

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Marcadores epidemiológicos de *Staphylococcus epidermidis*
implicados en patología humana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Mar Martín de Nicolás Moreno

Madrid, 2015

D 616.98
NIC
mar

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología

BIBLIOTECA UCM



5303492168

**MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS DE
STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS
IMPLICADOS EN PATOLOGIA HUMANA**



R. 17.956

María del Mar Martín de Nicolás Moreno

Madrid, 1992

Colección Tesis Doctorales. N.º 319/92

© María del Mar Martín de Nicolás Moreno

Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1992.
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-37224-1992

AS31125717

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología

MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*
IMPLICADOS EN PATOLOGIA HUMANA

Maria del Mar Martin de Nicolás Moreno
Director: Dr. Juan Antonio Sáez Nieto

Madrid, 1991

Autora:

MARÍA DEL MAR MARTÍN DE NICOLÁS MORENO

**Marcadores epidemiológicos de *Staphylococcus epidermidis*
implicados en patología humana.**

Director:

JUAN ANTONIO SÁEZ NIETO
Doctor en Ciencias Biológicas
Jefe de Servicio de Bacteriología
Instituto de Salud "Carlos III".

Ponente:

JOSEFINA RODRÍGUEZ DE LECEA
Doctora en Ciencias Biológicas
Profesora titular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
Facultad de Ciencias Biológicas

Año 1991

III

Memoria del trabajo que presenta
M^º DEL MAR MARTÍN DE NICOLÁS MORENO
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, 24 de Septiembre de 1991

Vº Bº

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Fdo. Juan Antonio Sáez Nieto

Fdo. M^º del Mar Martín de Nicolás Moreno

JUAN ANTONIO SÁEZ NIETO, Jefe del Servicio de
Bacteriología del Instituto de Salud "Carlos III"

CERTIFICA que:

el presente trabajo, realizado por MARÍA DEL MAR MARTÍN DE NICOLÁS MORENO para optar al grado de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, titulado "Marcadores epidemiológicos de *Staphylococcus epidermidis* implicados en patología humana", ha sido realizado bajo su dirección en el Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (C.N.M.V.I.S.) del Instituto de Salud "Carlos III" y considera que está preparado para su presentación.

Y para que conste, extiende el presente certificado en Madrid a veinte de septiembre de mil novecientos noventa y uno.

A Piedad, Nicolás
y Angelita.

Para Juan.

Agradecimientos

Quiero mostrar mi agradecimiento a muchas personas.

Al Dr. Juan Antonio Sáez Nieto, por permitirme trabajar bajo su dirección.

Al Dr. Jorge Alvar, por su amistad.

A Ana Vindel, por sus consejos y constante ayuda durante los años que he trabajado con ella.

A Luisi Azañedo, por enseñarme a "hacer manos" en el laboratorio.

A mis compañeras de laboratorio y a las personas del Servicio de Bacteriología que me prestaron su ayuda.

Deseo agradecerle a la Dra. Cecilia Martín Bourgon la revisión del manuscrito.

Gracias al Dr. Julio Casal Lombos, director del C.N.M.V.I.S. y al Instituto de Salud "Carlos III", por la concesión de una Beca de Iniciación a la Investigación.

A la Dra. Josefina Rodríguez de Lecea, por haber accedido a ser la tutora de esta Tesis.

A la Dra. Marta Rodríguez Creixens y al Dr. Óscar del Valle, microbiólogos hospitalarios, que regularmente han recogido cepas y las han enviado al laboratorio.

Por último, a Francisco, por el auxilio informático, pero sobre todo por su apoyo y confianza durante estos años.

ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
ÍNDICE DE TABLAS	XVIII
1.- <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1.- <u>INFECCIONES HOSPITALARIAS</u>	2
1.1.1.- <u>HISTORIA</u>	3
1.1.2.- <u>EPIDEMIOLOGÍA</u>	4
a) Distribución general	5
b) Costes	13
c) Fuentes de infección y reservorios .	13
d) Transmisión	14
e) Prevención y control	14
f) Vigilancia	14
1.1.3.- <u>MICROBIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES</u> <u>HOSPITALARIAS</u>	16
a) Aislamiento e identificación	16
b) Métodos de tipificación por medio de marcadores epidemiológicos:	17
- Biotipia	18
- Fagotipia	18
- Serotipia	19
- Bacteriocinotipia	19
- Antibiotipia	20
- Resistotipia	20
- Plasmidotipia	20
- Análisis del DNA plasmídico con endonucleasas de restricción	21
- Electroforesis de proteínas	22

