

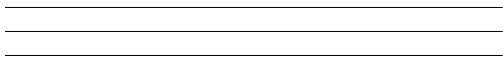
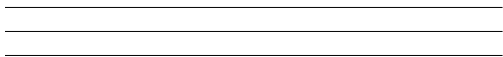


SECCIÓN III

Etiopatogenia microbiológica

16. Género *Staphylococcus*
17. Género *Streptococcus* y *Enterococcus*
18. Principales grupos de bacilos y cocos gramnegativos exigentes
19. Principales grupos de bacilos y cocos gramnegativos no exigentes
20. Principales grupos de bacilos grampositivos aerobios
21. Bacterias anaerobias
22. *Mycobacterias*
23. *Chlamydia*, *Rickettsia* y *Mycoplasma*
24. *Leptospira*
25. Virus respiratorios
26. Retrovirus y VIH
27. Virus de las hepatitis
28. Enterovirus
29. Agentes virales de gastroenteritis
30. Herpesvirus
31. Agentes de infecciones emergentes. Hantavirus, dengue, BSE





16 | Género Staphylococcus

V. Seija

Reseña histórica

Los cocos se asociaron por primera vez a enfermedades humanas cuando fueron observados en materiales purulentos provenientes de abscesos humanos. En 1880 el cirujano escocés Sir Alexander Ogston demostró que cocos agrupados en forma de racimo eran la causa de ciertos abscesos piógenos en humanos. Louis Pasteur arribó a una conclusión similar al mismo tiempo, pero en París. En el año 1882, Ogston llamo a estos cocos “*Staphylococcus*”, derivando el nombre de los términos griegos staphile (racimo de uvas) y kokkus (frutilla). Morfológicamente, Ogston propuso este término de manera de poder diferenciarlos de los estreptococos, formadores de cadenas. Ogston demostró que la inyección a ratones de pus conteniendo estos cocos producía los mismos síntomas observados en el humano. También observó que si calentaba el pus y lo trataba con fenol, la enfermedad se prevenía.

Introducción

Staphylococcus aureus se destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, de prótesis y otras. También *S. aureus* es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada.

Staphylococcus epidermidis es integrante de la flora normal de piel pero produce infecciones crecientes de piel y anexos, colonizando cuerpos extraños y también es causa de infecciones profundas en huéspedes inmunocomprometidos.

Staphylococcus saprophyticus es causa de infección urinaria baja en la mujer joven.

Taxonomía

Los miembros del género *Staphylococcus* y *Micrococcus* son catalasa positivos y hasta hace poco formaban parte de la familia Micrococaceae junto a los géneros *Planococcus* y *Stomacoccus*. Estudios genéticos han demostrado que *Staphylococcus* y *Micrococcus* no están relacionados.

Tentativamente el género *Staphylococcus* se colocó dentro de la familia *Bacillaceae* junto a otros géneros, *Bacillus*, *Gamella*, *Listeria*, *Planococcus*, etc.

Los estafilococos son cocos Gram positivos, catalasa positivos y el diamino ácido en el peptidoglicano es la L-lisina. El género *Staphylococcus* posee alrededor de 30 especies, de las cuales destacaremos *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *S. epidermidis*.

Hábitat

Staphylococcus epidermidis es integrante de la flora normal de la superficie corporal donde sobrevive gracias a sus lipasas, mientras *S. aureus* se encuentra habitualmente a nivel de la nasofaringe y de zonas húmedas como pliegues inguinales y axilas. A nivel del vestíbulo nasal anterior la adherencia parece estar mediada por el contenido en ácidos teicoicos. Se estima que el índice de portación nasal en los adultos es de alrededor del 20-30%. Expresado longitudinalmente, cerca del 30% de la población puede ser portador permanente, el 50% portador intermitente y el 20% no es colonizado. Algunas poblaciones pueden tener una tasa de colonización mayor como el personal de salud, los pacientes en hemodiálisis, diabéticos, adictos a drogas intravenosas, etc. A pesar que *S. aureus* posee numerosos factores de virulencia, puede convivir con el huésped humano formando parte de su flora normal sin causar ningún daño. Existen ocasiones en que este equilibrio se puede romper. Desde las narinas, los portadores pueden transferir bacterias a diferentes sectores de la piel, aunque habitualmente existe resistencia a la colonización de la piel intacta. Sin embargo, un traumatismo (muchas veces desapercibido) puede dar una puerta de entrada al microorganismo. En caso de infección, por tanto, *S. aureus* puede ser muchas veces de origen endógeno.

Morfología microscópica

Como ya hemos dicho se trata de cocos Gram positivos que poseen tendencia a agruparse en racimos. Tienen una forma esférica y un diámetro de alrededor de una micra.

Morfología macroscópica

Para apreciarla debemos contar con un aislamiento de la cepa a estudiar en una placa de Petri. El aislamiento nos permitirá observar las características de las colonias. En medios no selectivos, *S. aureus* presenta colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir desde el crema al amarillo. La producción de pigmento se ve favorecida si se incuban los cultivos por 24 a 48 horas adicionales a temperatura ambiente. Cuando crecen en agar sangre ovina se puede observar una zona de β -hemólisis alrededor de las colonias. *S. epidermidis* presenta colonias generalmente de menor tamaño y estas no presentan pigmentación.

