



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD ACADÉMICA "ZARAGOZA"

APLICACION DE LA CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO EN LA IDENTIFICACION CUALITATIVA DE S.aureus

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A .
VICTOR HUGO BECERRA LOPEZ



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INTRODUCCION

El diagnóstico de enfermedades infecciosas ha sido desde tiempos remotos, una enorme inquietud natural del hombre. Existen diversos testimonios sobre el uso de remedios de origen natural para dar el tratamiento adecuado a una enfermedad determinada, aunque queda mucho en duda si estas gentes tenían conocimiento del enemigo con el que se enfrentaban (1).

La identificación de agentes etiológicos de múltiples enfermedades, al invadir a un individuo produciéndole daño, es de importancia vital para éste. Para cumplir con tal finalidad, se han diseñado, elaborado y perfeccionado técnicas para identificar tales agentes, ya sean de origen viral, bacteriano, parasitario y/o micótico, siendo las bacterias los agentes etiológicos mas frecuentes.

Su identificación se basa en el comportamiento fisiológico característico de cada una de ellas, entre las que destaca su rápido crecimiento en medios de cultivo "in vitro" que permiten, con ayuda de instrumentos y diversas técnicas de tipo bioquímico, poder ser identificadas tanto en género como en especie.

La creación de instrumentos y técnicas sigue avanzando desde la aparición del microscopio, hasta la más sofisticada técnica de radioinmunoanálisis que conllevan a la misma finalidad.

Los estudios calorimétricos sobre especies bacterianas y micóticas, ya han sido manejados por diversos autores (33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43-54), sin embargo, ninguno de estos estudios ha sido enfocado directamente a manera de identificación, salvo ciertas excepciones en donde se emplea DTA como técnica de análisis (33,34).

El propósito de este trabajo, es demostrar la aplicación que puede tener la Calorimetría Diferencial de Barrido en la identificación de agentes etiológicos, y para tal finalidad se ha elegido a una bacteria por la facilidad mecánica que presentan para trabajar con ellas. La bacteria de elección es del género Micrococaceae conocida como Staphylococcus aureus, cuya capacidad patógena la hace peligrosa para el hombre.

FUNDAMENTACION DEL TEMA

Análisis térmico.

Entre las técnicas Termoanalíticas más utilizadas en la actualidad, y que se clasifican de acuerdo a la propiedad física que se desee medir, se pueden mencionar : Análisis Térmico Diferencial (DTA) -determinación de temperatura-, Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) -determinación de energía-, Análisis Termogravimétrico (TGA) -determinación de masa- y Análisis termomecánico (TMA) -determinación de volumen-.

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es la técnica que determina la diferencia de energía de una muestra con respecto a una referencia en función de la temperatura, bajo un programa de calentamiento o enfriamiento controlado. Los cambios que ocurren en la muestra pueden ser registrados por medio de una curva en la que se pueden observar picos endo o exotérmicos, y en algunos casos, cambios súbitos de capacidad calorífica (Cp) como lo son las transiciones vítreas(23).

INSTRUMENTACION

La instrumentación de un equipo DSC, se muestra en la figura anexa.

Los termopares por lo general, están contruidos de una aleación de platino y rodio; cada uno esta provisto de su propio sistema de sensor y resistencia de temperatura; éstos están separados por un centimetro para favorecer la diferencia de temperatura mencionada en la definición.

Un aspecto interesante es el hecho de que las interacciones existentes entre las temperaturas del panel de muestra y referencia, son controlados por la obtención de una constante de calibración "K" (26-31). Para conocer la constante de calibración del calorimetro, se usan metales de alta pureza con entalpias exactamente conocidas como es el caso del Indio, el cual tiene una entalpia de 6.8 cal/gr. y p.f. = 156.49 C., estos son corridos a una velocidad de calentamiento seleccionada, obteniéndose el área bajo la curva de calentamiento, producida por el flujo de calor formado por la diferencia de temperatura entre los termopares de muestra y referencia.

$$K = \frac{\Delta H(\text{fusión}) * M_c}{A_c} \quad (\text{en mcal/unidad área})$$

Donde:

$\Delta H(\text{fusión}) = \text{entalpia de fusión del calibrante (indio)}$
en mcal/mg.

$M_c = \text{Masa del calibrante (indio) en mg.}$

$A_c = \text{Area del pico de la curva de el calibrante (indio)}$

se obtiene el valor de "k" (constante de calibración).

Además de obtenerse información de entalpias, también se obtienen puntos de fusión o de alguna otra transición, realizándose curvas de corrección para indicar temperaturas reales en base a la pendiente del endoterma o exoterma presentado(24).

Una vez realizada la calibración, la muestra se coloca en un ambiente cuya temperatura es regulada por un programador de temperatura. Los cambios térmicos, son monitoreados por un transductor, el cual convierte en señal eléctrica cualquier cambio físico o químico. Como estas señales son muy pequeñas, es necesario que atraviesen un sistema amplificador y posteriormente un registrador potenciométrico (22). El programador de temperatura debe ser capaz de mantener el espacio circundante de la muestra a temperatura constante (operación isotérmica), o bien, por arriba o por debajo de la temperatura ambiente, además de modificar la misma en función del tiempo a una razón seleccionada (22,23).

El registrador de salida es un registrador X Y. La variable dependiente se registra en Y y la independiente en X. Por lo tanto la variabilidad de el parámetro en estudio es obvia. En caso de operación isotérmica, el eje X puede ser utilizado para registro de tiempo, ya que la temperatura se mantiene constante (22).

La señal de temperatura se registra con termómetros de platino (21), incrustados dentro de los circuitos; esta señal también es registrada simultáneamente.

INSTRUMENTACION DE C

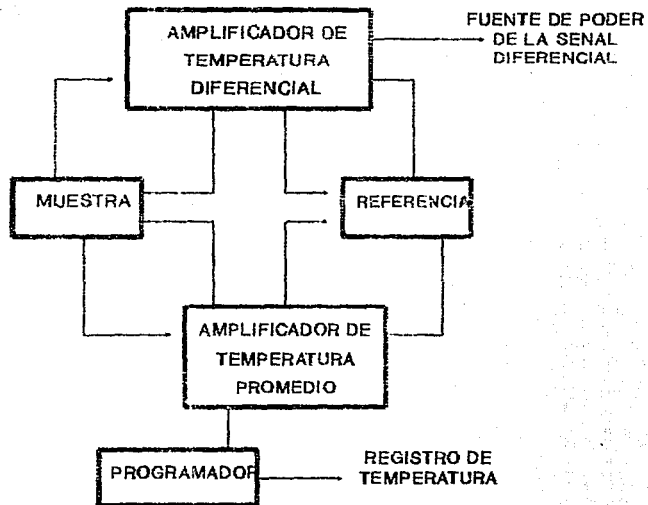


Figura 1

8

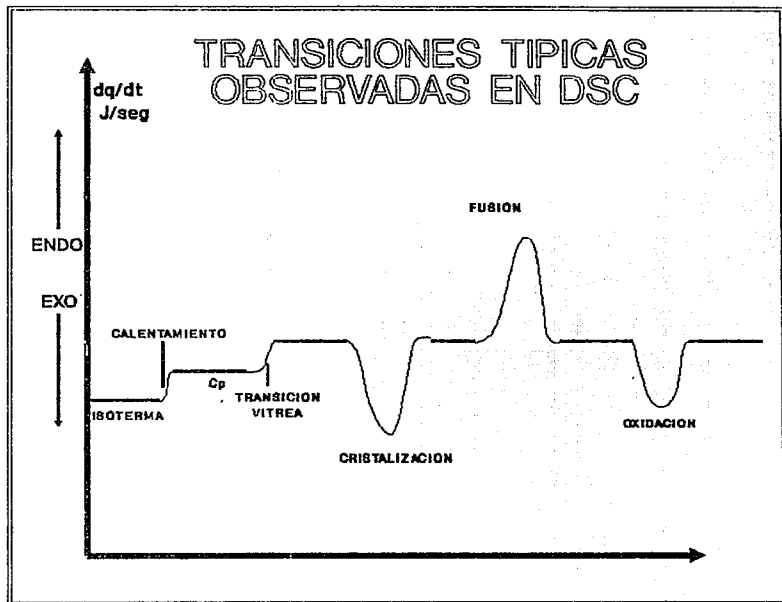


FIGURA II

Procesos estudiados por DSC

Por medio de esta técnica se han analizado diversos tipos de muestras (23), ya sean puras o complejas en las que se han detectado varias transiciones, puntos de fusión, ebullición y otras temperaturas, así como los hidratos, solvatos, y otros complejos (22). Para el estudio bacteriano, es muy importante considerar que no hay interacciones que modifiquen considerablemente la estructura celular (4,5,6,7).

Técnica

La selección técnica experimental, debe ser apropiada de acuerdo a el estudio que se realiza, determinandose el control de las variables principales como es el caso de la velocidad de calentamiento, el tamaño de partícula o de muestra, la dilución de esta, el control de atmósfera y pretratamiento de la muestra (32).

La tabla que a continuación se presenta, demuestra el origen fisicoquímico de los endotermas y exotermas revelados en DSC.