- Electroforesis de isoenzimas	22
- Immunoblotting	23
- Análisis del DNA:	23
* Fingerprinting	24
* Hibridación de DNA	24
1.2.- EL GÉNERO STAPHYLOCOCCUS	25
1.2.1.- <u>TAXONOMÍA</u>	25
1.2.2.- <u>CARACTERÍSTICAS</u>	32
a) Morfológicas y estructurales	32
b) De cultivo	32
c) Metabólicas	32
d) Hábitat	33
1.2.3.- <u>ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS</u> ...	34
a) Patogenicidad y virulencia	34
- Toxinas y enzimas	34
- Factores de virulencia de	
la superficie celular	36
b) Implicación en las infecciones	
hospitalarias	38
1.3.- IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN	
DE LOS ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS	39
1.3.1.- <u>ESQUEMAS BÁSICOS Y AUTOMATIZADOS</u>'	39
1.3.2.- <u>MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN</u>	44
- Antibiotipia	44
- Biotipia	45
- Fagotipia	46
- Serotipia	47
- Plasmidotipia	48
- Análisis molecular de plásmidos	48
- Producción de "slime"	49

2.- OBJETIVOS	51
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	55
3.1.- AISLADOS	56
3.1.1.- PROCEDENCIA DE LAS CEPAS	56
a) Cepas de un estudio multicéntrico sobre la prevalencia de estafilococos en España (1986).....	56
b) Cepas de un estudio multicéntrico sobre la prevalencia de estafilococos en España (1990).....	56
c) Cepas de estafilococos coagulasa negativos epidemiológicamente relacionadas.....	56
3.1.2.- CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN.	56
3.2.- IDENTIFICACIÓN (biotipia)	57
a) Actividad coagulasa	57
b) Nucleasa termoestable	58
c) Estudio morfológico y producción de pigmento	58
d) Actividad hemolítica	58
e) Producción de acetilmetilcarbinol (acetoína)	59
f) Reducción de nitratos	59
g) Actividad fosfatasa	60
h) Fermentación de hidratos de carbono	61
i) Susceptibilidad a la novobiocina	61
j) Producción de ácido a partir del glicerol aeróbicamente en presencia de eritromicina	62

3.3.- INDUCCIÓN DE FAGOS LISOGÉNICOS	
o FAGOTIPIA INVERSA (juego autóctono)...	62
3.4.- FAGOTIPIA	63
3.4.1.- <u>PROPAGACIÓN DEL JUEGO DE</u>	
<u>BACTERIÓFAGOS</u>	63
a) Purificación del fago	63
b) Determinación del RTD	64
c) Propagación en medio sólido	64
d) Espectro lítico	65
3.4.2.- <u>TÉCNICA DE LA FAGOTIPIA</u>	67
a) Realización	67
b) Lectura de los resultados	67
c) Interpretación de los resultados	68
d) Controles	68
e) Fagotipia tras el tratamiento	
con calor	69
3.5.- OBTENCIÓN DEL JUEGO DE FAGOS	
DE "DEAN & WILLIAMS"	70
3.6.- PLASMIDOTIPIA	72
a) Preparación de los lisados	72
b) Electroforesis	73
c) Controles	73
3.7.- ESTUDIO DEL FACTOR DE VIRULENCIA	
"SLIME"	73
3.7.1.- <u>MÉTODOS:</u>	73
a) Método de Christensen	74
b) Aglutinación en porta	
con concavalina A	74
3.7.2.- <u>CONTROLES</u>	75

3.8.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD	
A LOS ANTIMICROBIANOS	75
a) Utilización de un panel comercial	75
b) Antibióticos probados	75
c) Control de los antimicrobianos	76
d) Interpretación de los resultados	77
3.9.- MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	78
- Agar-sangre	78
- Agar manitol salado	78
- Leche desnatada	79
- TSA (Agar triptosa con extracto de levadura)	79
- PBS (Tampón fosfato)	79
- BHI (Infusión de cerebro y corazón)	80
- Agar nucleasa termoestable	80
- Medio P	81
- Caldo RM/VP (producción de acetoina)	81
- Reactivos RM/VP	81
- Caldo nitrado	82
- Reactivos para la reducción de nitratos ...	82
- Agar nutritivo difosfato de fenolftaleína (actividad fosfatasa)	83
- Reactivos para la prueba de la fosfatasa ..	83
- Púrpura agar base (fermentación de hidratos de carbono)	83
- Novobiocina	84
- Eritromicina con glicerol	84
- Caldo común (Nutrient broth)	85
- Agar común 1.1	85
- Agar semisólido	85
- Cloruro cálcico	86
- Solución de lisis	86
- Solución alcalina	86

