux, Timothy J. Foster and Daniel P. Lew "Host-bacteria interactions in foreing body Infections" Infect. Control.Hosp.Epidemiol.12/8/:514-520 (1996).

16 Gale A. Abigail and Dixie D. Whitt
BACTERIAL PATHOGENESIS AND MOLECULAR APPROACH
Eighth Edition
American Society for Microbiology
Washigton (1994).

17. - Gerke C., A. Kraft, and R. Sussmuth "Characterizacion of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *S. epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin" J.Biol.Chemother.273/29/:18586-18593 (1998).

18. - Giese C. Arthur.

FISIOLOGIA CELULAR Y GENERAL

Cap. 3 "Componentes celulares"

4° Edición

Editorial Interamericana

México D.F (1983).

19. - Gibs Gilbert, D.J. Evans and M.R. Brown "Formation and dispersal of bacterial biofilms *in vivo* and *in situ*" J.Applied Bacteriol. /Suppl 74/: 67-78 (1993).

20.- Grattard Florence, Etienne Jerame, Pozzeto Bruno, Tardy Frederique, Gaudin G. Odette and Fleurette Sean "Characterization of unrelated strains of *Staphylococcus schleiferi* by using ribosomal DNA fingerprinting, DNA restriction patterns, and plasmids profiles " J.Clin.Microbiol. 31/4/:812-818 (1993).

21.- Gunter Kamp, Lecke Crutoph, Cimbak Katrin, and Weist Klaus "Evaluation of manitol salt agar for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by diffusion and agar screening" J.Clin. Microbiol. /36/8/:2254-2257 (1998).

22 - Hedchline T.E., J. Barnishan, L.W. Ayers and R.J. Fass. "Penicillinase production and *in vitro* susceptibilities of *S. lugdunensis*" J.Antimicrobiol. Chemother. 34/12/:2439-2435 (1990).

23.- Hedrick Eddie, Patrick Joseph, Katherine West and Janet Frank " Hospital Infection Control " American Health Consultants 1/13/:1-6 (1997).

24.- Hedrick Eddie, Patrick Joseph, Katherine West and Janet Frank "Hospital Infection Control" American Health Consultants. 1/14/:1-12 (1997).

- 25.- Hedrick Eddie, Patrick Joseph, Katherine West and Janet Frank "Hospital Infection Control" American Health Consultants .1/15/:1-10 (1997).
- 26.- Hedrick Eddie, Patrick Joseph, Katherine West and Janet Frank "Hospital Infection Control" American Health Consultants .1/17/:1-7(1997).
27. - Hussain Muzaffar, Mathias Harmann, Françoise Christof von Eiff, Remington Perdreau and Peter Georg "A 140 Kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces" J.Clin.Microbiol. 65/2/:519-524 (1997).
- 28.- IZARD C. Nuria, HÄCHELER HERBERT., MICHAEL GREHN and FRITZ H KAYSER. "Ribotyping of coagulase-negative *Staphylococci* with special emphasis on intraspecific typing of *Staphylococcus epidermidis*" J.Clin.Microbiol. 30/4/:817-823 (1992).
- 29.- Jarlov J.O., T. Højbjerg, C. Busch Sørensen, J. Scheibel, J.J. K. Møllerg, J.J. Kolmos and D.A. Wandalt. "Coagulase-negative *Staphylococci* in Danish blood culture species distribution and antibiotic susceptibility." J.Hosp. Infect. 32/:217-227 (1996).
- 30.- Kacica A. Marilyn, Michael J. Horgan, Karen E. Preston, Martha Lepow, Richard A. Venezia "Relatedness of coagulase-negative *staphylococci* causing bacteremia in low-birthweight infants" Infect.Control.Hosp. Epidemiol.15/:658-652 (1994).
- 31 - Kamath Usha, Carol Singer and Henry A. Isenberg " Clinical significance of *Staphylococcus warneri* bacteremia " J.Clin.Microbiol. 3/:261-264 (1992).
- 32.- Kansenshogaku Zasshi. "Adherence ability of *Staphylococcus* coagulase-negative catheter materials" J.Clin.Microbiol. 64/12/:1542-1549 (1990).

33.- Kawamura Yoshiaki, Xiao-Gang Hou, Ferdousi Sultana, Kenji Hirose, Masaki Miyake, Sin-Ei Shu, and Takayuki Ezaki. "Distribution of *Staphylococcus* among human clinical specimens and emended description of *Staphylococcus caprae* " J.Clin.Microbiol. 36/7/:2038-2042 (1998).