Metabolismo

En cuanto a su forma de obtener energía es tanto a través de la fermentación como de la respiración. En cuanto a los requerimientos de cultivo, son no exigentes desde el punto de vista nutricional, creciendo en medios pobres y simples. En su relación con el oxígeno son aerobios-anaerobios facultativos.

Resistencia a agentes físicos y químicos

Es muy resistente a las condiciones ambientales normales. Es capaz de sobrevivir hasta tres meses en un cultivo a temperatura ambiente. Muere expuesto a temperaturas mayores de 60 °C por una hora. En cuanto a los agentes químicos, es sensible a la mayoría de los desinfectantes y antisépticos, que lo matan en pocos minutos.

Staphylococcus aureus

Ya hemos comentado las características comunes del género *Staphylococcus* y ahora analizaremos las que distinguen al patógeno más importante dentro de este género. Desde el punto de vista estructural *S. aureus* comparte las características de los gérmenes Gram positivos y agrega algunas características distintivas.

La pared celular esta compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano. Se trata de un polímero polisacárido compuesto por cadenas con uniones de tipo β (1-4) no ramificadas, que contienen subunidades alternantes de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina. Las cadenas laterales de pentapéptidos se hallan conectadas al residuo de ácido murámico y tienen unión cruzada por un puente pentaglicina fijado a la L-lisina de una cadena y la D-alanina de la otra cadena. El polímero polisacárido básico se halla también en muchos otros microorganismos, mientras la cadena de unión cruzada de pentaglicina parece ser específica de *S. aureus*. Tiene como función mantener la rigidez de la pared bacteriana y su resistencia osmótica. En la patogenia coadyuvaría al desencadenamiento de la inflamación por activación del complemento, es capaz de atraer leucocitos polimorfonucleares (PMN), estimula la producción de anticuerpos opsonizantes y tiene actividad similar a las endotoxinas de Gram negativos. El otro componente mayor de la pared son los ácidos teicoicos, que constituyen alrededor del 40% del peso de la pared. Estos ácidos son polímeros de glicerol o ribitol fosfato, azúcares y algunas veces, D-alanina. Están unidos en forma covalente al peptidoglicano. Cuando están unidos a la membrana citoplasmática se les llama ácidos lipoteicoicos. *S. aureus* posee predominantemente ácidos de ribitol fosfato, mientras que en los estafilococos coagulasa negativos estos son de glicerol fosfato.

La presencia de cápsula es variable pero es importante a nivel patogénico, ya que tiene propiedades antifagocíticas. Las cepas de *S. aureus* que poseen cápsula son más virulentas en modelos animales. No es claro que la cápsula de *S. aureus* juegue un papel importante en la adherencia. Lo que si se conoce es que la adherencia de este germen a la válvulas cardíacas y cuerpos extraños esta mediada, en parte, por receptores de fibronectina en su superficie. La fibronectina es una glicoproteína importante en varias funciones de adherencia. Las cepas de *S. aureus*, que muestran grandes cantidades de receptores para la fibronectina, parecen ser más invasivas y más hábiles para adherirse. Además *S. aureus* puede presentar en su superficie receptores para el colágeno.

La pared celular de *S. aureus* posee una proteína característica llamada proteína A. Esta tiene la habilidad de unirse a la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina G (IgG), y por tanto funciona como factor de virulencia, ya que interfiere con la opsonización y la ingestión de los microorganismos por los PMN, activando el complemento y dando lugar a reacciones de hipersensibilidad inmediata y tardía. Esta proteína es inmunogénica y se hallan anticuerpos contra ella en sujetos con infecciones graves por *S. aureus*.

DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD

Cualquier enfermedad infecciosa es el resultado de la interacción entre el microorganismo causal y el huésped. Primero analizaremos los factores de patogenicidad con que cuenta *S. aureus*. Estos pueden ser divididos en tres grupos (tabla 1):

- a) Componentes de la pared celular: ya fueron discutidos en la sección anterior.
- b) Enzimas:
 - Catalasa: podría funcionar inactivando algunos sistemas de ingestión de los PMN.
 - Coagulasas: tanto la coagulasa libre como el llamado “clumping factor” actúan cubriendo a la célula de fibrina y por tanto haciéndola más resistente a la opsonización y fagocitosis.
 - Estafiloquinasas: degradan la fibrina y contribuyen a la invasión de tejidos vecinos.
 - Hialuronidasa: hidroliza la matriz intracelular de mucopolisacáridos de los tejidos y por tanto contribuye a la diseminación a tejidos adyacentes.
 - Lipasas: las cepas de *S. aureus* productoras de forunculosis crónica son potentes productoras de lipasas que ayudan al microorganismo a diseminarse por los tejidos cutáneo y subcutáneo.
 - Fosfolipasa C: esta enzima esta asociada con cepas recuperadas de pacientes con distrés respiratorio del adulto y coagulación intravascular diseminada (eventos que ocurren durante la sepsis). Aparentemente los tejidos afectados por esta enzima se vuelven más susceptibles al daño y destrucción por componentes bioactivos del complemento y sus productos durante su activación.
 - *S. aureus* produce además, toda una serie de enzimas como las DNAsas, proteasas y fosfatasa que colaboran en el proceso infeccioso y en la producción de lesiones.
- c) Toxinas: *S. aureus* puede producir toxinas de acción general como las hemolíticas (α , β , γ y δ) y la leucocidina, y también toxinas especializadas como las exfoliatinas, toxina del shock tóxico y enterotoxinas. Las hemolisinas son importantes toxinas citolíticas sobre una variedad de células.
 - α hemolisina o α toxina: tiene efecto letal sobre una variedad de membranas celulares eucariotas, incluyendo la de PMN humanos, así como también la de eritrocitos de diferentes especies animales. Es dermonecrótica si se inyecta en forma subcutánea y es letal para animales si se administra en forma intravenosa. Es responsable de la zona de hemólisis observada alrededor de las colonias de *S. aureus*.
 - β hemolisina: es una esfingomielinasa activa sobre diferentes células: leucocitos, eritrocitos, fibroblastos.
 - γ y δ hemolisinas: se encuentran en algunas cepas de *S. aureus* y lisan una variedad de células diferentes.
 - Leucocidina: es una exotoxina con efecto tóxico directo sobre las membranas de los PMN humanos, causando degranulación del citoplasma, hinchamiento celular y lisis. El modo de acción de esta toxina comprende la formación de poros que alteran la permeabilidad celular para el potasio y otros cationes. Una inyección de esta toxina en modelos animales produce una disminución severa del número de leucocitos.
 - Exfoliatinas o toxinas epidermolíticas: son producidas por algunas cepas de *S. aureus* y consisten en dos proteínas, bioquímica e inmunológicamente diferentes, pero con funciones biológicas similares. La exfoliatina A es un producto de genes cromosómicos, termoestable y es inactivada por el EDTA, mientras la exfoliatina B es de origen plasmídico, es inactivada por el calor y estable frente al EDTA. Ambas tienen actividad proteolítica, actúan como superantígenos y disuelven la matriz mucopolisacárida de