- Solución salina alta	87
- Solución fenol-cloroformo	87
- Cloruro sódico 5M	88
- Solución TE	88
- Tampón de electroforesis (TAE 1X)	88
- Colorante para electroforesis	89
- Bromuro de etidio	89
- TSB (caldo con soja tríplica)	89
4.- RESULTADOS	90
4.1.- ESTUDIOS MULTICÉNTRICOS:	91
4.1.1.- AÑO 1986:	91
a) Procedencia e identificación de los aislados	91
b) Valoración de la muestra estudiada:	93
b.1.- Origen de los aislados	93
b.2.- Distribución en los distintos servicios del hospital ..	96
c) Inducción de fagos lisogénicos o fagotipia inversa (juego de fagos autóctono)	97
d) Propagación de los fagos	97
e) Obtención del juego de fagos de "Dean and Williams"	98
f) Espectro lítico de ambos juegos de fagos	98
g) Fagotipia:	101
g.1.- Proporción de tipabilidad ...	101
g.2.- Patrones de fagotipia	103
g.3.- Frecuencias de patrones de fagotipia	107

g.4.- Frecuencias de reacción de los diferentes fagos	108
4.1.2.- <u>AÑO 1990:</u>	110
a) Procedencia e identificación de los aislados	110
b) Valoración de la muestra estudiada..	112
b.1.- Origen de los aislados	112
b.2.- Distribución en los distintos servicios del hospital.....	115
c) Fagotipia al 1000 RTD tras el tratamiento térmico:	116
c.1.- Proporción de tipabilidad....	116
c.2.- Patrones de fagotipia	117
c.3.- Frecuencias de patrones de fagotipia	118
c.4.- Frecuencias de reacción de los diferentes fagos	118
4.1.3.- <u>COMPARACIÓN DE LOS DOS ESTUDIOS</u> <u>MULTICÉNTRICOS</u>	120
4.2.- ESTUDIOS SOBRE CEPAS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS EPIDEMIOLOGICAMENTE RELACIONADAS	121
4.2.1.- Procedencia e identificación de los aislados	121
4.2.2.- Origen de los aislados	122
4.2.3.- Significado clínico de la muestra ...	122
4.2.4.- Fagotipia al 1000 RTD tras el tratamiento térmico:	123
a) Proporción de tipabilidad	123
b) Patrones de fagotipia	124
c) Frecuencias de patrones de fagotipia	125
d) Frecuencias de reacción de los	

diferentes fagos	125
4.2.5.- Fagotipia inversa:	127
a) Proporción de tipabilidad	127
b) Patrones de fagotipia inversa	128
4.2.6.- Análisis plasmídico:	129
a) Frecuencia de aparición	129
b) Tipos de plásmidos hallados	129
c) Variedad en los perfiles plasmídicos	130
d) Frecuencia de los patrones	
plasmídicos	133
4.2.7.- Antibiogramas: sensibilidad a los	
distintos antibióticos probados	135
4.2.8.- Estudio del factor de virulencia	
"Slime"	138
4.2.9.- Estudio comparativo de los diferentes	
marcadores epidemiológicos utilizados..	139
5.- DISCUSIÓN	157
5.1.- ESTUDIOS MULTICÉNTRICOS	158
5.1.1.- <u>AÑO 1986</u>	158
a) Fagotipia de <i>S. epidermidis</i>	158
a.1.- Juego de fagos de	
"Dean and Williams"	158
a.2.- Juego de fagos autóctono	159
a.3.- Juego de fagos combinado	160
b) Técnicas de fagotipia.....	160
c) Patrones de fagotipia.....	161
d) Potencia de los fagos	
(frecuencia de reacción).....	162
5.1.2.- <u>AÑO 1990</u>	162
a) Patrones de fagotipia	163
b) Potencia de los fagos	164

5.1.3.- <u>COMPARACIÓN DE AMBOS ESTUDIOS</u> <u>MULTICÉNTRICOS</u>	164
5.2.- ESTUDIO SOBRE CEPAS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS EPIDEMIOLOGICAMENTE RELACIONADAS.....	165
a) Fagotipia.....	165
b) Fagotipia inversa.....	166
c) Análisis plasmídico.....	167
d) Antibiogramas: sensibilidad a los distintos antibióticos probados	169
e) Estudio del factor de virulencia "slime"..	171
f) Estudio comparativo de los diferentes marcadores epidemiológicos utilizados:	173
f.1.- Proporción de tipabilidad y resistencia a antibióticos.....	173
f.2.- Producción de "slime" y acción antimicrobiana.....	174
6.- <u>CONCLUSIONES</u>	176
7.- <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	181

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1.- Frecuencia de infecciones	7
2.- Distribución de los aislados de estafilococos coagulasa negativos, según el tipo de muestra (E.M. 1986).....	94
3.- Distribución de los aislados de estafilococos coagulasa negativos por servicios médicos (E.M. 1986).....	96
4.- Proporción de tipabilidad con los tres juegos de fagos (E.M. 1986).....	102
5.- Placas de fagotipia.....	106
6.- Frecuencias de reacción de los diferentes fagos (E.M. 1986).....	109
7.- Distribución de los aislados de estafilococos coagulasa negativos según el tipo de muestra (E.M. 1990).....	113
8.- Distribución de los estafilococos coagulasa negativos por servicios médicos (E.M. 1990).....	115
9.- Frecuencias de reacción de los diferentes fagos (E.M. 1990).....	119
10.- Frecuencia de reacción de los diferentes fagos (cepas epidemiológicamente relacionadas).....	126
11.- Proporción de tipabilidad de las dos fagotipias.	127
12.- Patrones plasmídicos.....	131
13.- Frecuencia de los patrones plasmídicos.....	133
14.- Perfil plasmídico del paciente 18.....	152