FENOMENO	CAMBIO DE ENTALPIA	
	ENDOTERMA	EXOTERMA
FISICOS		
Transición cristalina	X	X
Fusión	X	
Vaporización	X	
Sublimación	X	
Adsorción		X
Desorción	X	
Absorción	X	
Transición vítrea		CAMBIO DE LINEA BASE.
Transición líquido-cristal	X	
Transición de Cp		CAMBIO DE LINEA BASE.
QUIMICOS		
Químicoadsorción		X
Desolvatación	X	
Deshidratación	X	
Descomposición		X
Degradación Oxidativa		X
Ox. en atmósfera gaseosa		X
Red. en atmósfera gaseosa	X	
Reacciones redox.	X	X
Reacción en estado sólido	X	X
Combustión		X
Polymerización		X
Reacciones catalíticas.		X

Aplicación sobre sistemas bacterianos

Los estudios calorimétricos sobre especies bacterianas ya han sido manejados por diversos autores. Se ha estudiado el comportamiento que presentan los géneros de Corynebacterium, Acetobacter, E. coli, y Streptomyces bajo condiciones controladas de atmósfera, velocidad de calentamiento, tamaño de muestra y dilución de esta (33,34). En estos estudios se pudo observar con marcada diferencia, el diverso comportamiento térmico de las diferentes bacterias en estudio. Tal diferencia se realizó de manera cualitativa, por tratarse de estudios de tipo observacional y no estadístico.

También se han llevado a cabo análisis discriminantes a nivel microcalorimétrico sobre crecimiento bacteriano. (35), propiedades térmicas de componentes celulares como dextranas (36) y copoliésteres (37), fluidez de lipopolisacáridos en membranas (38); flujo de energía en bacterias marinas bioluminiscentes (39), Investigaciones sobre comportamientos térmicos en Tiobacillus de varias especies, Leptospirillum, y Sulfolobus (40); Intercambio de energéticos por transporte activo a través de E. coli (41), así como también, determinación de curvas de calentamiento de crecimiento bacteriano (42) e investigaciones en cultivos mixtos microbianos (43); además se ha determinado la temperatura óptima de crecimiento en bacterias gram negativas (44), se han realizado investigaciones sobre sistemas bимembranales de bacterias gram negativas (45), efectos biológicos de sustancias en E. coli (46), investigaciones en fases termotrópicas de Brucella y otras bacterias gram negativas, (47), oscilaciones metabólicas de E. coli (48), estudios a bajas temperaturas sobre Brucella, estudio termocinético de metabolismo bacteriano (50) y estudios microcalorimétricos (51).

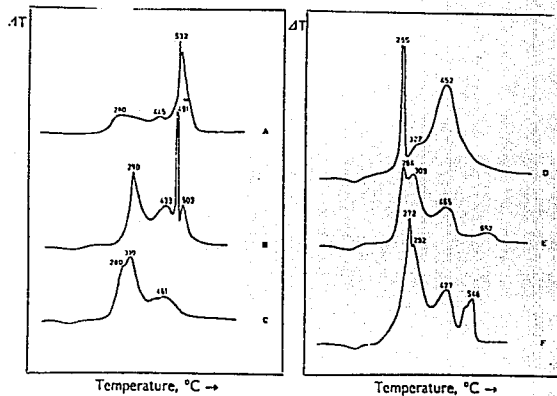


FIG. 24.8. DTA curves for microorganisms in oxygen: A—*Corynebacterium diphtheria*; B—*Acetobacter xylinum*; C—*Aerobacter aerogenes* grown in a carbon-limiting medium; D—*Aerobacter aerogenes* grown in a nitrogen-limiting medium; E—*Escherichia coli*; F—*Streptomyces* spp. (Heating rate 10 deg/min; sample weight 20 mg diluted with 20–40 mg calcined kaolinite; oxygen through sample at 10 ml/min.)

DATOS OBTENIDOS POR B.D. MITCHELL Y A.C. BIRNIE
EMPLEANDO ANALISIS TERMICO DIFERENCIAL (33).

Es muy importante destacar que la gran mayoría de estos estudios se realizaron en especies bacterianas gram negativas, así como productos celulares obtenidos a partir de éstas. No se han reportado estudios elaborados sobre especies gram positivas; el dato encontrado consta de la estabilidad térmica que posee el S. aureus en relación a otras bacterias, encontrándose en el cuarto grupo, de seis, en orden decreciente (52). A continuación se describen las características bioestructurales y patógenicas más importantes de S. aureus.

Staphylococcus aureus.

Los estafilococos fueron los primeros en reconocerse como género separado en la década de 1880. a la vez, fueron subdivididos en varias especies, siendo el más importante el Staphylococcus aureus. Esta es la especie más común y la más frecuente en enfermedades estafilocócicas.

Descripción.

Varios investigadores como Billroth, Koch, Pasteur, Ogston, y Rosenbach (3), determinaron cronológicamente las principales características del S. aureus.

Los estafilococos son células bacterianas de forma esférica. constituyen el género de la familia Micrococaceae de mayor importancia. Son organismos aerobios con un típico metabolismo respiratorio aunque también son capaces de desarrollarse anaeróbicamente (4,5). Produce ácido a partir de glucosa tanto aeróbica como anaeróbicamente. Su DNA presenta 30 a 38 % de Guanina-Citosina. No forman esporas que le confieran carácter de resistencia, así como tampoco presentan flagelos que permitan dar movilidad propia (4,6,7). Las células individuales tienen un diámetro que oscila entre 0.7 y 1.2 micras y se agrupan característicamente en agregados irregulares que dan la apariencia de racimo de uvas (staphylo, del griego staphylé; racimo de uvas). La división celular tiene lugar en planos perpendiculares sucesivos, aunque se presenta separación incompleta de las células hijas, lo que propicia que el punto de unión sea excéntrico del plano de división, con los consiguientes agregados irregulares. Además de que las células hijas pueden desplazarse desde su sitio original de unión (5).

Presentan habilidad para retener el cristal violeta y resiste a la decoloración con alcohol-acetona; en otras palabras, están clasificadas como gram-positivos.

En medios sólidos casi todas las cepas de S.aureus producen un característico pigmento de tipo carotenoide color amarillo oro (aureus), pero la coloración puede variar de blanco a naranja (3).

MORFOLOGIA MICROSCOPICA
DE *S. aureus*

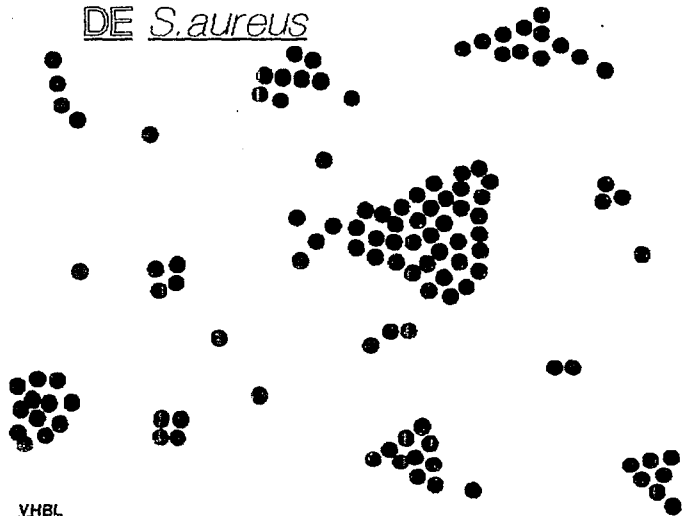


FIGURA 4

Son organismos cosmopolitas, sin embargo, el cuerpo humano y el animal son los principales reservorios. Se pueden encontrar en el aire, agua, leche, aguas negras, así como sus respectivos fomites.

El principal habitat de estafilococos en animales es la nariz, con un 30 a 50 % de portadores sanos; también es común encontrarlos en garganta y piel de acarreadores asintomáticos (4).

El conocimiento de reacciones inmunológicas de este microorganismo común esta todavía muy incompleto, probablemente no existe otro patógeno humano que produzca tantos factores virulentos como S. aureus (8).

Algunas cepas de S. aureus presentan cápsula, (4,5,7,9) lo que las hace más virulentas por la propiedad que les da de no ser fagocitadas por macrófagos y polimorfonucleares (7). La cápsula de algunas cepas se compone de un polímero de ácido manosaminurónico, y componentes característicos de peptidoglicanos como es el caso de la Glicina, Alanina y Glucosamina (9).

La mayoría de las cepas de S. aureus presenta como componente superficial de la pared, una proteína conocida como proteína A (4,7,9). La propiedad más llamativa, es su capacidad de interacción no específica con la fracción Fc de la IgG (excepto la IgG₂).

El S. aureus también produce una proteína de tipo enzimático que coagula el plasma oxalatoado ó citratado en presencia de un factor contenido en varios sueros para producir un coágulo ó trombo "in vitro". La coagulasa es una sustancia similar a la protrombina que reacciona con los factores plasmáticos normales para formar una sustancia similar a la trombina que se convierte en fibrinógeno para dar origen a la fibrina.

S. aureus produce 4 hemolisinas diferentes que son proteínas antigénicas, su actividad es neutralizada por anticuerpos específicos. Son mortales para los animales después de administrarseles, produciendoles necrosis en piel ya que contienen hidrolisinas solubles que se han identificado después de separarse por electroforesis (4,7).

Otras proteínas contenidas son las llamadas leucocidinas que tienen la capacidad de destruir fagocitos formando pus. Las leucocidinas se enlazan a la membrana citoplasmática, liberando gránulos que aumentan la patogenia bacteriana (4,5,7).

Además de las hemolisinas y leucocidinas, S. aureus contiene la proteína exfoliatina, que es un producto extracelular que divide la capa de estrato granuloso de la epidermis y causa varios síndromes clínicos, entre ellos el síndrome de la piel escaldada (5).

Hay por lo menos 6 toxinas solubles producidas por casi el 50% de las cepas de S. aureus (4). Son termoestables y resisten la acción de enzimas intestinales. Además de ser responsables de muchos casos de envenenamiento alimentario (4,5).