Tabla 1. Determinantes de patogenicidad de *S. aureus*

Determinante de patogenicidad	Propiedades
Componentes de la pared celular <ul style="list-style-type: none"> ▪ Peptidoglicano ▪ Ácidos teicoicos ▪ Proteína A ▪ Cápsula mucoide 	Activación del complemento Antifagocítica Antifagocítica Adherencia
Enzimas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Coagulasa ▪ Estafiloquinasas ▪ Hialuronidasa ▪ Lipasas 	Formación de absceso Destrucción del coagulo Invasión hística Colonización
Toxinas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemolisinas ▪ Leucocidina ▪ Toxina exfoliatina ▪ Toxina del shock tóxico ▪ Enterotoxinas 	Rotura de la membrana celular Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos Epidermólisis Shock Intoxicación alimentaria

la epidermis, resultando en la separación intraepitelial de las uniones en el estrato granuloso. Las cepas productoras de una o ambas proteínas son responsables del síndrome de piel escaldada (ver más adelante).

- Enterotoxinas: se trata de moléculas termoestables responsables de la intoxicación alimentaria producida por algunas cepas *S. aureus*. El modo de acción de estas toxinas no es aún conocido pero se sabe que aumentan el peristaltismo (ver más adelante).
- Toxina del shock tóxico (TSST-1): Es también denominada como enterotoxina F. Esta implicada en la patogenia del síndrome del shock tóxico. Aunque su rol es poco claro tiene una gran cantidad de actividades biológicas. En modelos animales potencia la actividad letal de pequeñas cantidades de endotoxina.

Estos tres tipos de toxinas antes mencionadas (enterotoxinas, exfoliatinas y TSST-1) actúan como superantígeno, lo que significa que pueden activar linfocitos T directamente (alta afinidad por el complejo de histocompatibilidad tipo II), sin la mediación de células presentadoras de antígeno, resultando en la liberación de citoquinas. Esto puede determinar importantes efectos sistémicos como fiebre, hipotensión, lesiones en piel, shock, fallo multiorgánico y muerte.

FACTORES PREDISPONENTES DEL HUESPED

Las infecciones causadas por *S. aureus*, no solo dependen de los factores de agresión que este microorganismo posee, sino también de alteraciones en los mecanismos de defensa del huésped. Dentro de los factores predisponentes del huésped tenemos:

- Defectos de quimiotaxis leucocitaria congénitos o adquiridos (diabetes mellitus, artritis reumatoidea).
- Defectos de opsonización por anticuerpos (hipogamaglobulinemia).
- Defectos en la muerte intracelular luego de la fagocitosis (enfermedad granulomatosa crónica).

- Heridas de piel (quemaduras, incisiones quirúrgicas, eczema).
- Presencia de cuerpos extraños (suturas, vías venosas, prótesis).
- Infecciones por otros agentes, particularmente virus (influenza).
- Enfermedades crónicas como alcoholismo, falla renal crónica, enfermedades malignas, etc.

PATOGENIA

S. aureus produce infecciones de dos maneras:

1. En forma directa, por invasión y posterior destrucción tisular local (proceso supurado), o luego de haberse diseminado por vía sanguínea.
2. A través de efectos de toxinas.

La tabla 2 muestra los tipos de infección que produce *S. aureus* y la tabla 3 muestra la secuencia de eventos asociados a infecciones serias causadas por *S. aureus*.

INFECCIONES POR INVASIÓN

Este tipo de infecciones puede estar producido tanto por cepas de *S. aureus* residentes como no residentes. El primer paso de la infección es la adherencia y colonización de las células del huésped. Se describen tres tipos de adherencia. Por un lado, la adherencia a las células de la mucosa nasal mediada por los ácidos teicoicos y también es importante la adherencia a la mucina de la mucosa nasofaríngea. Por otro, la adherencia a piel traumatizada o pequeñas disrupciones de piel, así como también a objetos extraños y estructuras subendoteliales. Esta adherencia envuelve muchas proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, fibrinógeno, elastina, colágeno y otras. Estas proteínas interactúan con diferentes receptores de *S. aureus*, antes mencionados. Por último, la adherencia de *S. aureus* a las células endoteliales durante los eventos de sepsis es un proceso complejo donde están involucradas la fibronectina, el fibrinógeno y la laminina.