ÍNDICE DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
1.- Proporción de infecciones por servicios.....	9
2.- Patógenos más frecuentemente aislados y su distribución por infecciones.....	11
3.- Patógenos más frecuentes y su distribución por servicios.....	12
4.- División actual del género <i>Staphylococcus</i>	31
5.- Sistemas comerciales de identificación rápida.....	42
6.- Espectro lítico de los doce fagos autóctonos.....	66
7.- Fagotipo de las cepas control (juego autóctono)....	69
8.- Fagotipo de las cepas control (juego "Dean & Williams").....	71
9.- Antibióticos y rango de concentraciones.....	76
10.- Tabla estándar de C.M.I.....	77
11.- Procedencia de los aislados (E.M. 1986).....	92
12.- Número de especies de estafilococos coagulasa negativos identificadas (E.M. 1986).....	93
13.- Origen de las especies de estafilococos coagulasa negativos (E.M. 1986).....	95
14.- Cepas bacterianas lisogénicas, cepas propagadoras y fagos de <i>s. epidermidis</i>	98
15.- Espectro lítico del juego de fagos autóctono	99
16.- Espectro lítico del juego de fagos de "Dean & Williams".....	100
17.- Frecuencias de patrones fágicos entre las 168 cepas de <i>s. epidermidis</i> (E.M. 1986).....	103
18.- Frecuencias de patrones de fagotipia con los tres juegos de fagos (E.M. 1986).....	107
19.- Procedencia de los aislados (E.M. 1986).....	111
20.- Especies de estafilococos coagulasa negativos identificadas.....	112

21.- Origen de las especies de estafilococos coagulasa negativos (E.M. 1990).....	114
22.- Proporción de cepas tipificadas por especies (E.M. 1990).....	116
23.- Patrones de fagotipia (E.M. 1990).....	117
24.- Frecuencias de patrones de fagotipia (E.M. 1990)...	118
25.- Resultados de ambos EE.MM.....	120
26.- Especies de estafilococos coagulasa negativos identificadas (cepas epidemiológicamente relacionadas).....	121
27.- Origen de las especies de estafilococos coagulasa negativos.....	122
28.- Proporción de cepas tipificadas por especies (cepas epidemiológicamente relacionadas).....	123
29.- Patrones de fagotipia (cepas epidemiológicamente relacionadas).....	124
30.- Frecuencias de patrones de fagotipia (cepas epidemiológicamente relacionadas).....	125
31.- Patrones de fagotipia inversa.....	128
32.- Frecuencia de aparición de plásmidos	129
33.- Proporción de plásmidos según su tamaño	130
34.- Frecuencia de patrones según su categoría	134
35.- Sensibilidad antimicrobiana de los estafilococos coagulasa negativos.....	135
36.- Frecuencia y patrones de antibióticos.....	137
37.- Frecuencia de cepas productoras de "slime".....	138
38.- Aislados caracterizados por fagotipia directa.....	140
39.- Aislados caracterizados por fagotipia inversa	145
40.- Aislados caracterizados por el perfil plasmídico...	146
41.- Aislados caracterizados por el antibiograma y por el "slime".....	147
42.- Aislados caracterizados por biotipia	148
43.- Caracterización por todos los marcadores	150
44.- Proporción de las 202 cepas tipificadas por los distintos marcadores utilizados.....	154

45.- Proporción de las 202 cepas tipificadas al utilizar de forma consecutiva y escalonada los cinco marcadores epidemiológicos.....	154
46.- Proporción de aislados en los que se han podido establecer diferencias y similitudes	155
47.- Número de cepas iguales y diferentes por los marcadores epidemiológicos utilizados.....	156
48.- Proporción de tipabilidad y resistencia a antibióticos	174

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- INFECCIONES HOSPITALARIAS

Las infecciones hospitalarias o nosocomiales son aquellas que se desarrollan en pacientes hospitalizados que no las padecían ni presumiblemente las estaban incubando en el momento de admisión. Determinar si una infección es intrahospitalaria o adquirida en la comunidad es más difícil en la práctica que en la teoría, debido a los distintos periodos de incubación de las diferentes infecciones.

Los problemas originados por las infecciones nosocomiales repercuten, como es lógico, directamente en los pacientes, pero también en la comunidad y en el Estado. La situación actual de la morbilidad y de la mortalidad por infecciones hospitalarias está generando grandes costes en cuidados hospitalarios y provoca la aparición de nuevos riesgos para la salud pública. Por otro lado, el uso de antimicrobianos de reciente introducción y los avances tecnológicos en los campos biomédico y quirúrgico hacen que el número de pacientes susceptibles de infección sea mayor. Además, los microorganismos adquieren nuevas resistencias a los antibióticos e incluso son capaces de transferirlas de un organismo a otro (Parker, 1978).