34.- Kleeman T. Karl, Tammy L. Bannerman, and Wesley E. Kloss "Species distribution of coagulase-negative isolates at a community hospital and implications for selection of identification procedures" J.Clin.Microbiol. 31/5/:1318-1321 (1993).

35.- Koneman W. Elmer, Stephen D. Allen, V.R. Dowell Jr; William M. Janda, Herbert M. Sommers, Washington C. Winn, Jr.

COLOR ATLAS AND TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY.

Third edition.

J.B. Lippincott Company.

Philadelphia (1988).

36.- Lamber D.W. Jr, K.P. Ferguson, J.L. Keplinger, C.G. Gemmell J.H. "Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, and three other coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence factors." Can.J. Microbiol.36/7/:455-463 (1990).

37.- Lennete, E.H., Albert R. Balows, and Hermann L.Kenne

MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY

Cap. 22 "*Staphylococcus* and *Micrococcus*"

Fifth edition.

American Society for Microbiology U.S.A (1995).

38.- Leung J. Michael, Nichalas Nuttall, Todd M. Pryce, Geoffrey W. Coombs and John W. Pearman "Colony variation in *Staphylocococcus lugdunensis* " J.Clin.Microbiol. 36/10/:3096-3098 (1998).

39.- Lew M. Hermann; S.J. Suchard; L.A. Baxer and F.A. Waldvogel "Thrombospondin binds to *Staphylococcus aureus* and promotes *Staphylococcal* adherence to surfaces" Infect.Immun. 59/1/:279-288 (1991).

40.- McDonald L. Clifford and Kimberle Chapin "Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture bottles by classic 2-hour tube coagulase test" J.Clin.Microbiol. 33/1/:50-50 (1995).

41.- Mahoudeau Isabelle, Xavier Delabranche, Gilles Prevost, Henrii Montiel and Yves Piemont "Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans" J.Clin.Microbiol. 35/8/:2153-2154 (1997).

42.- Martineau Francis, Francois J. Picard, Paul H. Roy, Marc Ouellette and Michel G. Bergeron "Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*" J.Clin.Microbiol. 34/12/:2888-2893 (1996).

43.- Martineau Francis, Francois J. Picard, Paul H. Roy, Marc Ouellette and Michel G. Bergeron "Species- specific and ubiquitous- DNA-based assays for rapid identification of *Stapylococcus aureus*" J.Clin.Microbiol. 36/3/:618-623 (1998).

44.- Mini Nobili and S.P. Periti " Methicillin-resistant *Staphylococci* in clean surgery. Is there a role for prophylaxis? " Drugs 54/Suppl 6/:39-52 (1997).

45.- Modun B. Evanns, R.W. Joannou and Peter Williams "Receptor-mediated recognition and uptake of iron from human transferrin by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*" Infect. Immun. 66/8/:3561-3596 (1998).

46.- Mizushima Kawasaki, A. H. Hirata, Y. Daimon, R. Oosaki, S. Moriga and M. Kobayashi "An analysis of bacteremia in a university hospital in Japan over 10 year period" J. Hosp.Infect. 28/4/:285-298 (1995).

47- Murray Patrick R., Ellen Jo Baron, Michael A. Pfaller and Robert Yolken

MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY

Chap. 19 "*Staphylococcus*"

Second Edition

Harcourt Company

Washigton (1997).

48. Nouwen L. Jan, Alex van Belkum, Marie de Siem, Jacqueline Sluijjs, Jenne J. Wielenga and Henri A. Verbrugh "Clonal expansion of *Staphylococcus epidermidis* strains causing Hickman catheter related infections in a hemato-oncologic department " J.Clin.Microbiol. 36/9/:2696-2702 (1998).

49.- Ortiz de la Tabla V., F. Gutierrez-Rodero , Martin C. Zorraquino, A. Belinchon "*Staphylococcus lugdunensis* as a cause of abscesses in the perineal area" Eur.J.Clin.Microbiolo.Infect.Dis. 15/5/:405-407 (1996).

50.- Petrillo V. F., O.B. Piltcher and N.M. Kuplich "Hospital-acquired infection and emotional depression " (letter) J.Hosp.Infect. 27/2/:155-158 (1994).

51.- Platt R. William

ATLAS DE HEMATOLOGIA EN COLOR

Segunda Edición

Editorial JIMS

Barcelona (1984).