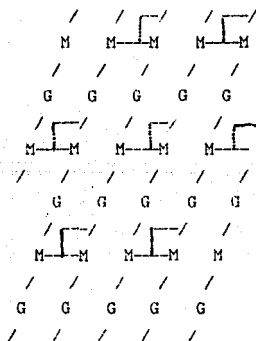
Pared celular

Todas las bacterias, excepto los micoplasmas y las halofílicas, poseen una pared celular rígida que les confiere la morfología característica (10).

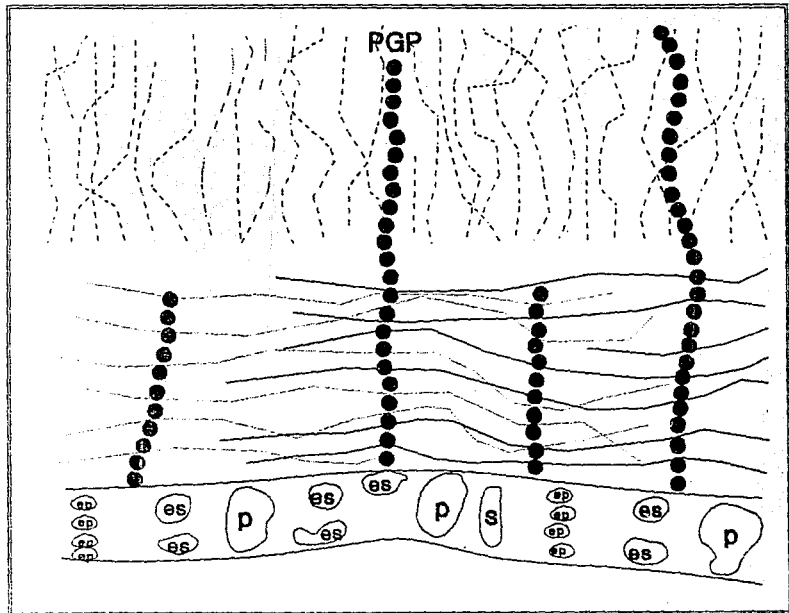
La envoltura externa de las bacterias gram positivas contienen cantidades variables de peptidoglicano, ácidos teicoicos, ácidos lipoteicoicos, ácidos teicurónicos, proteínas y polisacáridos. Esta pared consiste de cadenas formadas por unidades repetitivas de un disacárido constituido por N-acetilglucosamina y un derivado de ésta, el ácido N-acetilmurámico. Los monosacáridos están unidos por enlaces 1-4 y la longitud de las cadenas puede ser desde 10 a 200 o más unidades del disacárido. Su biosíntesis se ha demostrado en 1985 y 1986 (14,15).

S. aureus ha sido protagonista, junto con E. coli, y M. lysodeikticus, de estudios sobre la estructura de peptidoglucanos en bacterias (10)

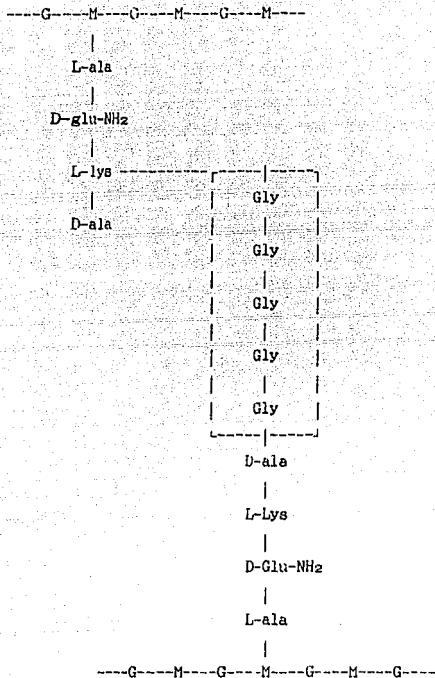
Los peptidoglucanos de S. aureus constan de 5 moléculas del aminoácido Glicina, conectado por enlaces peptídicos (5,10). Contiene 90% de peptidoglucanos, (se ha reportado un 50% (10)) en su pared, aunque también posee otros tipos de constituyentes conocidos como ácidos teicoicos que son polímeros de ribitol fosfato y glicerol fosfato, se denominan respectivamente ácidos ribitolteicoicos y ácidos glicerolteicoicos (11). En los ácidos ribitolteicoicos, el carbono 1 y 5 de los restos adyacentes, se mantiene unidos mediante un enlace fosfodiéster, mientras que el resto de ribitol tiene un resto D-alanina con una unión éster lábil en el carbono 2. En los carbonos 3 y 4 puede haber varios azúcares sustituyentes, como es el caso de S. aureus, donde el ácido ribitolteicoico de la pared está sustituido en el carbono 4 por un resto N-acetilglucosamínico, por medio de un enlace α ó β .



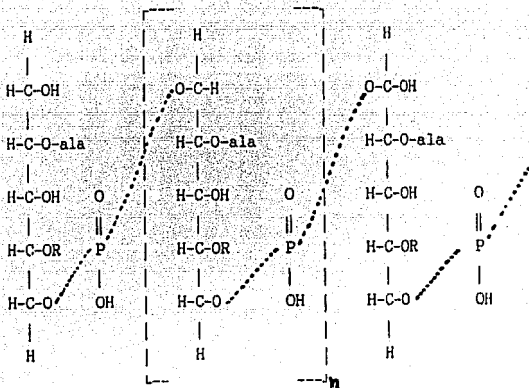
Estructura de los peptidoglucanos. G = N-acetilglucosamina; M = N-acetilmurámico; Las líneas marcadas son enlaces de peptidoglucanos cruzados.



INNEO CELULAR DE S. aureus.



Peptidoglucanos de *S. aureus*. Observe las 5 moléculas del aminoácido Glicina característico.



Acido ribitol teicoicos.

R = alfa o beta N-acetilglucosaminilo.

Estructuralmente hablando, puede advertirse que la gran diferencia de S. aureus con las bacterias bacilares estudiadas en la literatura consultada, radica en la composición bioquímica de la pared celular, presentando éstas, mayor contenido lipídico (4,5,7) que las bacterias gram positivas como lo es el S. aureus. Las bacterias gram negativas presentan sobre su superficie gran contenido de fosfolípidos y lipoproteínas(47,49,52), mientras que los gram positivas tienen un alto contenido de carbohidratos (2)

Patología

El S. aureus produce infección en una gran mayoría de sistemas anatómicos y fluidos (12), como el caso de la sangre, líquido cefalorraquídeo, tracto respiratorio, sistema gastrointestinal, tracto urinario, órganos genitales, piel y músculo esquelético (12,19), cabeza y cuello, además de infecciones sistémicas como es el caso del síndrome del shock tóxico, envenenamiento alimentario (3), y el síndrome de la piel escaldada (4,5,7).

Diagnóstico

Son múltiples los factores que se pueden aprovechar para detectar la presencia de S. aureus en un organismo.

El muestreo se puede realizar de diversas formas, dependiendo del sitio en cuestión; se puede realizar por medio de exudados, raspados, sueros, líquidos corporales, hemocultivos, sangre coagulada, aspirados, heces, lavados, esputo, y pus principalmente (12,18,19).

Cuando la muestra es de consistencia líquida, esta puede ser sometida a tinción y observación microscópica, además de colocarse en medio de transporte o de enriquecimiento según sea la naturaleza de la muestra. A partir de este punto se presentan diversas alternativas de identificación. Cabe señalar que algunas no son de confiable precisión como otras. A continuación se mencionan algunas de las técnicas diagnósticas reportadas:

La unión de la fracción Fc de las IgG a la proteína A, da lugar a reacción de precipitación (7,10). Este hecho a dado la pauta a casas comerciales, que elaboran suspensiones de esferas de látex conteniendo anticuerpos contra proteína A y un factor acoplante; ambas moléculas se encuentran en S. aureus y permiten la identificación de éste. Se ha empleado también como marcadores radiactivos, junto con ^{125}I , ya que tiene una alta afinidad por complejos antígeno-anticuerpo (5).

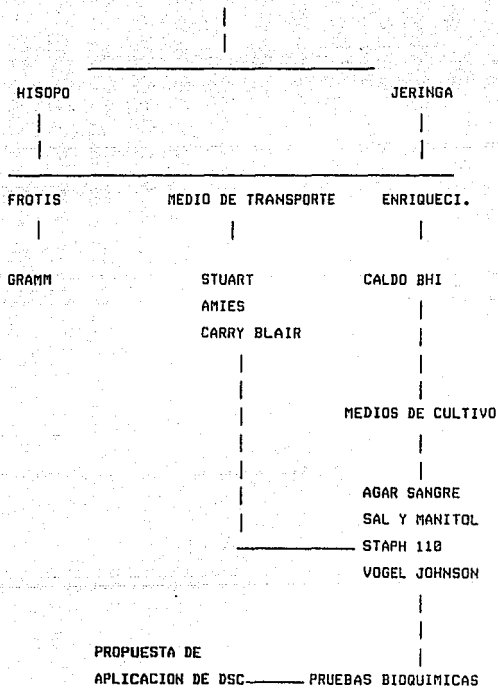
La presencia de la enzima coagulasa demuestra la existencia de la bacteria empleando la técnica de coagulasa en plasma y agar (13). Su actividad es independiente de otras toxinas estafilocócicas.

En la pared celular se encuentran peptidoglicanos que constan de 5 moléculas del aminoácido Glicina, los cuales han sido empleados como antígeno para detectarse por anticuerpos (de manera específica) por medio de reacción de precipitación en solución (16).

Los ácidos teicoicos también han sido protagonistas de formación de anticuerpos para la detección de infecciones estafilocócicas (17), y en pacientes con osteomielitis (18).