Una vez los microorganismos atravesaron la barrera cutaneomucosa, llegan al tejido subcutáneo o submucoso y se diseminan rápidamente, formando abscesos. Esta es la lesión típica producida por este microorganismo. Los mecanismos de la invasión son poco conocidos pero a este nivel se desencadena la respuesta inflamatoria del huésped que contribuye a la formación de los abscesos. La respuesta defensiva más importante por parte del huésped son los PMN. Algunas veces el germen puede seguir invadiendo, buscando áreas más profundas y avasculares. Una vez se encuentran alrededor o dentro de los huesos, o protegidos dentro de coágulos, los microorganismos se hacen bastante resistentes al ataque y erradicación por los mecanismos defensivos del huésped.

Sólo la mayor intensidad de los factores bacterianos junto al fracaso de los mecanismos defensivos del huésped puede llevar a que las bacterias puedan llegar a la corriente sanguínea, diseminarse y producir focos de infección a distancia llamados abscesos metastásicos. Los eventos que llevan a la sepsis y muerte aún no son del todo conocidos. Aparentemente los ácidos teicoicos y el peptidoglicano podrían actuar como la endotoxina de los bacilos Gram negativos.

Además de infecciones de piel y partes blandas, *S. aureus* puede producir infecciones invasivas como neumonía, osteomielitis, bursitis, artritis y otras.

INFECCIONES POR ACCIÓN DE TOXINAS

Estas infecciones están causadas por la liberación al medio de sustancias tóxicas, que pueden ejercer su acción a cierta distancia del foco infeccioso.

Tabla 2. Infecciones producidas por *S. aureus*.

Invasión directa
Superficial
• Piodermas, incluyendo impétigo y paroniquia
• Infecciones de piel y tejidos blandos, forúnculos, celulitis, linfangitis, linfadenitis, etc.
Profunda
• Artritis séptica
• Osteomielitis
• Piomiositis
Diseminación por vía sanguínea
• Bacteriemia con o sin shock o falla multiorgánica
• Formación de abscesos metastásicos (cerebro, pulmón, hígado, bazo, retroperitoneo, riñón, tracto genital, etc.)
Enfermedades mediadas por toxinas
• Síndrome de piel escaldada
• Intoxicación alimentaria
• Síndrome del shock tóxico

Tabla 3. Secuencia de eventos patogénicos en infecciones serias causadas por *S. aureus*

Colonización, portador, producción de toxina
Rotura de barrera cutaneomucosa
Invasión
• Celulitis, linfangitis
• Formación de absceso
• Eventual invasión de la sangre
Bacteriemia
Síndrome de sepsis
• Componentes de la pared
• Toxina del shock tóxico
• Rol de los mediadores disparados
Complicaciones
• Abscesos supurados metastásicos, endocarditis, etc.
• Shock séptico o falla multiorgánica
Muerte

1. *Síndrome de piel escaldada*: se debe a la producción de la toxina exfoliativa en un foco, que luego pasa al torrente sanguíneo, pudiendo diseminarse hasta regiones alejadas del foco donde no es posible aislar ningún germen. Esta toxina produce la formación de ampollas y la subsiguiente descamación de láminas epidérmicas, que puede estar localizada en una región o estar diseminada por todo el cuerpo. Se presenta con mayor frecuencia en recién nacidos y niños pequeños.
2. *Síndrome del shock tóxico*: es un cuadro grave que en el pasado se ha observado asociado a la utilización de tampones vaginales por parte de mujeres jóvenes. El microorganismo prolifera en el tampón contaminado y produce la toxina del shock tóxico. El cuadro clínico está caracterizado por fiebre, hipotensión, exantema cutáneo en manos y pies,

grados variables de vómitos, diarrea, falla renal, cefalea y conjuntivitis. Evoluciona al shock grave en 48 horas. También se asocia a heridas traumáticas o quirúrgicas.

3. *Intoxicaciones alimentarias*: se producen por la contaminación de alimentos, que suelen ser de elevado contenido en proteínas e hidratos de carbono como pasteles, helados y salsas, y con pH superior a 5, que permitirán un rápido crecimiento bacteriano. La mala refrigeración y conservación hacen que el microorganismo prolifere, y si es una cepa productora de enterotoxina termoestable, la libera en cantidad suficiente como para producir intoxicación. El tiempo de incubación es corto (1 a 6 horas) y los síntomas son vómitos y diarrea de hasta 2 días de duración, en general sin fiebre, siendo normalmente de rápida recuperación. Este proceso sólo requiere hidratación y no necesita de tratamiento antibiótico.