52.- Ponce De León R. Samuel, José Luis Soto H.

INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS

Sexta Edición

Mc. Graw, Interamericana Editores S.A. de C.V.

México D.F. (1996).

53- Proctor R.A., A. Andremont, C. Trancrede and J.F. Desnottes
"Fibronectin-staphylococcal interactions in endovascular infections"
J.Hosp.Infect./274/3/342-349 (1990)

54.- Ramsey E.S. and B.W. Lytle "Repair *Staphylococci* aortic prosthetic
valve endocarditis associated with periannular abscess" J.Heart Valve Dis.
7/2/235-239 (1998).

55.- Rupp E. Mark, David E. Soper, and Gordon L. Archer
"Colonization of the female genital tract with *S. saprophyticus*" J.Clin.Microbiol.
30/11/2976-2979 (1992).

56.- Ryan-Poireir Kathleen and Christian C. Patrick "Cervical adenitis
caused by *Staphylococcus epidermidis* " J.Clin.Microbiol. 31/2/426-427 (1993).

57.- Schwab Thiel, H.J. Steuhl and G. Doering "Binding of
Staphylococcus epidermidis to fibronectin and glycolipids on corneal surfaces"
Ger.J.Ophthalmol. 5/6/471-421 (1996).

58.- Shuttleworth R., and David Colby "*Staphylococcus lugdunensis*
endocarditis " J.Clin.Micobiol 30/8/1948-1952 (1992).

59.- Smith A. Miranda, John J. Mathewson, Alan Ulert, Ernesto G. Seerpella, and Charles D. Ericsson "Contaminated stethoscopes revisited" Arch.Intern.Med. **156**:82-84 (1996).

60.- Souvenir David, Donald E. Anderson, JR., Samuel Palpant, Henry Mroch, Susan Askin, Jeffrey Anderson, Jerry Claridge, John Eiland, Connie Malone, Mark W. Garrison, Patrice Watson, and Douglas M. Campbell "Blood cultures positive for coagulase-negative *Staphylococci* antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients † " J.Clin.Microbiol. **30/7**:1923-1926 (1998).

61.- Steer J.A., G.B. Hill, S. Srinivasan, J. Southern and A.P. Wilson "Slime production, adherence and hydrophobicity in coagulase-negative *Staphylococci* causing peritonitis in peritoneal dialysis " J.Hosp.Infect. **37/4**:305-316 (1997).

62.- Stites P. Daniel and Abba I. Terr.
INMUNOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA.
Séptima Edición
Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.
México D.F. (1993).

63.- Toral Ma Teresa
FISICOQUIMICA DE SUPERFICIES Y SISTEMAS DISPERSOS
Primera Edición
Editorial Urmo
España (1973).

64.- Tortora J. Gerard Berdell R. Funke, Chistine L. Case
MICROBIOLOGY
An Introduction
Fourth Edition
The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
(1992).

65.- Vandenesch Francois, Susannah J. Eykyn, Michele Bes, H el ene Meugnerier, Jean Fleurette, and Jerome Etienne "Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolates isolated as human pathogens and from goat milk" J.Clin.Microbiol. 33/4/:888-892 (1995).

66.- Vermont L. Clementien, Nico G. Hartwig, André Fleer, Peter de Man, Henri Verbrugh, John van de Anker, Ronald de Groot and Alex van Belkum "Persistence of clones of coagulase-negative *Staphylococci* among premature neonates in neonatal intensive care units: Two center study of bacterial genotyping and patient risk factors " J.Clin.Microbiol. 36/9/:2485-2490 (1998).

67.- Vesga O, M.C. Groesche, M.F. Otten and D.W. Brar "*Staphylococcus epidermidis* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieum" J.Infect.Dis. 173/3/:739-742 (1996).

68.- Wilddemauwe Charles, Gogard Vonhooff, R. Bossuyt and E. Hannecart Pokorni "Changes in major populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium " J.Hosp.Infect. 34/3/:197-203 (1996).

69.- Williams J.D. and G. Coles. " Gram-positive infections related to CAPD" J.Antimicrobiol.Chemother./supplB/:31-36 (1991).

- 70.- Wolfgang K. Joklik., Hilda P. Willett D. and Bernard Amos
ZINSSER MICROBIOLOGIA
18ª Edición
Editorial Médica Panamericana (1986).
Buenos Aires (1994).