

COCOS GRAM POSITIVOS: Aspectos prácticos

Verónica Seija

TAXONOMIA - Breve reseña

Antes de entrar de lleno en la identificación del género **Staphylococcus** realizaremos una breve introducción a la taxonomía de los cocos Gram positivos.

Estos se pueden clasificar, en primera instancia, en cuanto a sus requerimientos atmosféricos. Así tenemos los cocos Gram positivos anaerobios estrictos constituidos por los géneros **Peptococcus** y **Peptoestreptococcus**, los cuales serán estudiados en el capítulo referido a bacterias anaerobias.

Por otro lado tenemos los cocos Gram positivos aerobios y anaerobios facultativos que están constituidos por la familia **Micrococaceae** (géneros **Staphylococcus**, **Micrococcus**, **Planococcus** y **Stomacoccus**) y los géneros **Streptococcus** y **Enterococcus**.

GENERO STAPHYLOCOCCUS

IDENTIFICACION

Durante el curso se le entregarán a los estudiantes distintas cepas de cocos Gram + para su identificación.

El primer paso para la identificación de una especie bacteriana es el estudio de su morfología microscópica y macroscópica. Luego se deben estudiar sus requerimientos atmosféricos y nutricionales. Por último se procede a la realización de pruebas bioquímicas que permitirán llegar a la identificación de género y especie bacteriana.

Morfología microscópica

Para la misma se debe realizar un frotis, de preferencia a partir de medio líquido, realizando luego la tinción de Gram lo que nos permitirá apreciar la forma, agrupación y comportamiento al Gram de la cepa en estudio. El género **Staphylococcus** se caracteriza por ser cocos Gram positivos que se agrupan en forma de racimo.

Morfología macroscópica

Existe morfología macroscópica en medio líquido y en medio sólido. En medio líquido debemos observar la turbidez que se desarrolla luego de incubar 18-24 horas.

En medio sólido 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, que son las estructuras macroscópicas que forman las bacterias cuando crecen en medios sólidos.

Requerimientos atmosféricos

El género **Staphylococcus** es aerobio-anaerobio facultativo, por tanto su crecimiento en tioglicolato será en toda la extensión del tubo.

Requerimientos nutricionales

El género **Staphylococcus** es no exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales, por lo tanto crece en medios de cultivo pobres.

ENSAYOS BIOQUIMICOS

Las pruebas o ensayos bioquímicos son aquellas que ponen en evidencia la existencia de una enzima o pasos metabólicos determinados.

Ahora enumeraremos las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación de los estafilococos.

1. PRUEBA DE LA CATALASA

Objetivo: Separar la **Flia. Micrococaceae** (catalasa +) de los **Géneros Streptococcus** y **Enterococcus** (catalasa -).

Fundamento: La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno bajo la fórmula $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. 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 en un aislamiento 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.

Dentro de la **Flia. Micrococaceae** existen 4 géneros, el de mayor importancia clínica es el **Género Staphylococcus**. Para diferenciarlo del **Género Micrococcus** se realizan distintas pruebas bioquímicas que sólo mencionaremos en la Tabla N° 2.

Dentro del **G.Staphylococcus** existen 3 especies de importancia clínica: **S.aureus**, **S.saprophyticus** y **S.epidermidis**. Estas se diferencian según las pruebas bioquímicas que se detallan en la Tabla N° 3.

2. PRUEBA DE LA COAGULASA

Objetivo: Permite separar **S.aureus**, que posee coagulasa, de las otras especies de estafilococos que genéricamente se denominan coagulasa negativos.

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

a. 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).

Tabla No. 1

Catalasa	Cadenas o diplos al gram	Racimos al Gram	Exigentes	Aerobio estricto	Oxidasa	PYR	Crecimiento en NaCl	Esculina	Género
+		+	-	+	+		+ a		<i>Micrococcus</i>
+		+	-	-	+		+ a		<i>Staphylococcus</i>
-	+		-			+	+ b	+	<i>Enterococcus</i>
-	+		+						

+, reacción positiva; -, reacción negativa

a Crecimiento en presencia de 5% de NaCl

b Crecimiento en presencia de 6,5% de NaCl

Tabla Nº 2

CARACTERES	G. STAPHYLOCOCCUS	G. MICROCOCCUS
Bacitracina (disco 0.04 U)	positivo	negativo
Lisostafina	sensible	resistente
Utilización de glucosa anaerobia	positiva	negativa

Tabla Nº 3

CARACTERES	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
COAGULASA	+	-	-
DNAsa	+	-	-
NUCLEASA TERMOESTABLE	+	-	-
PRESENCIA DE PROTEINA A	+	-	-
SUSCEPTIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA	R	R	S

b. Una exocoagulasa o coagulasa libre que actúa mediante la activación de un factor (CRF), formándose un complejo coagulasa-CRF, el cual reacciona con el fibrinógeno produciéndose un coágulo de fibrina (test en tubo).