Las técnicas anteriores son de tipo serológico, sin embargo, no se usan rutinariamente por el relativo costo mayor (10 a 20 % más) en comparación con la técnica que a continuación se menciona y que es aplicada a muestras obtenidas a partir de exudados, raspados, aspirados, y similares.

TOMA DE MUESTRA



Las principales pruebas bioquímicas empleadas en la identificación de S. aureus son las siguientes:

Prueba bioquímica	Resultado
CATALASA	+
COAGULASA	+
FERMENTACION DE MANITOL	+
DNasa	+

La siembra en medios de cultivo, permiten el desarrollo primario de la bacteria para posteriormente identificarlas haciendo uso de pruebas bioquímicas. En el medio de cultivo Staph-110, crecen solamente microorganismos que poseen una elevada tolerancia a la sal común. Este está constituido por peptona de caseína (10 gr/l); extracto de levadura (2.5 g/l); hidrogenofosfato dipotásico (5 g/l); gelatina (30 g/l); lactosa (2 g/l); D(-)manitol (10 g/l); cloruro sódico (75 g/l); agar-agar (12 g/l). En este medio, las colonias formadoras de pigmentos aparecen de color amarillo dorado, mientras que las no pigmentadas aparecen blancas. La formación de manitol se comprueba por el virre amarillo tras gotear una solución de azul de bromotimol al 0.04%.

El medio de sal y manitol, permite sólo el crecimiento de microorganismos tolerantes a la sal común. Se compone de peptona (10 g/l); extracto de carne (1 g/l); cloruro de sodio (75 g/l); D(-) manitol (10 g/l); rojo de fenol (0.025 g/l); agar-agar (12 g/l). La degradación del manitol con

formación de ácido, esta relacionada con la patogenicidad del microorganismo y sirve, por lo tanto, como indicativo de S. aureus.

El crecimiento de otros microorganismos queda inhibida por la presencia de telurito, cloruro de litio y una elevada concentración de glicina. Los estafilococos patógenos, reducen el telurito a telurio metálico formando colonias negras. Su composición comprende peptona de caseína (10 g/l); extracto de levadura (5 g/l); hidrógeno fosfato dipotásico (5 g/l); D(-) manitol (10 g/l); cloruro de litio (5 g/l); Glicina (10 g/l); rojo de fenol (0.025 g/l); agar-agar (13 g/l).

Las principales pruebas bioquímicas para la identificación confirmativa de S. aureus se dan en base a productos extracelulares de la bacteria, en el caso de la catalasa, coagulasa, y DNasa, donde la reacción es positiva, además de la prueba de fermentación de manitol.

Es importante señalar que el tiempo transcurrido para la detección del microorganismo es de aproximadamente 18 a 36 horas, considerando el aislamiento y las pruebas bioquímicas. Sin embargo se ha demostrado que el análisis térmico puede ser empleado para identificar a determinados géneros bacterianos (33,34), proporcionando información del microorganismo en un tiempo menor.

Para la identificación microscópica de S.aureus, se emplea la popularmente conocida tinción de Gram. Dicha técnica de tinción consiste en la aplicación de un colorante de características básicas como es el caso del cristal violeta, seguido de la aplicación de una solución de lugol, así como de una mezcla de alcohol-acetona; finalmente, se adiciona un colorante de contraste como la safranina.

Las bacterias gram positivas (v.gr. estafilococos) retiene el cristal violeta tras la decoloración y aparecen de un color azul intenso. Las bacterias gram negativas no son capaces de retener el cristal violeta tras la decoloración y se contrastan de rojo con la safranina.

Planteamiento del problema

Dentro de el ámbito clínico, la identificación diagnóstica de agentes etiológicos causantes de diversas enfermedades infecciosas, ha sido de relevante importancia para dar paso a el tratamiento que el paciente requiere.

Sin embargo, en comparación con otras técnicas, la identificación de agentes etiológicos de origen bacteriano, requiere de aproximadamente 18 a 36 horas, dependiendo de el género y especie de que se trate. En el presente estudio se intentará demostrar que la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) puede emplearse como herramienta en la identificación bacteriana, requiriéndose para ello un tiempo aproximado de 25 min. por muestra, lo que representa gran ahorro de tiempo.

Para ello se realizará el estudio identificando S.aureus por el poder patógeno que este presenta, así como la alta incidencia que tiene en clínica. Dicha identificación se basará en el comportamiento térmico que presente la cepa.

Se ha demostrado que la técnica de DSC (además de DTA), (33,34) revela curvas de combustión únicas para un tipo de bacteria específica, lo que sugiere que el estudio deberá mostrar el éxito deseado, siempre y cuando la muestra clínica sea tratada de manera adecuada, es decir, obtener

crecimiento puro en el primoaislamiento. De ser así, el análisis puede extenderse a la identificación de muchos otros géneros bacterianos de interés médico con la rapidez que un laboratorio de análisis clínico debe tener para colaborar con el bienestar de salud que la sociedad exige.

Objetivos:

- Caracterizar cualitativamente por DSC, el comportamiento térmico de S. aureus, para ser usado en un futuro como prueba de identificación.

- Explicar los datos obtenidos del comportamiento térmico de la bacteria, y la importancia que tienen para la identificación misma.

Hipótesis.

La Calorimetría Diferencial de Barrido es una técnica que puede revelar la identidad de un compuesto determinado, en función de la variación característica de temperatura que se presente al ser calentado de manera uniforme; si se considera que S. aureus es una bacteria cuyos componentes principales y característicos están ya bien definidos (5,7,8,9), entonces dicho análisis puede ser de utilidad para la obtención de los parámetros térmicos presentados por la bacteria, y que permitan apoyar su identificación dentro del ámbito clínico.

Metodología.

Mantenimiento de la cepa:

En condiciones de esterilidad, se suspenden 14.7 gr. de medio de cultivo agar CHAPMAN 110 (Merck art. 5469) en 100 ml. de agua destilada o desmineralizada. Se deja reposar 15 min. y se lleva a ebullición hasta que la disolución sea total.

A continuación se esteriliza a 121°C.; 15 lb; 15 min. El medio de cultivo queda listo para vaciarse en cajas de petri y tubos de ensaye, donde se siembra, de manera constante y durante todo el proyecto, la cepa de S. aureus (ATCC 6588, para control de calidad) bajo condiciones de esterilidad.

Método experimental para DSC

Equipo

- Termoanalizador DuPont modelo 2000 con módulo para DSC.

- Balanza analítica Sartorius con precisión de 10^{-4} g.

Material empleado:

- Microcápsulas con tapa de aluminio.
- Microespátula estéril.
- Pinzas.
- Asa bacteriológica.
- Encapsuladora.
- Vidrio de reloj.
- Lámpara de alcohol.
- Indio puro.
- Nitrógeno líquido.

Procedimiento:

El equipo es calibrado con el metal Indio para obtener la constante de calibración "K", con el objeto de conocer la capacidad calorífica de la celda y paneles empleados.

El peso de la muestra se realizó en condiciones de esterilidad, tarando la microcápsula y posteriormente, cerca de la flama de la lámpara de alcohol, se muestrea la copa con la ayuda de la asa bacteriológica, y que se coloca dentro de la microcápsula, para a continuación, sellarse semi-herméticamente. El tamaño de muestra es obtenido por diferencia de peso.

Se decidió iniciar los corrimientos de la bacteria muestreando colonias aisladas del medio, con la finalidad de obtener las condiciones de velocidad de calentamiento e intervalo de temperatura.

Se realizó, por otra parte, un corrimiento del medio de cultivo solo, para considerar las interferencias que éste pueda presentar.

Alternativamente, en un tubo de ensaye, conteniendo el medio de cultivo, se realizó una siembra masiva. La biomasa obtenida fué transvasada a un tubo de ensaye con solución fisiológica, en donde es centrifugada. El sobrenadante es descartado, e inmediatamente la biomasa es muestreada. Este procedimiento ofrece la ventaja de evitar las interferencias que pueda provocar el medio de cultivo

Se obtuvieron, además, las curvas de calentamiento de muestras con 15 días de envejecimiento con el objeto de evaluar si existía diferencia NOTORIA con las colonias jóvenes como en el caso de las bacterias gram negativas reportadas en(42, 44).

Posteriormente se realizaron corrimientos pero ahora después de 2 hrs de haber muestreado la cepa joven, con la finalidad de visualizar los cambios que esta pueda sufrir, al ser desalojada de su medio nutricional.

RESULTADOS

La siguiente tabla resume los valores de los parámetros registrados a lo largo del estudio.

NOMBRE	m*	H**	ATM.	T***	AH _r	NOTAS
Indio	5.7	20	aire	157	28.1	cte.0.983
1	0.7	10	aire	125	----	transic iones multi ples no definidas
2	0.4	20	aire	66.9	116	Endoterma
3	0.4	20	aire	330	1292	Exoterma aumento intervalo de calen- tamiento.
4	0.8	20	aire	330	491	Exoterma
5	1.2	20	aire	340	499	Exoterma
MEDIO DE CULTIVO	1.2	20	aire	100,334	3001,226	Endoter- ma y exo- terma.

6 (15)*	2.3	20	aire	96,438	681,136	Exoterma no defini do.
7 (15)*	1.0	20	aire	82,402	506,508	Exoterma indefini do.
8(15)*	0.7	20	aire	356	460	Comporta miento irregular
9(15)*	0.9	20	aire	412	725	Exoterma irregular
10	0.8	20	aire	412	267	Exoterma
11	0.9	20	aire	387	460	Exoterma
12	1.2	20	aire	46,299	---,805	Exoterma y endoter ma carac teristico

* Tamaño de muestra en mg.