RESPUESTA DEL HUÉSPED

La integridad de la barrera cutánea y un sistema fagocítico intacto son los principales mecanismos de defensa contra las infecciones estafilocócicas. La primera línea de defensa luego de atravesar la barrera cutánea son los PMN y el sistema monocito-macrófago. La movilización de las células fagocíticas hacia el sitio de crecimiento bacteriano requiere la elaboración de señales microbianas y específicas del huésped. El reconocimiento de *S. aureus* por los fagocitos está mediado por sus receptores para el fragmento Fc de la IgG, por sus receptores para la subunidad C3b del complemento, y posiblemente por otros receptores del complemento. Para ser fagocitado, por tanto, *S. aureus* debe estar recubierto por C3b o IgG, proceso que se llama opsonización. En cepas con cápsula se necesitan anticuerpos anticápsula para la opsonización. La proteína A tiene, como ya vimos, una importante función antifagocítica. Luego de ser fagocitados, la mayoría de los estafilococos intracelulares son destruidos rápidamente y degradados dentro de la vacuola fagocítica, pero puede demostrarse la sobrevivencia de una minoría, lo que podría explicar el índice de recurrencia de algunas infecciones por *S. aureus*.

Durante la infección estafilocócica se producen algunos anticuerpos contra distintos antígenos de la pared celular, así como contra varias toxinas. En la actualidad ninguno ha logrado inducir una protección completa contra la infección por *S. aureus*.

CUADROS CLÍNICOS

La lesión característica producida por *S. aureus* es el absceso, este se puede presentar a nivel de la piel como forúnculo. Esta lesión es blanda, eritematosa y caliente. A las 24-48 horas desarrolla una pústula central blanca. Dentro, el material purulento es cremoso, amarillento, y frecuentemente tiene un centro constituido generalmente por un folículo piloso que es el sitio donde la infección se inició. Este tipo de infección también puede aparecer alrededor de cuerpos extraños y entonces el inóculo necesario para producir infección es más bajo y la llegada de antibióticos es menor.

RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

S. aureus puede poseer resistencia para diferentes antimicrobianos. En general los estafilococos aislados de infecciones comunitarias, hasta hace poco tiempo, no poseían muchos genes de resistencia salvo por la producción de penicilinasa. Sin embargo, actualmente asistimos a la emergencia de cepas comunitarias resistentes a meticilina u oxacilina (ver más adelante). En cuanto a los aislamientos de origen nosocomial, un elevado porcentaje de los mismos tienen varios determinantes de resistencia y fundamentalmente resistencia a meticilina, asociada a resistencia a aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas.

Resistencia a β -lactámicos

Existen variados mecanismos que median resistencia a β -lactámicos. La producción de β -lactamasa inactiva ciertos β -lactámicos por medio de la hidrólisis del anillo β -lactámico. Estas enzimas atacan a la penicilina G, ampicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas. El producto de hidrólisis carece de actividad antibacteriana. Más del 90% de los aislamientos de *S. aureus* produce este tipo de enzimas, también llamadas penicilinasas. Parte de la enzima que se produce es excretada al medio externo y parte permanece adherida a la membrana celular. Se han reconocido cuatro variantes de β -lactamasa llamadas A, B, C y D. En la mayoría de los aislamientos esta enzima es codificada por plásmidos, pero también se puede encontrar a nivel cromosómico como parte de un elemento transponible.

Por otro lado tenemos la resistencia a metilicina u oxacilina. Ésta consiste en la producción de una nueva proteína fijadora de penicilina (*penicillin-binding protein*) PBP, llamada PBP2a o PBP2', no presente en las cepas sensibles. Esta nueva PBP tiene una afinidad disminuida por la mayoría de los β -lactámicos y cefalosporinas. Se trata de una transpeptidasa, la cual se encarga de la síntesis de la pared cuando las otras PBPs están inactivas por estar ligadas al beta lactámico. Esta nueva PBP está codificada por un gen llamado *mecA* que esta presente en el cromosoma de todas las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina. Presumiblemente la región *mec* se origino en estafilococos coagulasa negativos y luego se transfirió a *S. aureus*.

Cuando una cepa es resistente a metilicina significa que la cepa es resistente a todos los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenems).

Resistencia a glicopéptidos

La resistencia a glicopéptidos en estafilococos se ha descrito en aislamientos clínicos de estafilococos coagulasa negativos como *S. haemolyticus* y en los últimos años se comenzaron a describir aislamientos de *S. aureus* con sensibilidad disminuida y también resistentes a los glicopéptidos. Se necesitan todavía más estudios para establecer el exacto mecanismo molecular de resistencia a glicopéptidos. No se han aislado cepas con este tipo de resistencia en nuestro país.

Resistencia a macrólidos

En *S. aureus* la resistencia a la eritromicina tiene dos fenotipos. El primero es conferido por una modificación del rRNA blanco por enzimas constitutivas o inducibles que metilan un residuo específico en el rRNA. Este evento resulta en una disminución de la unión a la eritromicina, a otros macrólidos y a las lincosaminas. Los genes que codifican esta resistencia se encuentran tanto en plásmidos como en el cromosoma. El segundo fenotipo abarca una resistencia inducible a macrólidos. Se trata de un gen localizado en un plásmido que codifica una bomba de eflujo ATP-dependiente.

Resistencia a aminoglucósidos

En *S. aureus* la resistencia a aminoglucósidos puede ser consecuencia de uno de tres posibles eventos.

1. Una mutación cromosómica que codifica una alteración del sitio de acción en el ribosoma.
2. Transporte inefectivo, lo que produce una resistencia de bajo nivel.
3. La producción de enzimas modificadoras, el cual es el mecanismo más comúnmente

encontrado. Estas se pueden codificar a nivel de transposones localizados en plásmidos o en el cromosoma.