El programa de infecciones hospitalarias de "Centers for Disease Control" (CDC) (Garner y cols., 1988) estableció varios criterios para determinar cuándo una infección puede considerarse nosocomial:

- No debe haber evidencia de que la infección estaba presente o incubándose en el momento de admisión en el hospital.
- Cuando la infección es adquirida en el hospital y llega a ser evidente con posterioridad al alta.
- Cuando la infección es adquirida por un recién nacido (se excluyen las que han sido adquiridas transplacentariamente: herpes simplex, toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus y sífilis).

- Cuando aparece un nuevo microorganismo en el lugar previo a la infección.

1.1.1.- HISTORIA

La historia de las infecciones nosocomiales está estrechamente vinculada a la historia misma de las instituciones hospitalarias. De hecho, los hospitales favorecieron, en sus comienzos, la propagación de epidemias como la viruela, la peste y las fiebres tifoideas.

Antes de la teoría del germen, la putrefacción y las enfermedades contagiosas eran generalmente aceptadas como inevitables dentro de los hospitales. Los mecanismos y epidemiología eran desconocidos. Aparte del aislamiento de los pacientes, ningún medio de ruptura de la cadena de contagio fue establecido antes de la mitad del siglo XIX, cuando los conocimientos acerca de las causas y posibles métodos de control sufrieron un gran avance. Así, Holmes, en su histórico trabajo publicado en 1843, advirtió que los propios médicos podían tener un protagonismo en la aparición y expansión de fiebre puerperal, una de las infecciones más frecuentes por aquella época.

Cinco años más tarde, un médico húngaro, Semmelweis, publicó el primer trabajo experimental sobre las causas de la fiebre puerperal, demostrando una reducción en la mortalidad al introducir soluciones de cloruro cálcico para el lavado de las manos. Desgraciadamente este hallazgo no fue utilizado por los médicos de la época.

Varias décadas después, Louis Pasteur sentó las bases de la Bacteriología, al demostrar la clara asociación de los microorganismos con las enfermedades infecciosas, y Lister en 1867, basándose en los trabajos de Pasteur, demostró la eficacia de la utilización del ácido carbólico (fenol) como antiséptico para la prevención de las infecciones en las prácticas quirúrgicas.

Actualmente el lavado de manos y la aplicación de antisépticos en cirugía son ampliamente utilizados para controlar la transmisión de las enfermedades infecciosas. En un principio, esto supuso un enorme descenso en el número de infecciones que se contraían en los hospitales. Así se redujeron drásticamente enfermedades de importancia histórica, como la sepsis puerperal debida a *Streptococcus pyogenes* y las infecciones quirúrgicas producidas por *Staphylococcus aureus* (Young y Musher, 1978).

Sin embargo, el control de las infecciones nosocomiales no ha sido tan efectivo como se esperaba al aplicar métodos antisépticos y agentes antimicrobianos. Nuevos factores han ayudado al mantenimiento de dichas infecciones. En primer lugar, la aparición de nuevas resistencias a los antibióticos en las bacterias y la capacidad de transmitirlos a otros microorganismos, ya sean de la misma o de otra especie (Noble, 1983). En segundo lugar, la utilización de inmunosupresores y esteroides, que provocan la aparición de enfermos muy susceptibles a cualquier microorganismo, incluso a los de su propia flora microbiana (Fuchs, 1979). Finalmente, la ruptura de las barreras naturales del ser humano debido a las nuevas técnicas quirúrgicas (implantación de válvulas cardíacas, cateterización intravascular...), que eleva la proporción de infecciones nosocomiales al aumentar el número de localizaciones con riesgo de infección (Young y Musher, 1978 ; Wenzel, y cols., 1981).

1.1.2.- EPIDEMIOLOGÍA

La epidemiología es el estudio dinámico de los determinantes, incidencia y distribución de la salud y las enfermedades en una población, que -para infecciones nosocomiales- es la población hospitalaria (Brachman, 1979).

a) Distribución general

Son pocos los estudios que se han hecho acerca de la frecuencia de aparición de las infecciones nosocomiales. En Estados Unidos (Horan y cols., 1986), en un estudio recogido por el "National Nosocomial Infections Study" (NNIS), se ha observado una tasa de infección nosocomial de 33.5 por cada 1.000 pacientes dados de alta. En el Reino Unido se realizó un estudio durante 1979-1980 con datos de 18.186 pacientes repartidos en 43 hospitales de Inglaterra y Gales (Meers y cols., 1981). Se encontró un índice de prevalencia del 9.2%. En Dinamarca (Jepsen y Mortensen, 1980), la prevalencia de infección nosocomial se sitúa en un 10.4% y en Italia (Moro y cols., 1986), en un 6.8%. En Bélgica (W.E.R., 1985), en una muestra de 8.723 pacientes repartidos en 106 hospitales, se encontró que un 10.3% de los enfermos habían desarrollado una o más infecciones hospitalarias, siendo el índice de prevalencia de dichas infecciones de 11.2 por cada 100 ingresos, debido a que algunos enfermos desarrollaban más de una infección. En este mismo estudio se describe un aumento de las tasas de infección al aumentar el tamaño del hospital. Por último, la Organización Mundial de la Salud ha llevado a cabo un estudio internacional entre 1983 y 1985 en el que participaban 47 hospitales de 14 países (entre ellos España) repartidos en cuatro continentes. Sobre un total de 28.861 pacientes, 2.502 padecieron una infección hospitalaria, lo que suponía una tasa de prevalencia del 8.7% (Mayon-White y cols., 1988).