** Velocidad de calentamiento en °C/min.

*** Temperatura en °C.

* Atenuada 15 días de incubación.

* Atenuada 15 días y aislada 2 hrs. de el medio de cultivo.

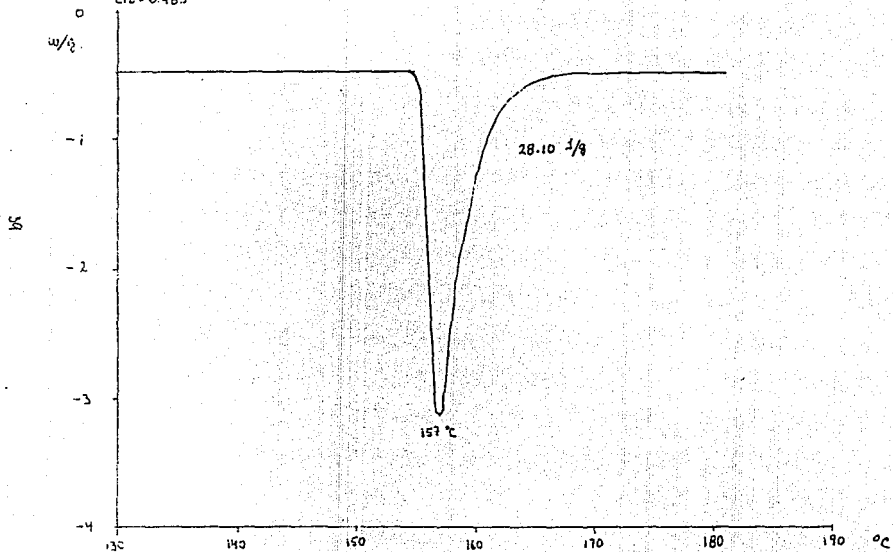
NUMERO DE MUESTRA INDIO PURO

TAMANO DE MUESTRA: 5.7 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 20 C/m.in

CTE = 0.483

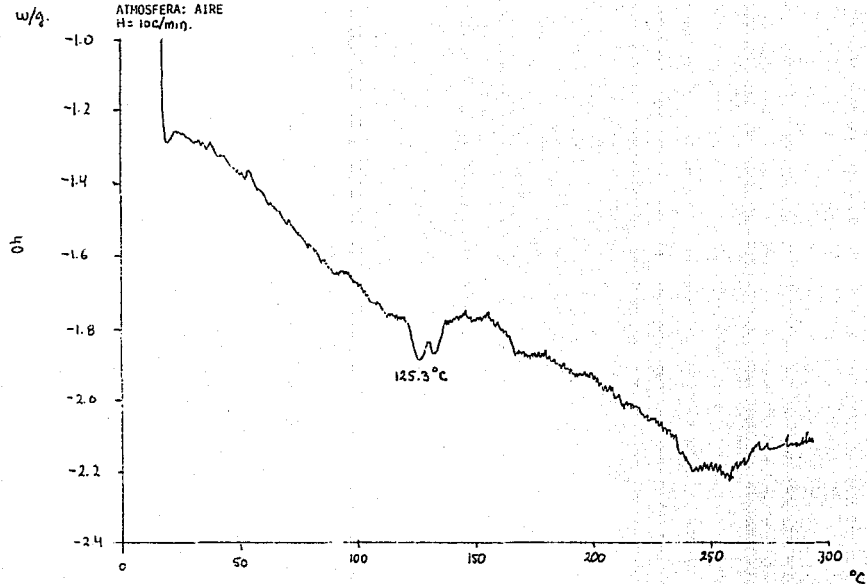


NUMERO DE MUESTRA 1

TAMANO DE MUESTRA: 0.7 mg

ATMOSFERA: AIRE

H: 10C/min.

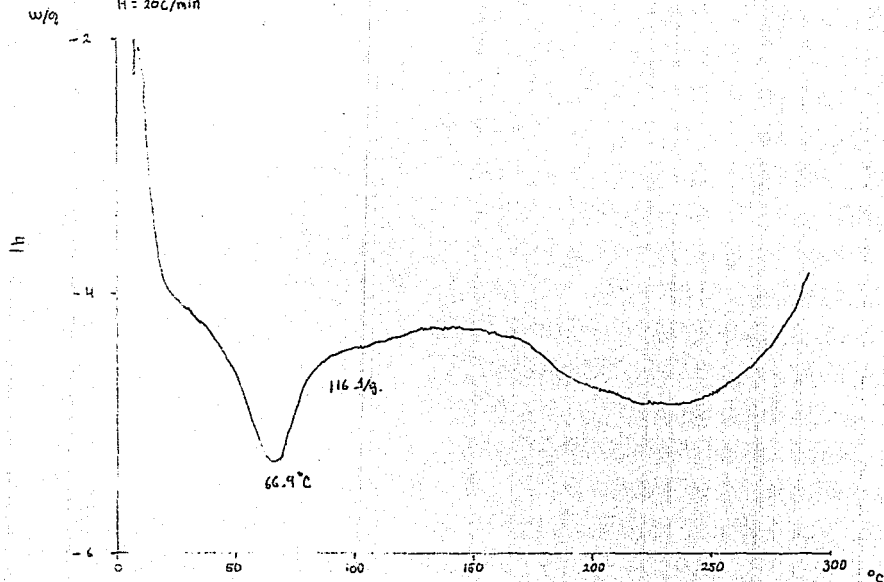


HUMERO DE MUESTRA 2

TAMANO DE MUESTRA: 0.4 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 20°C/min

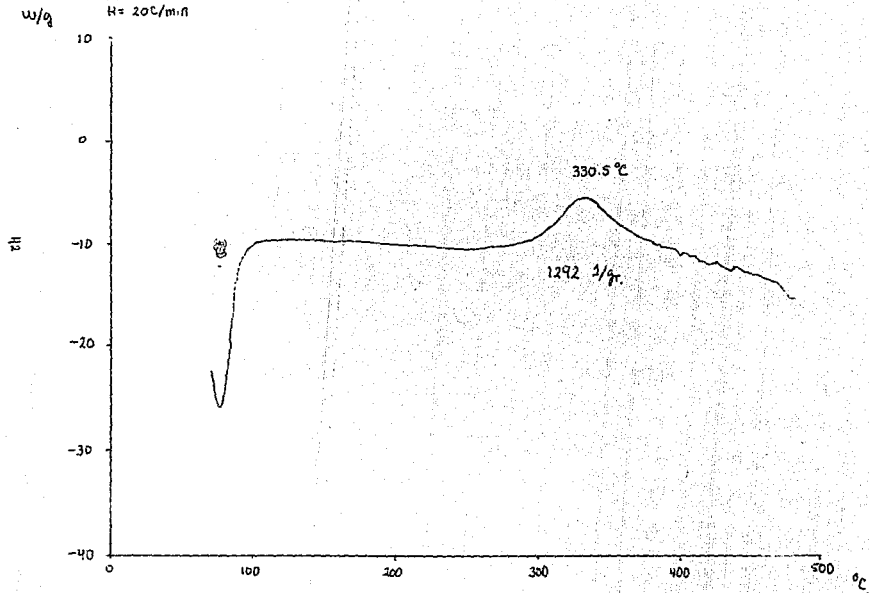


NUMERO DE MUESTRA 3

TAMANO DE MUESTRA: 0.4 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 20°C/min



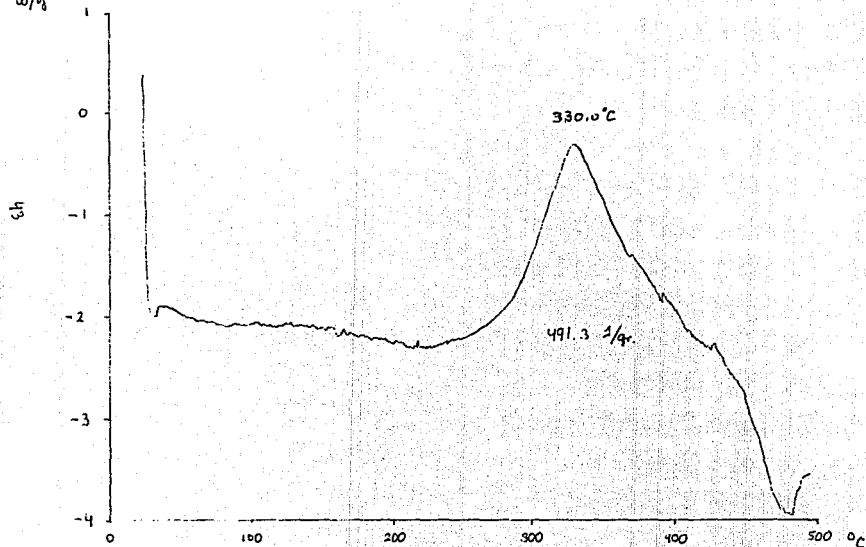
NUMERO DE MUESTRA 4

TAMARO DE MUESTRA: 0.8 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 20°C/min

w/g

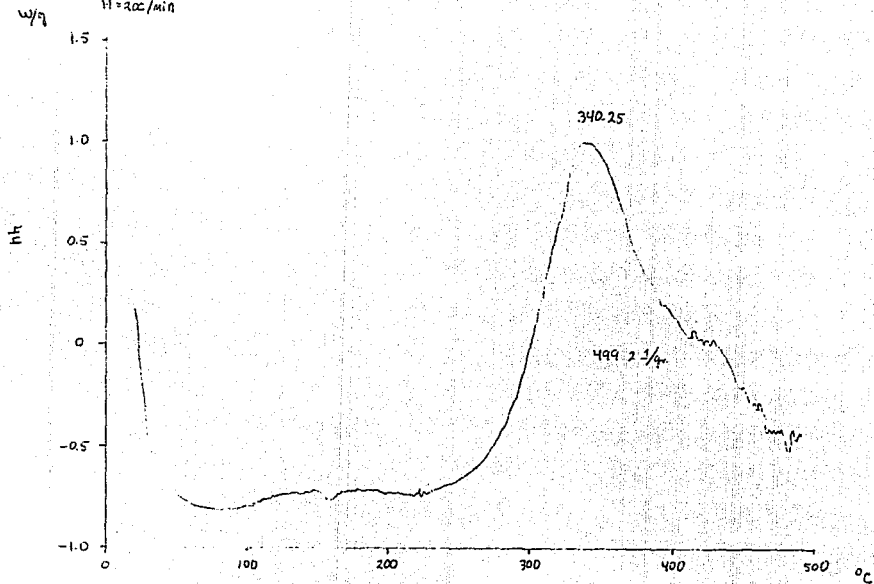


NUMERO DE MUESTRA 5

TAMAÑO DE MUESTRA: 1.2 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 2cc/min