Resistencia a quinolonas

La resistencia a las quinolonas es debida a una actividad disminuida de la girasa, mediada por mutaciones puntuales localizadas en el gen *gyrA* cromosómico, el gen estructural de la subunidad A de la DNA girasa. Una mutación puntual en otro gen, el *norA* lleva a la disminución de la acumulación de la droga dentro de la célula. Además las mutaciones en el gen *grlA* cromosómico, confieren una resistencia de bajo nivel a las fluoroquinolonas.

PERFILES DE RESISTENCIA

En nuestro país se pueden describir, en forma esquemática, la circulación de tres perfiles de resistencia. Uno está constituido por cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina u oxacilina, que en más del 90% de los casos son productoras de penicilinasas y, a veces, pueden tener determinantes de resistencia a macrólidos. El segundo perfil está constituido por cepas resistentes a meticilina u oxacilina sin resistencia acompañante a otros grupos de antibióticos salvo, a veces, resistencia a macrólidos. Este perfil se le denomina *S. aureus* meticilino-resistente perfil comunitario (SACOMR), ya que se empezó a detectar principalmente en cepas de origen comunitario aunque actualmente ya se detecta a nivel hospitalario. El tercer perfil está constituido por cepas multiresistentes que poseen resistencia a meticilina, asociada a resistencia a aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos, donde prácticamente la única opción terapéutica es la vancomicina. Este tipo de cepas se aísla mayoritariamente de infecciones de origen nosocomial.

Staphylococcus epidermidis

El grupo de estafilococos coagulasa negativos está constituido por un gran número de especies. En la tabla 4 se pueden ver las especies relacionadas con patología humana. *S. epidermidis* es una de las especies que más frecuentemente se aísla. Comparte las características del género con respecto a la morfología y fisiología. En relación a la estructura, a nivel de la pared celular, a diferencia de *S. aureus*, los puentes de pentaglicina del peptidoglicano no están presentes y se sustituyen algunas moléculas de glicina por L-serina.

Con respecto a la patogenicidad, *S. epidermidis* es capaz de producir macromoléculas de superficie y extracelulares, que inician y luego aumentan la adhesión bacteriana a la superficie plástica de cuerpos extraños. La adherencia inicial de *S. epidermidis* parece estar mediada por una adhesina polisacárida llamada PS/A y otras proteínas de superficie. La PS/A se trata de un polímero de galactosa-arabinosa de alto peso molecular. Los anticuerpos dirigidos contra PS/A bloquean la adherencia de *S. epidermidis*. Luego de la adherencia inicial, hay otra fase llamada de adherencia intracelular que es mediada por un polisacárido llamado PIA y una proteína extracelular. Esto permite la formación de varias capas de células bacterianas adheridas entre sí que forman el llamado *slime* o biofilm. Este *slime* sirve para proteger a los microorganismos de los agentes antimicrobianos y de las células fagocíticas. En general, es necesaria la remoción del cuerpo extraño para lograr la cura de la infección. El *slime* parece tener otras actividades biológicas, dentro de las cuales se cuentan la inhibición de la proliferación de linfocitos T y un efecto adverso sobre la opsonización y fagocitosis.

Las infecciones causadas por *S. epidermidis* se relacionan con la colonización de cuerpos extraños, especialmente en el paciente hospitalizado. En el caso de la colonización de catéteres

Tabla 4.

Especies de <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos relacionadas con infecciones humanas	
<i>S. epidermidis</i> *	<i>S. xylosus</i>
<i>S. saprophyticus</i> *	<i>S. cohnii</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. warneri</i>	<i>S. auricularis</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>
<i>S. hominis</i>	<i>S. schleiferi</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. pasteurii</i>
<i>S. caprae</i>	
*Especies que más frecuentemente se aíslan en infecciones humanas	

intravenosos, puede aparecer flebitis y fiebre, y eventualmente se produce una bacteriemia y sepsis. La colonización de válvulas cardíacas protésicas puede producir endocarditis precoces y tardías. Estas infecciones conducen, en casos graves, a la retirada de la válvula contaminada. La utilización de otros dispositivos como prótesis osteoarticulares, catéteres peritoneales y derivaciones de líquido cefalorraquídeo, también pueden ser susceptibles a contaminación por *S. epidermidis*. Ya que la mayoría de estos cuadros se producen dentro del ámbito hospitalario, las cepas de *S. epidermidis* aisladas frecuentemente son resistentes a meticilina. Estas cepas, además, pueden presentar los mismos genes de resistencia ya comentados para *S. aureus*.

La mayoría de las veces que aislamos *S. epidermidis* de una muestra clínica en el laboratorio de microbiología, este constituye un contaminante. Esta especie, al ser flora normal de piel, muchas veces contamina las muestras en el momento de la toma, creando dificultades para interpretar los resultados de los cultivos. Es el contaminante más importante en muestras de hemocultivo, líquidos biológicos o exudados de herida, donde su aislamiento debe ser interpretado con precaución, teniendo en cuenta las condiciones de extracción de la muestra y la condición clínica del paciente.

Staphylococcus saprophyticus

Presenta características similares a *S. epidermidis* pero es resistente a la novobiocina y la composición de los ácidos teicoicos es de fosfato de ribitol. Se encuentra ampliamente distribuido siendo causante de hasta el 20% de las infecciones urinarias extrahospitalarias en mujeres jóvenes, causan afecciones del tracto urinario bajo sin alteraciones estructurales. No presenta problemas de resistencia antibiótica.