En España se ha realizado una encuesta epidemiológica de prevalencia en un punto de la infección hospitalaria en todas las Comunidades Autónomas, excepto Andalucía y Cataluña, durante enero de 1986. En dicho estudio se observa un índice de prevalencia de infección nosocomial del 11.2% sobre 10.582 casos estudiados (datos inéditos).

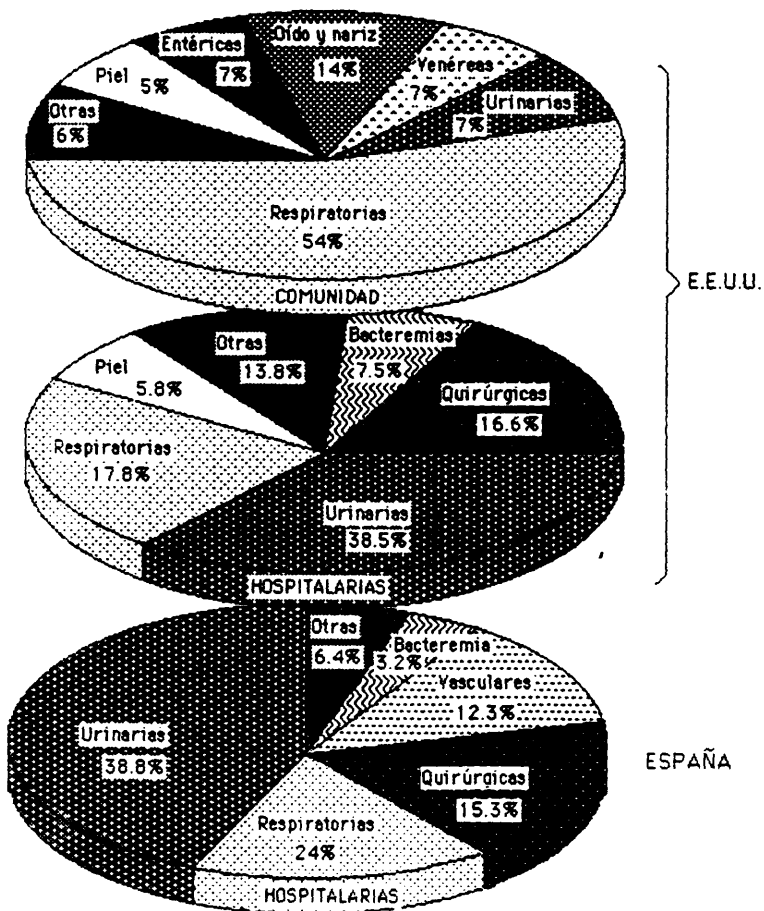
El nivel de riesgo de adquisición de una infección está determinado por varios factores:

- Tamaño del hospital: hay un aumento de los índices de infección al aumentar el tamaño del hospital (Hughes y cols., 1983)
- Gravedad de la enfermedad base del paciente
- Frecuencia de utilización de métodos terapéuticos agresivos en el hospital (Hughes y cols., 1983)
- Otros factores, como la edad, sexo, tratamiento con inmunosupresores, etc.. (Haley y cols., 1981; Centers for Disease Control, 1977).

Los tipos más frecuentes de infección nosocomial son, por orden de importancia, infecciones urinarias (38.5%), quirúrgicas (16.1%), del tracto respiratorio (17.8%), bacteremias (7.5%) y cutáneas (5.8%) (otras 13.8%). Estas infecciones hospitalarias, debido a los factores que las determinan, tienen una frecuencia de aparición diferente a aquellas que son adquiridas en la comunidad (Horan y cols., 1986).

En España se ha realizado un estudio sobre la incidencia de la infección nosocomial en el hospital Clínico y Provincial de Barcelona (Prat y cols., 1988) Las proporciones correspondientes a los distintos tipos de infección nosocomial son las siguientes: 38.81% de infecciones urinarias, 23.97% de respiratorias, 15.29% quirúrgicas, 12.32% vasculares, 3.19% de bacteremias y 6.39% de otras infecciones (Figura 1).

Figura 1.- Frecuencia de infecciones.