Test en lámina

Procedimiento: Se emulsionan una o más colonias en una gota de suero fisiológico hasta formar una suspensión lechosa sobre un portaobjetos. Luego se agrega 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 0,5ml de plasma citratado de conejo. Se incuba a 35° 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.

3.PRESENCIA DE DESOXIRRIBONUCLEASA (DNAsa)

Objetivo: Permite diferenciar **S.aureus** que es la única especie dentro del **Género Staphylococcus** que posee DNAsa de las otras especies.

Fundamento: Se basa en la presencia de la enzima termoestable 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.

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°.

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

4. 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).

Procedimiento: Se siembra una placa de agar sangre con un hisopo embebido en una suspensión de la cepa a estudiar. Luego se aplica el disco de novobiocina y se incuba a 35° por 18 horas.

Interpretación de resultados: Un halo de inhibición de crecimiento menor o igual a 16mm corresponde a **S.saprophyticus**. Un halo de inhibición mayor de 16mm corresponde a otros estafilococos coagulasa negativos.

GENERO STREPTOCOCCUS

Como ya mencionamos para el **Género Staphylococcus** la identificación comienza con el estudio de la morfología macroscópica y microscópica, la cual ya fue comentada en el capítulo teórico correspondiente.

En este capítulo práctico sólo estudiaremos aquellas especies más frecuentes en la práctica clínica, las cuales serán entregadas a los estudiantes para su identificación.

En cuanto a los requerimientos nutricionales el **Género Streptococcus** es exigente y por lo tanto debe ser cultivado en medios ricos que le aporten los nutrientes necesarios, por ejemplo, agar sangre ovina.

Dentro de las pruebas bioquímicas para la identificación, la primera, luego de determinar que se trata de un coco Gram positivo, es la prueba de la catalasa. La misma ya fue comentada en el capítulo de estafilococos.

Luego de determinar que se trata de un coco Gram positivo catalasa negativo, debemos proceder a observar el efecto que tiene la cepa sobre el agar sangre (hemólisis). Así podemos clasificar este grupo de gérmenes en:

β hemolíticos: son aquellos que producen una hemólisis total de los glóbulos rojos, observándose como un halo transparente alrededor de las colonias.

α hemolíticos: son aquellos que producen hemólisis parcial, la cual se observa como un halo con tonalidad verdosa alrededor de las colonias.

Gamma hemolíticos: son aquellos que no producen hemólisis sobre el agar sangre.

ESTREPTOCOCOS β HEMOLITICOS

Los grupos más importantes son aquellos que se mencionan en la Tabla N° 1, junto a las pruebas bioquímicas que se utilizan para su diagnóstico presuntivo. **Siempre** se requieren pruebas de confirmación serológica posterior para realizar un diagnóstico definitivo. **Str. grupo D** es incluido dentro de los β-hemolíticos, ya que existen cepas de **Str. faecalis** que pueden ser β-hemolíticas.

SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA

Objetivo: Separar el **Streptococcus pyogenes** de los demás estreptococos beta hemolíticos.

Fundamento: **Streptococcus pyogenes** es sensible a bajas concentraciones de Bacitracina (discos conteniendo 0,04U). También existe un 5% de cepas de **Str. agalactiae** que son sensibles a la Bacitracina.

Procedimiento: Se realiza sembrando un gran inóculo, tomado con asa bacteriológica de un cultivo puro, que se estra sobre una placa de agar sangre en varias direcciones intentando obtener un cultivo confluyente. Luego se coloca el disco de Bacitracina y se incuba 18-24 horas a 37°.

Interpretación de resultados: La aparición de cualquier diámetro de halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco se considera prueba positiva.

2. HIDROLISIS DEL PYR

Objetivo: Separar **Streptococcus pyogenes** y **Enterococcus** de los demás estreptococos.

S.pyogenes y **Enterococcus** poseen la capacidad de hidrolizar el sustrato PYR (pirridonil β-naftilamida) debido a que poseen la enzima l-piroglutamil aminopeptidasa. Existen varias configuraciones comerciales de este test por eso no detallaremos ninguna en particular. En general siempre se revelan por un cambio de color. Este test es más específico y menos laborioso que realizar el test de sensibilidad a la Bacitracina y la bilis esculina y caldo salado (se verán más adelante).

Algunos grupos, como el D, ya fueron mencionados en la Tabla 3. Dentro de este grupo se incluyen también **Streptococcus pneumoniae** y **Streptococcus** del grupo Viridans. El primero siempre es alfa-hemolítico, mientras los segundos pueden ser alfa o gamma hemolíticos. Ahora describiremos los ensayos bioquímicos utilizados para su identificación.