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Además de los datos clínicos y epidemiológicos, fundamentales para la orientación diagnóstica, es preciso confirmarlo con el diagnóstico microbiológico.

Toma de muestras

Se realizará de la forma habitual, en procesos generalizados con posibilidad de bacteriemia se realizarán hemocultivos. En el caso de procesos supurados se realizará la toma de la muestra con aguja y jeringa, siempre que sea posible. Los estafilococos son bastante resistentes a las condiciones ambientales adversas pero de todas maneras es necesario tomar precauciones en el transporte y conservación de la muestra.

Examen directo

En el caso de procesos supurados, el examen directo de la muestra con tinción de Gram nos permitirá observar los cocos Gram positivos agrupados en racimos, junto a un gran número de leucocitos polimorfonucleares.

Cultivo

En cuanto a los requerimientos atmosféricos el género *Staphylococcus* es aerobio-anaerobio facultativo, por tanto su crecimiento en caldo tioglicolato se hará en toda la extensión del tubo. Desde el punto de vista nutricional es no exigente, por lo tanto crece tanto en medios de cultivo pobres, como el agar simple, como en medios ricos, como el agar sangre ovina.

Identificación

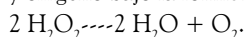
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas o ensayos bioquímicos son aquellas reacciones que ponen en evidencia la existencia de una enzima o pasos metabólicos determinados, y que muchas veces nos permiten llegar a la identificación a nivel de especie. Ahora enumeraremos las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación de los estafilococos.

PRUEBA DE LA CATALASA

Objetivo: separar *Staphylococcus* y *Micrococcus* (catalasa positivos) de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativos).

Fundamento: la enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno bajo la fórmula



De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H_2O_2 , que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares.

Procedimiento: se coloca una gota de H_2O_2 al 3% sobre un portaobjetos y luego se transfiere una porción de colonia sobre el H_2O_2 realizándose una emulsión. En lo posible debe tomarse la colonia a partir de un medio sin sangre, ya que los eritrocitos tienen actividad de catalasa y pueden falsear los resultados. Esta prueba también puede realizarse a partir de un cultivo en tubo, simplemente colocando unas gotas de H_2O_2 dentro del mismo.

Interpretación de resultados: el desprendimiento de burbujas se considera una prueba positiva.

Para diferenciar *Staphylococcus* de *Micrococcus* se realizan distintas pruebas bioquímicas que se mencionan en la tabla 5. La lisostafina es una endopeptidasa que cliva los puentes de pentaglicina presentes en la pared de lo estafilococos, por eso el género *Staphylococcus* es sensible a su acción.

Dentro del género *Staphylococcus* existen tres especies que se consideran de mayor im-

Tabla 5

Caracteres	<i>G. Staphylococcus</i>	<i>G. Micrococcus</i>
Lisostafina	S	R
Sensibilidad a bacitracina (disco 0,04 U)	R	S
Utilización de glucosa anaerobia	+	-

+, reacción positiva; -, reacción negativa; S, sensible; R, resistente.

portancia médica: *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *S. epidermidis*. Estas se diferencian según las pruebas bioquímicas que se detallan en la tabla 6.

Tabla 6.

Caracteres	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Coagulasa	+	-	-
DNAsa	+	-	-
Nucleasa termoestable	+	-	-
Presencia de proteína A	+	-	-
Susceptibilidad a la novobiocina	R	R	S

+, reacción positiva; -, reacción negativa; S, sensible; R, resistente.

PRUEBA DE LA COAGULASA

Objetivo: permite separar *S. aureus*, que posee coagulasa, de las otras especies de estafilococos que genéricamente se las denomina estafilococos coagulasa negativos (ScN).

Fundamento: *S. aureus* posee dos tipos de coagulasa:

- Una endocoagulasa o coagulasa ligada o *clumping factor*, que está unida a la pared celular. Esta actúa directamente sobre el fibrinógeno provocando la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma citratado (test en lámina).
- Una exocoagulasa o coagulasa libre que actúa mediante la activación de un factor sérico (CRF), formándose un complejo coagulasa-CRF, el cual reacciona con el fibrinógeno produciéndose un coágulo de fibrina (test en tubo).

Mientras el test en tubo es definitivo, el test en lámina nos sirve como una rápida y económica técnica de tamizaje (*screening*). Entre un 10 a 15% de las cepas de *S. aureus* se mostrarán negativas en el test en lámina, por lo cual en esos casos se hace necesario realizar un test en tubo.

- **Test en lámina**

Procedimiento: se emulsionan sobre un portaobjetos una o más colonias en una gota de suero fisiológico hasta formar una suspensión lechosa. Luego se agrega, al lado, una gota de plasma citratado de conejo y se mezclan.

Interpretación de resultados: debe realizarse dentro de los primeros diez segundos. Un test positivo se evidencia por la formación de grumos. Los test negativos deben ser confirmados por test en tubo.

- **Test en tubo**

Procedimiento: se emulsionan varias colonias en un tubo con 0,5 ml de plasma citratado de conejo. Se incuba a 35 °C y se chequea la formación del coágulo a las 4 horas. Si es negativo se reincuba toda la noche y se procede a su lectura a las 18 horas. La lectura a las 4 horas es fundamental porque en alguna oportunidad puede suceder que las fibrinolisininas de *S. aureus* lisen el coágulo luego de 18 horas de incubación y de esta manera se produzcan un test falso negativo.