En un estudio del CDC realizado en 1986 sobre la prevalencia de las infecciones nosocomiales en tres tipos de hospitales (hospital no universitario y universitario pequeño y grande), se ha demostrado la existencia de una relación entre los tipos de infección y su localización por servicios. Así, las infecciones del tracto urinario aparecen principalmente en servicios de cirugía, medicina interna y ginecología, mientras que son menos frecuentes en servicios de neonatología y pediatría. Las infecciones quirúrgicas tienen un alto porcentaje de aparición en servicios quirúrgicos, de ginecología y obstétricos. Las infecciones del tracto respiratorio aparecen predominantemente en servicios de medicina interna y cirugía, pero son poco frecuentes en los servicios de obstetricia y neonatos. La bacteremia primaria se encuentra en mayor proporción en servicios de medicina interna y cirugía, y es relativamente infrecuente en los servicios obstétricos. Las infecciones cutáneas son comunes en los servicios de neonatos (Haley, 1986; Horan y cols., 1986). Ver tabla 1.

TABLA 1.- Proporción de infecciones por servicios (casos/1.000 altas) (Horan y cols., 1986).

INFECCIONES

SERVICIO	T.U.	Q.	R.	BAC.	CUT.	Otras	TODAS
Hospitales no universitarios							
Cirugía	12.1	8.5	5.4	1.3	1.4	2.0	30.8
Medicina int.	12.6	0.4	5.2	1.9	0.8	2.3	23.3
Ginecología	5.8	1.6	0.1	0.1	0.1	0.8	8.6
Obstetricia	1.1	2.4	0.1	0.1	0.5	1.4	5.6
Pediatría	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.9	1.2
Neonatología	0.5	0.2	1.8	0.6	2.6	2.9	8.6
TOTAL	9.9	3.6	4.2	1.3	1.1	2.0	22.2
Pequeños hospitales universitarios (500 camas o menos)							
Cirugía	17.7	13.6	7.8	1.8	1.6	4.7	47.3
Medicina int.	20.1	0.6	7.5	2.8	1.7	15.3	38.1
Ginecología	19.9	11.1	1.3	0.4	0.2	2.2	35.2
Obstetricia	3.8	6.8	0.3	0.2	0.5	3.4	14.9
Pediatría	2.0	0.6	2.0	2.4	2.3	5.2	14.6
Neonatología	0.6	0.2	1.4	2.0	4.8	5.6	14.7
TOTAL	13.9	6.0	6.4	1.9	1.8	4.7	33.8
Grandes hospitales universitarios (más de 500 camas)							
Cirugía	19.5	15.0	11.2	4.2	3.3	6.1	59.3
Medicina int.	19.5	1.2	10.2	5.7	3.0	7.3	46.9
Ginecología	14.4	10.2	2.6	0.9	0.6	3.1	31.7
Obstetricia	4.2	6.6	0.5	0.9	0.5	7.5	20.3
Pediatría	2.8	1.6	3.9	2.1	1.2	4.9	16.6
Neonatología	1.0	10.3	2.9	3.6	3.7	5.6	17.4
TOTAL	14.2	6.6	7.7	3.9	2.6	6.4	41.4

Abreviaturas de infecciones:

T.U.: Tracto urinario. Q.: Quirúrgicas. R.: Respiratorias.
BACT.: Bacteremia. CUT.: Cutáneas.

En España, según el estudio realizado por Prat y sus colaboradores (1988) en un hospital universitario dotado de 986 camas, se han observado diferentes tasas de infección nosocomial para cada servicio, aunque no se especifica el tipo de infección. Así, vemos que cuidados intensivos es el servicio con mayor tasa de infección nosocomial (25.6%) seguido de cirugía (18.25%), obstetricia y ginecología (12.06%), medicina interna (11.81%), pediatría (9.64%) y otras especialidades (8.97%).

En general, los microorganismos que producen un mayor número de infecciones nosocomiales son *Escherichia coli* (17.8%), *Pseudomonas aeruginosa* (11.4%), Enterococos (10.4%) y *Staphylococcus aureus* (10.3%), seguidos de *Klebsiella* (7.4%) y de los estafilococos coagulasa negativos (6.3%) (Horan y cols., 1986).

En el caso de infecciones urinarias, según datos del NNIS sobre 39.802 aislados (enero 1985 - agosto 1988), *E. coli* ocupa el primer lugar (26.7%), seguido de Enterococos (15.7%), *P. aeruginosa* (12.2%) y *Candida albicans* (6.3%) (Horan y cols., 1988).