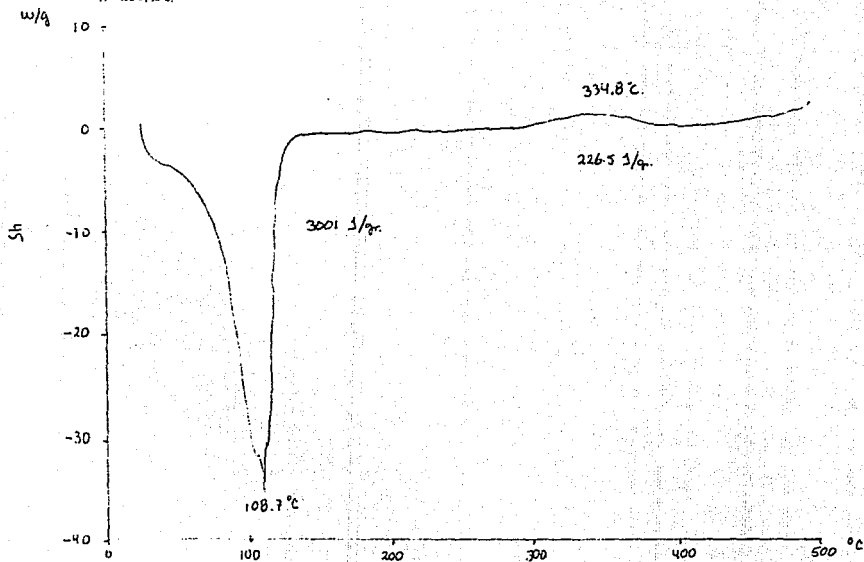


NUMERO DE MUESTRA: MEDIO DE CULTIVO

TAMAÑO DE MUESTRA: 1.2 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 20°C/m.0.

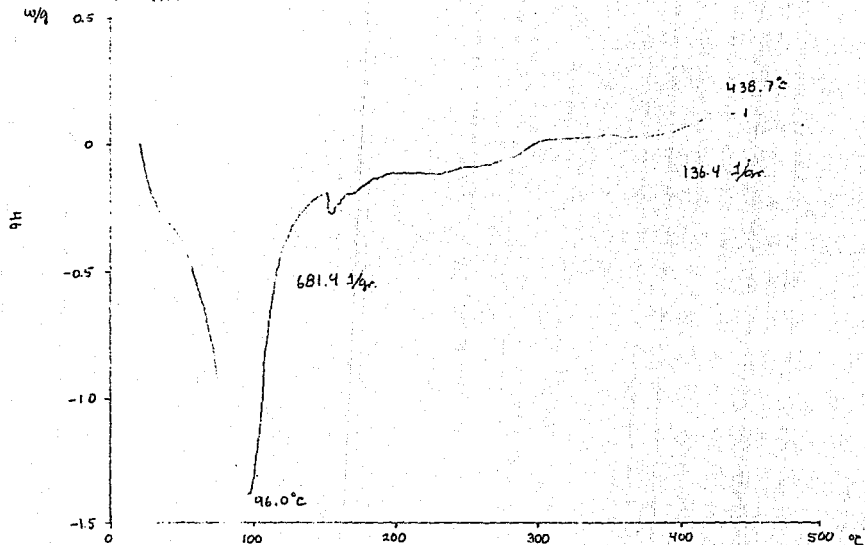


NUMERO DE MUESTRA 6 (15 DIAS)

TAMAÑO DE MUESTRA: 2.3 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 20 L/mi.n.

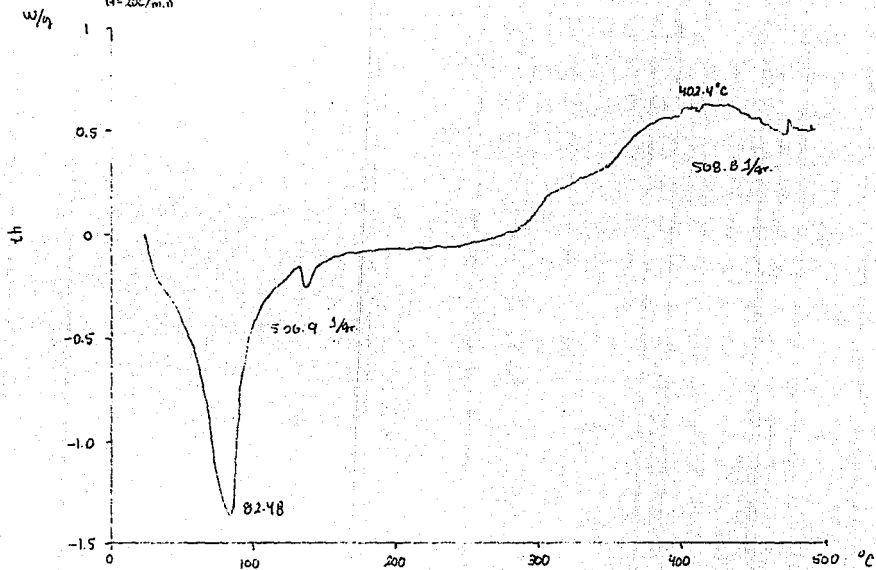


NUMERO DE MUESTRA 7 (15 DIAS)

TAMANO DE MUESTRA: 1.0 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 20°C/m.n



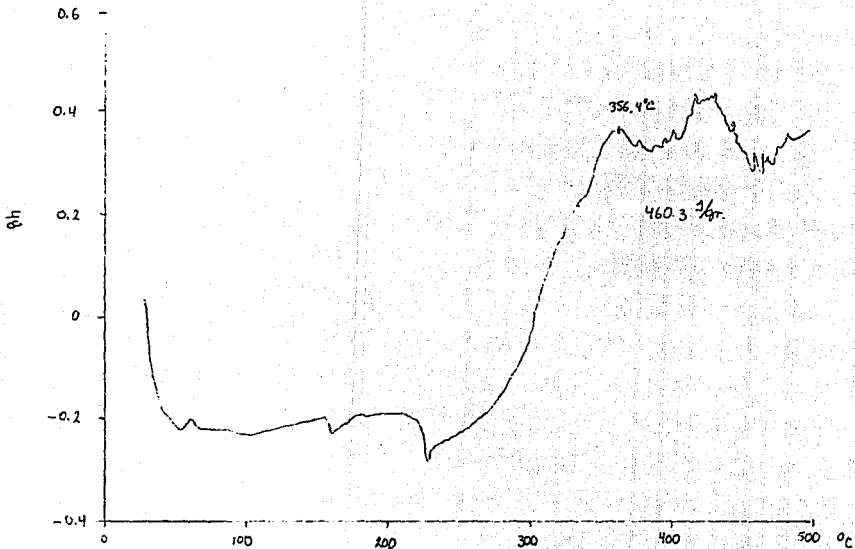
NUMERO DE MUESTRA 8 (15 DIAS)

TAMANO DE MUESTRA: 0.7 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 20 C/min

w/g

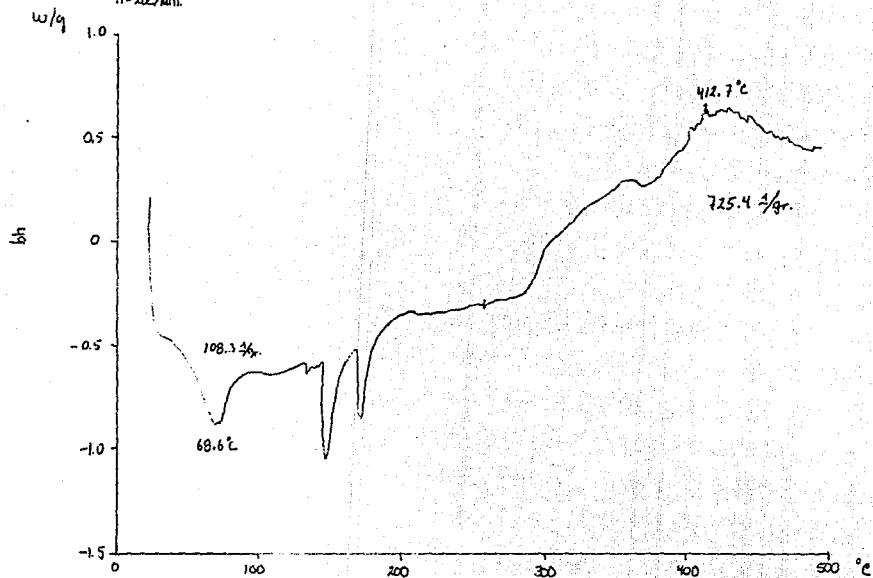


NUMERO DE MUESTRA 9 (15 DIAS)

TAMARO DE MUESTRA: 0.9 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 200/min.