4. BILIS ESCULINA

Tabla N°4

	Hemólisis	Bacitracina	SXT	CAMP	PYR	Bilis esculina	Caldo salado	Optoquina
Grupo A	β	S	R	-	+	-	-	R
Grupo B	β o γ	R	R	+	-	-	v	R
Grupos C, F y G	β	v	S	-	-	-	-	R
Enterococos	γ, β o α	R	R	-	+	+	+	R
Grupo D No enterococos	α o γ	R	S	-	-	+	-	R
Viridans	α o γ	v	S	-	-	v	-	R
Neumococo	α	v	S	-	-	-	-	S

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

3. PRUEBA DE CAMP

Objetivo: Separar **Str.agalactiae** de los demás estreptococos β-hemolíticos.

Fundamento: Se basa en que los estreptococos del grupo B producen un factor llamado CAMP (factor de monofosfato de adenina cíclica) que aumenta la zona de hemólisis producida por un estafilococo productor de β-lisina.

Procedimiento: Se realiza estriando un cultivo de estreptococo β-hemolítico en forma perpendicular a una estría de un estafilococo productor de β-lisina en agar sangre. Se incuba 18-24 horas a 37°C.

Interpretación de los resultados: La prueba positiva se evidencia por la presencia de una zona de potenciación de la hemólisis en forma de puntas de flecha en el lugar donde se contactan las dos estrías.

ESTREPTOCOCOS ALFA Y GAMMA HEMOLITICOS

Objetivo: Separar los estreptococos del grupo D de los demás grupos de estreptococos.

Fundamento: Se basa en la capacidad de los estreptococos del grupo D de crecer en un medio de cultivo que contiene un 40% de bilis y de hidrolizar la esculina a esculetina, la cual se combina con el citrato ferroso que posee el medio, dando un complejo de color negro. La concentración de bilis es fundamental, ya que existen estreptococos del grupo Viridans que son capaces de crecer a concentraciones menores de bilis.

Procedimiento: Se realiza sembrando en superficie tubos de agar bilis esculina inclinado.

Interpretación de resultados: Una reacción positiva se evidencia como ennegrecimiento del medio.

5. PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SAL (Caldo salado)

Objetivo: Separar los enterococos, capaces de crecer en caldo salado, de los demás estreptococos del grupo D.

Fundamento: Se basa en la capacidad de los enterococos de crecer en una concentración de 6,5% de NaCl. Se trata de un medio de cultivo líquido que contiene además de NaCl, glucosa y un indicador de pH: púrpura de bromocresol.

Procedimiento: Se inocula el caldo salado con la cepa de **Str. grupo D** a estudiar y se incuba 18-24 horas a 35°.

Interpretación de resultados: Se considera la prueba positiva cuando aparece turbidez con o sin acidificación del medio, que se observa como un viraje de color del púrpura al amarillo. La no aparición de turbidez indica una prueba negativa.

6. PYR

La prueba de PYR se utiliza para la identificación del **Género Enterococcus**, como ya fue mencionado.

La especiación dentro del **Género Enterococcus** se obtiene realizando una serie de pruebas bioquímicas basadas en la utilización de distintos azúcares y aminoácidos.

SENSIBILIDAD A LA OPTOQUINA

Objetivo: Diferenciar **S.pneumoniae** de otros estreptococos α -hemolíticos.

Fundamento: Se basa en la sensibilidad de **S.pneumoniae** a una concentración menor o igual a 5 μ g/ml de hidroxiprina (optoquina).

Procedimiento: Estriar un cuadrante de una placa de agar sangre en varias direcciones con una suspensión Mc Farland 0,5. Colocar luego un disco de optoquina en el centro del área estriada. Incubar 18-24 horas a 37°C.

Interpretación de resultados: Halos de inhibición mayores de 15mm son característicos de **S.pneumoniae**.

IDENTIFICACION SEROLOGICA

Muchos **Streptococcus** aislados de infecciones humanas poseen antígenos específicos de naturaleza polisacárida (polisacárido C o ácidos teicoicos) que se encuentran en la pared celular.

La extracción del polisacárido C por diferentes técnicas y su posterior enfrentamiento con antisueros específicos definen una serie de grupos que se denominan con letras mayúsculas a partir de la A.

La utilidad de la extracción antigénica dependerá del tipo de hemólisis. En los estreptococos β -hemolíticos se ha confirmado como el mejor método para su clasificación. En los no β -hemolíticos, la extracción antigénica sólo es útil para la identificación de los grupos D y B.

Existen diferentes métodos para la extracción enzimática que no detallaremos. Actualmente se utilizan métodos de extracción rápida por medio de enzimas de extracción. Luego se procede a la identificación del polisacárido por medio de técnicas de aglutinación con partículas de látex que tienen absorbido el antisuero específico. También existen en el mercado kits comerciales que utilizan técnicas de coaglutinación.