Interpretación de resultados: se observa la formación de un coágulo total o parcial si el test es positivo.

AGLUTINACIÓN CON PARTÍCULAS DE LÁTEX

Objetivo: permite separar *S. aureus* de otras especies de estafilococos. Es un test alternativo para detectar la presencia de la coagulasa y la proteína A.

Fundamento: se utilizan partículas de látex cubiertas con plasma. El fibrinógeno se une al látex y detecta el *clumping factor*. Además, las inmunoglobulinas presentes en las partículas detectan la proteína A, capaz de unirse a la porción Fc de la IgG.

Procedimiento: se trata de test comerciales por lo cual cada formulación tiene su procedimiento específico. Generalmente se mezcla el reactivo del test con una porción de la colonia.

Interpretación de resultados: la formación de grumos indica un test positivo.

PRESENCIA DE DESOXIRRIBONUCLEASA (DNASA)

Objetivo: permite diferenciar *S. aureus* que posee DNAsa de otras especies del género *Staphylococcus*.

Fundamento: se basa en la presencia de la enzima DNAsa que es capaz de clivar los enlaces fosfodiéster internos de la molécula de DNA. Se utiliza un medio sólido que contiene verde de metilo, el cual se combina con DNA altamente polimerizado. Cuando la combinación no ocurre, por acción de la enzima DNAsa, se produce una decoloración del medio. Existen otros tipos de medios de cultivo como el que contiene azul de toluidina metacromático en vez de verde de metilo.

Procedimiento: se siembra una colonia de estafilococo en forma de moneda en una placa de medio sólido que contiene DNA y verde de metilo. Se incuba 18 horas a 35 °C.

Interpretación de resultados: la formación de un halo transparente alrededor de la siembra indica presencia de DNAsa.

PRESENCIA DE NUCLEASA TERMOESTABLE

Objetivo: permite diferenciar *S. aureus*, que posee esta enzima, de otras especies que no.

Fundamento: se basa en la presencia de nucleasa termoestable, que es una enzima con propiedades endo y exonucleolíticas y capaz de clivar DNA y RNA. Existen varias formas de investigar la presencia de esta enzima. Se utilizan cualquiera de los medios sólidos mencionados en la prueba anterior pero en estos se realizan hoyos de aproximadamente 3 mm de diámetro.

Procedimiento: cada hoyo se llena con un cultivo en caldo de la cepa en estudio, que ha sido previamente llevado a 100 °C por 15 minutos. Se incuba 18 horas a 35-37 °C.

Interpretación de resultados: se interpreta igual que la prueba anterior.

SUSCEPTIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA

Objetivo: separar *S. saprophyticus* (resistente a la novobiocina) de los demás estafilococos coagulasa negativos.

Fundamento: varias especies del género *Staphylococcus* son resistentes a la novobiocina (disco de 5 µg.) dentro de las cuales se encuentra *S. saprophyticus*.

Procedimiento: se siembra una placa de agar sangre o agar Mueller-Hinton como si se fuera a realizar un antibiograma. Se utiliza un hisopo embebido en una suspensión, con una turbidez equivalente a un Mc Farland 0,5, de la cepa a estudiar. Luego se aplica el disco de novobiocina y se incuba a 35 °C por 18 horas.

Interpretación de resultados: un halo de inhibición de crecimiento menor o igual a 16

mm corresponde a *S. saprophyticus*. Un halo de inhibición mayor de 16 mm corresponde a otros estafilococos coagulasa negativos.

SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN COMERCIAL

Las pruebas anteriormente descritas se utilizan en forma manual pero existen sistemas de identificación comercial para identificar las especies dentro del género *Staphylococcus*. Los kits comerciales disponibles utilizan, para la identificación, test de fermentación de azúcares modificados, adaptación de test manuales estándar y sustratos enzimáticos cromogénicos. Estos sistemas de identificación son adaptados a un formato particular utilizado por el fabricante (por ej.: tira con microcúpulas, tarjetas plásticas, pequeñas bandejas, etc.). Existen también sistemas de identificación a nivel molecular. Para *S. aureus* existen sondas genéticas para su detección rápida con un 100% de especificidad.

Bibliografía

1. Sheagren J. and Schaberg D. Staphylococci. En Infectious Diseases. Gorbach, Barlett and Blacklow. Pag.1697-1703. 1998. Ed WB Saunders.
2. Waldvogel FA.. Staphylococcus aureus. Mandel, Douglas, Bennet Principles and Practice of Infectious diseases.. 2000. Ed WB Saunders.
3. Archer GL. Staphylococcus epidermidis and Other Coagulase-Negative Staphylococci. Mandel, Douglas, Bennet Principles and Practice of Infectious diseases.. 2000. Ed WB Saunders.
4. Maradan C., Moreira B., Boyle-Vavra S. et al. Antimicrobial resistance in Staphylococci. Infectious Diseases of North America. 1997. Vol.11.(4). Pag 813-841.
5. Chambers H. Methicilin Resistance in Sthaphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. Clin.Microbiol.Rev. 1997. Vol.10.(4). Pag.781-791.
6. Hiramatsu K.The emergence of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. Am J Med, 1998. 104: 5A, 7S-10S
7. Prieto J y Gomez-Lus ML. Género Staphylococcus. Microbiología Médica. Garcia-Rodriguez, Picazo. Pag 179-191. 1996. Ed Doyma.