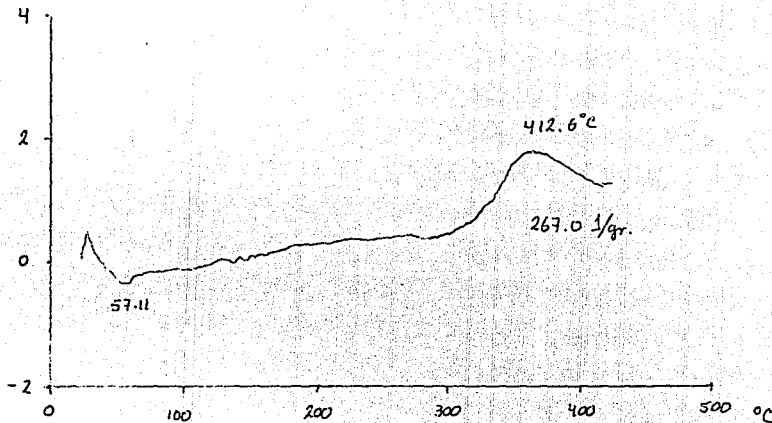
NUMERO DE MUESTRA 10

TAMAÑO DE MUESTRA: 0.8 mg

ATMOSFERA: AIRE

$H = 20\text{C}/\text{min}$

w/g

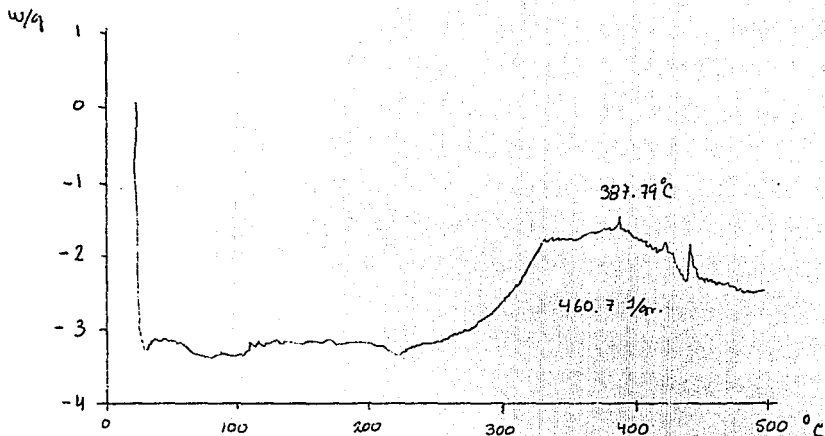


NUMERO DE MUESTRA 11

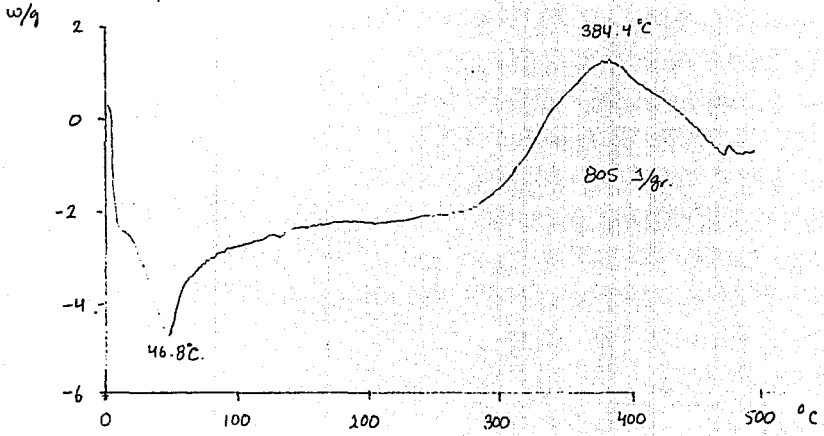
TAMAÑO DE MUESTRA: 0.9 mg

ATMOSFERA: AIRE

H = 20C/min



NUMERO DE MUESTRA 12
TAMAÑO DE MUESTRA: mg
ATMOSFERA: AIRE
H= 20 C/min.



ANALISIS DE RESULTADOS

Al obtener la entalpía (H) y temperatura de fusión (Tf) de compuestos puros (como es el caso del indio), permite la calibración del equipo, pudiéndose medir las transiciones térmicas existentes entre la muestra y referencia (26-31).

Las primeras cinco curvas (H1,2,3,4,y,5) se efectuaron para optimizar el equipo, determinándose que la velocidad de calentamiento a emplear sería de 20°C./min., después de considerar la velocidad de calentamiento de 10°C/min. y un intervalo de temperatura inicial de temperatura ambiente a 300°C que posteriormente se incrementó hasta 500°C. en donde se apreció una transición mas. Los parámetros trabajados coinciden con lo reportado (33-54), en donde puede observarse buena definición en las curvas obtenidas y en un menor tiempo; el panel es sellado semihermeticamente, para permitir liberación de productos extracelulares, en atmósfera de aire.

Se encontró que las transiciones observadas presentan características de deshidratación y combustión.

En las curvas 4 y 5 se presenta la exoterma de combustión a 330 y 340°C. con entalpías de 491 y 499 J/g respectivamente, sin embargo, la endoterma mostrada anteriormente desaparece, quedando tan sólo una curva de escasa pendiente que simula el lugar en donde anteriormente se

ubicaba. Debido a esto, se realizó el corrimiento de una muestra de medio de cultivo revelándose un endoterma a 108°C. y entalpía de 3001 J/g que hace suponer que es el causante de los anteriores endotermas. Por esta razón se decidió emplear el procedimiento descrito, en donde se emplea solución salina y centrifugación.

Bajo este sistema, se obtuvieron las curvas de calentamiento siguientes, siendo el 6,7,8 y 9, muestras atenuadas 15 días y la 10,11 y 12 con 18 hrs de incubación.

Es aquí en donde cabe señalar que, en cuanto a resistencia térmica, Ramos Sánchez et al. (52) han definido que, S. aureus se encuentra en el cuarto lugar de seis grupos bacterianos, y que ésta se da por el tipo de enlaces que se presentan en su estructura (a nivel de lipopolisacáridos), siendo los más fuertes los $\beta(1-3)$ encontrándose en cuarto lugar los $\alpha(1-4)$ y en sexto los $\beta(1-4)$, que son los enlaces encontrados en los ácidos teicoicos de la pared celular de S. aureus (4,5,6), es decir, estos enlaces dan resistencia térmica a la muestra bacteriana, registrándose en el flujo de calor mostrado en los termogramas como un comportamiento exotérmico, conjuntamente con los sacáridos contenidos en la pared celular (N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico) que dan aporte energético bastante grande por poseer estructuras derivadas de la glucosa 600 a 800 J/g (53).

Muchas de las transiciones, además, se deben a las sufridas por las cadenas hidrocarbonadas, unidas covalentemente (54).

En las cepas que se incubaron 15 días, se aprecia diferencia en las entalpías en relación con las que se incubaron 18 hrs., esto debido a la resistencia y envejecimiento que tienen las colonias bacterianas (2).

El comportamiento de las muestras 10, 11 y 12, no son similares, deduciéndose que hay variación energética, debido a que hay variación estructural. Las cepas con 15 días de envejecimiento, se hidratan bastante con el medio de cultivo, apareciendo endotermas de deshidratación, mientras que las colonias jóvenes no.

Los termogramas 8 y 9 se realizaron con muestras aisladas 2 hrs. antes del corrimiento. El resultado demuestra un comportamiento totalmente diferente a los anteriores, y es debido a la degradación que sufren los organismos unicelulares cuando son retirados de su medio nutricional (2).

Si bien es cierto que hay reproducibilidad en el crecimiento bacteriano sobre medios de cultivo a nivel morfológico macro y microscópico, no es así a nivel estructural químicamente hablando, ya que presenta gran variación térmica durante su crecimiento (51) es por ello que no se obtiene reproducibilidad en los termogramas obtenidos bajo las mismas condiciones, no lográndose así la identificación.

Si se logra un buen control en el tiempo de incubación, se puede esperar que la reproducibilidad aumente en los parámetros tanto de temperaturas, y entalpías de deshidratación y combustión principalmente, adquiriéndose como datos de identificación clínica de S.aureus

CONCLUSIONES.

Para poder identificar a la bacteria S. aureus, se debe: Controlar el tiempo de incubación de la cepa para evitar variaciones sobre la etapa estructural de la misma, ya que en la etapa joven presenta inestabilidad térmica a menor temperatura que en la etapa envejecida, donde presenta inestabilidad a mayores temperaturas, demostrando mayor resistencia.

Las transiciones observadas son dos: una de origen endotérmico (deshidratación) y otra de tipo exotérmico (combustión), además de pequeñas transiciones que requieren de mayor estudio.

Las transiciones mostradas son debidas principalmente a la energía de los enlaces presentes en la pared celular y a derivados de la glucosa presentes en la misma estructura.

Sugerencias

- Establecer estricto control en el tiempo de incubación de la cepa para realizar los corrimientos.

- Realizar múltiples corrimientos (empleando las variables obtenidas en el presente) para demostrar la correlación existente entre una muestra y otra; si existe alta correlación, aplicar el Teorema de Bayes, empleando como prueba de referencia diagnóstica la prueba de la coagulasa.

- Establecer estadísticamente los datos técnicos de:

- Temperatura y entalpía de deshidratación.

- Temperatura y entalpía de combustión.

- Estudiar con detalle las pequeñas transiciones mostradas entre las transiciones principales, empleando para ello estándares de referencia que permitan describir el componente que les da origen.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Bibliografía y referencias.

- 1.- Sánchez R.J., Islas P.V.; "Breve historia de la farmacia en México y en el mundo"; AFM, México 1942
- 2.- Davis B., Dulbeco R.; "Tratado de microbiología"; Salvat ; Barcelona 1985, 1897 pp. 22 - 58
- 3.- Merlin, S.; Bergdoll; "Staphylococcus aureus"; en "Foodborne bacterial pathogens"; Michael P. Doyle. Editor; Ed. Marcel Decker, Inc. 1989; p.p. 463-523.
- 4.- Jawets, E; Melnick, J.L. et. al. "Microbiología Médica"; 13ª ed.; Ed. El Manual Moderno; México, 1990 p.p. 188-193.
- 5.- Brock, T.D.; Madigan, M.T.; "Biology of Microorganisms" 5ª ed.; Ed. Prentice Hall; USA; 1988.; p.p. 74,75,93,489,491 y 493.
- 6.- Del Valle, A.; Corona, L.H.; "Formación de una colección de cepas microbianas de vías respiratorias superiores"; Tesis, QFB; UNAM ; p.p. 5-16.
- 7.- Morse, S.I.; "Estafilococos" en: Braude, A.J. Editor. "Microbiología Clínica"; Ed. Panamericana; Argentina; p.p. 313-320.

8.- Stitties, J.; Daniel P.; "Inmunología básica y clínica" 6ª Ed.; El manual moderno; México 1984; p.p.

9.- McFadín, Jean F.; "Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica" E d Panamericana; México 1990; 381 p.p.

10.- De la Cruz G.R.; Calderón J. E.; "Pared celular de bacterias Gram positivas"; Infectologia (1982) 10 619-627.

11.- Rose, A.H.; "Microbiología Química"; Ed. Alhambra; España; 1977; p.p. 22-29,42-47.

12.- Barón E.J., Finegold S.M.; Scott & Bailey; "Diagnostic Microbiology" ;the C.V. Mosby Company; U.S.A. 1990; 861 pp.

13.- Pinto M.A., Laerte F., Edson C.D.; "Evaluation of coagulase test for Pathogenic Staphylococci" Arq Esc Vet, Vet Univ. Fed Minas Gerais 33(1): 207-212; 1981.

14.- Amako, K; Akiko U.; "Cross Wall Synthesis and the arrangement of the wall polymers in the cell wall of staphylococcus spp."; Mikrobiol. Immunol. 28 (12):1293-1302; 1984.

15.- Harrington C.R.; James B.; "Biosynthesis of wall teichoic acids in S.aureus, Micrococcus varians and Bacillus subtilis w23: Involvement of lipid intermediates containing the disaccharide N-acetylglucosamine"; Eur J. Biochem 153 (3) 639-646 1985.

16.- Wegeland, H.; Kjetil B. Asbakk and R. Haaheim; "Monoclonal antibodies evoked by the free oligopeptide (Gly)₆ reacting specifically with peptidoglycan from staphylococci"; J. Immunol. Methods 184 (1/2):57-64 1987.

17.- Verbrug, H.A.; Roel P.M. et. al.; "Antibodies to cell wall peptidoglycan of S. aureus in patients with serious staphylococcal infections"; J. Infect. Dis. 144 (1) 1-9, 1981.

18.- Vaneeva, N.P.; Yasrebueva, N.V. et.al. "Detection of antibodies to teichoic acids of the cell wall of S. aureus in the sera of osteomyelitis patients" Zh Mikrobiol Epidemiol. Immunobiol. 0 (1):49-51 1985.

19.- Freeman, B.A.; "Microbiología de Burrows"; 2ª ed.; Ed. Interamericana McGraw-Hill; México 1989; p.p.417-481.

20.- Ross, P.W.; Holbrook, W.P.; "Microbiología bucal y clínica" Ed. Científica PLM, México 1985; p.p. 60-61.

21.- Lombardi G.; "For better Thermal Analysis"; ICTA; USA, 1980 p.p.16-33.

22.- Paul F. Levy: "Analisis Térmico" -Un repaso- p.p. 1-14.

23.- Wunderlich B.; "Thermal Analysis"; Academic Press INC; USA. 1998

24.- McNaughton J.L. and Mortimer C.T., "Differential Scanning Calorimetry" ; Edit. Perkin-Elmer, USA 1975 ; 44 p.p.

25.- Wendlandt, W.; "Thermal Methods of Analysis"; 2^a ed. vol. 19 Ed. John Wiley and sons; p.p. 134-201.

26.- ASIM Designation: E412-86 "Standar Practice for reporting Thermoanalytical Data"; Reapproved 1987.

27.- ASIM Designation: E968-83; "Std. Practice for heat flow Calibration of Diferential Scanning Calorimetris"; Reapproved 1987.

28.- Callanan, J.E. and Sandra E.S.; Chemical Engineering Science Division, Center for Boulder, Colorado 80303 (publication 12 June 1986) "Development of standard operating procedures for Differential Scanning Calorimeters".

29.- P.A. Barnes; "Calibration of DTA and DSC equipment".

30.- W. Eysler and K.H. Bever.; "The Calorimetric calibration of DSC cells"; Mineralogisch-Petrographisches Institute der Universität D-6900; Heidelberg; Germany p.p. 169-175.

31.- ASIM Designation E967-83; "Standard Practice for Temperature Calibration of Differential Scanning Calorimeters and Differential Thermal Analyzer". Repeared 1987.

33.- Mitchell, B.D. and Birnie, A.C.; "Thermal Analysis", Biological materials in DTA, p.p. 673 - 704.

34.- Wendlandt, W.; "Thermal Methods", 2nd ed 1984, p.p. 288-294.

35.- Bermudez J. et. al.; "Determinant analysis of microcalorimetric data of bacterial growth"; Can. J. Microbiol./J. Can. Microbiol.; 34 (1988) 1058-1062.

36.- Hirokazu Morita; "The Differential Thermal Properties of Bacterial Dextrans"; J. Amer. Chem. Soc. 1397 (1956).

37.- Scandola M ; Ceccorulli G.; "Viscoelastic relaxation and thermal properties of bacterial poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4 hydroxybutyrate)"; INT. J. BIOL. MACROMOL.; 12 (1990) 112-117.

38.- Brandenburg K., Seydel, U.; "Investigation into fluidity of lipopolisacchride and free lipid A membrane system by Fourier-transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry"; EUR. J. BIOCHEM.; 19 (1990) 229-236.

39.- Makemson J.C. Gordon A.S.; "total energy flux in a marine bioluminescent bacterium"; FEMS MICROBIOL. LETT.; 57 (1989) 161-166.

40.- Schroeter A., Sand W.; "Microcalorimetry -- a modern technique for microbiology and biohydrometallurgy"; BIOHYDROMETALLURGY: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM, WARWICK (1988) 127-134.

41.- Cheng Ling-IS, Chen Chang-Hwei; "Thermochemical studies of energetics in active transport across E. coli membranes."; SELECTED PAPERS PRESENTED AT THE INTERNATIONAL CONGRESS ON MEMBRANES AND MEMBRANE PROCESSES (ICOM'87) TOKYO JAPAN, JUNE 8-12 1987;(1989); 405-415.

42.- Xie Changli, et. al.; "Determination of thermograms of bacterial growth"; Acta. Microbiol. Sin; 29 (1989) 149-151.

43.- I. Lamprecht; B. Schaarschmidt; "Microcalorimetric Investigations on Mixed Microbial Cultures"; 849-869.

44.- Zhang Hongling,; Liu Yongjun; "Determination of Thermograms of bacterial growth and study of optimum growth temperature." Termochimica Acta, 216 (1993) 19-23.

45.- K. Bradenburg y U. Seydel; "Thermodynamic Investigation on Mono and Bilayer Membrane System made from Lipid Components of Gram-Negative Bacteria."; Termochimica Acta 85 (1985) 473-476.

46.- J. Hartung; "On the use of flow microcalimetry in estimating the biological effect of adverse substances on e. coli." ;Termochimica Acta 94 (1985) 197-186.

47.- Ramos-Sanchez, A. Orduña-Domingo, et. al." Investigation on the thermotropic phase behaviour of lipid a from Brucella and other Gram-negative bacteria"; Termochimica Acta. 208 (1992) 139-145.

48.- A. Sanahuja et al." Metabolic Oscillations of Escherichia coli recorded by microcalorimetry"; Termochimica Acta. 172 (1990) 223-228.

49.-Ramos Sanchez, et.al.;"Low temperature thermal behaviour of lipopolisaccharides from Brucella and others gram-negative bacteria"; Termochimica Acta. 215 (1993) 227-233.

50.-Xie Chan-Li et. al.;" A thermokinetic of bacterial metabolism"; Termochimica Acta.(1989) 211-217.

51.- Xie Chang-Li, et. al.;"Microcalorimetric study of bacterial growth"; Termochimica Acta. (1988) 33-41.

52.- Ramos sanchez, et. al.; "Thermal analysis of lipopolisaccharides from Brucella and others Gram-negative bacteria" ;Termochimica Acta. 191 (1991) 299-305.

53.- A. Raemy and T.F. Schweizer;"Thermal behaviour of carbohydrates studied by heat flow calorimetry"; Journal of thermal Analysis 28 (1983) 95-108.

54.- K. Brandenburg and A. Blume; "Investigations into the thermotropic behaviour of natural membranes extracted from gram-negative bacteria and artificial membrane systems made from lipopolysaccharides and free lipid A";
Termochimica Acta. 119 (1987) 127-142.