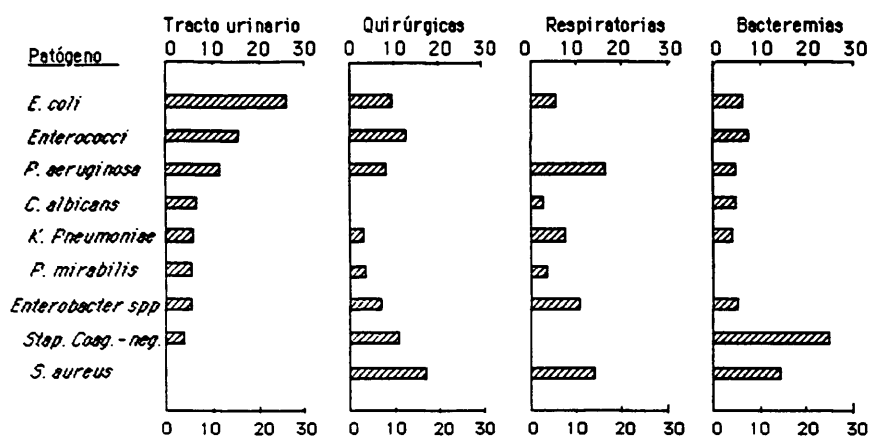
En las infecciones quirúrgicas, los estafilococos, tanto *S. aureus* como los estafilococos coagulasa negativos, tienen una notable incidencia. *S. aureus* destaca sobre los demás (17.3%), seguido de Enterococos (13.3%); a continuación encontramos los estafilococos coagulasa negativos (11.6%) (Horan y cols., 1988).

En el tracto respiratorio, los microorganismos más frecuentemente aislados son *Pseudomonas aeruginosa* (17.2%), *S. aureus* (14.2%), Enterobacter (10.4%) y *Klebsiella pneumoniae* (7.4%) (Horan y cols., 1986).

En el caso de las bacteremias, son los estafilococos coagulasa negativos los más importantes (25.5%), seguidos de *S. aureus* (15.0%), de tal forma que el conjunto de los estafilococos son los responsables del 40% de este tipo de infecciones (Horan y cols., 1988). Tabla 2.



TABLA 2.- Patógenos más frecuentemente aislados y su distribución por infecciones (Horan y cols., 1988).



Por otra parte, se ha encontrado una relación entre la frecuencia de aparición de los distintos microorganismos y su localización por servicios (Horan y cols., 1986). *E. coli* es el patógeno más frecuente en todos los servicios, excepto en pediatría y neonatos, en los que *S. aureus* es el más común. *Pseudomonas aeruginosa* se identificó como el segundo patógeno más frecuente en los servicios de medicina interna y cirugía, mientras que Enterococo apareció el segundo en ginecología y obstetricia. Los estafilococos coagulasa negativos fueron los segundos en servicios de recién nacidos y pediatría. Tabla 3.

TABLA 3.- Patógenos más frecuentes y su distribución por servicios (Horan y cols., 1986).

Patógeno	SERVICIO						Total	
	MED.	CIR.	OBS.	GIN.	PED.	NEO.	aislados	%
<i>E. coli</i>	19.6	16.2	21.2	29.8	11.4	9.3	5.266	17.8
<i>P. aeruginosa</i>	1.4	13.0	1.3	4.3	9.7	6.7	3.366	11.4
Enterococci	9.6	10.5	16.6	18.1	5.3	5.7	3.063	10.4
<i>S. aureus</i>	9.2	10.4	8.0	5.8	16.6	24.8	3.059	10.3
<i>Klebsiella spp.</i>	9.0	6.9	2.1	4.8	6.6	6.7	2.193	7.4
<i>Staphyl. coag. neg.</i>	5.6	6.1	5.7	5.2	13.2	15.3	1.868	6.3
<i>Enterobacter spp.</i>	4.7	7.5	2.1	3.7	4.2	3.7	1.748	5.9
<i>Candida spp.</i>	7.0	4.9	1.1	2.2	7.6	3.8	1.620	5.5
<i>Proteus spp.</i>	5.6	5.4	3.4	5.3	0.3	1.0	1.522	5.1
<i>Serratia spp.</i>	2.1	2.9	0.2	0.3	1.4	1.3	691	2.3
Hongos	2.3	1.5	0.1	0.1	1.2	1.0	496	1.7
<i>Citrobacter spp.</i>	1.5	1.5	1.1	0.8	1.0	0.8	414	1.4
<i>Bacteroides spp.</i>	0.6	1.4	4.6	2.8	0.3	0.2	355	1.2
Grupo B								
<i>Streptococcus spp.</i>	0.8	0.5	7.9	3.8	1.2	6.2	348	1.2
Otros anaerobios	0.9	0.9	4.8	2.0	0.3	0.2	300	1.0
Resto*	10.1	10.4	19.8	11.0	19.7	13.3	3.253	11.1
Número de aislados	11.304	14.596	1.024	1.016	590	1.032	29.562	100.0

* No se incluye ningún patógeno que supere el 3% de los aislados.

Abreviaturas de servicios:

MED.: Medicina interna. CIR.: Cirugía. OBS.: Obstetricia.

GIN.: Ginecología. PED.: Pediatría. NEO.: Neonatología.

b) Costes

Las infecciones nosocomiales deben ser prevenidas y controladas no sólo por los perjuicios que ocasionan al paciente, sino también por los costes adicionales que suponen para el Estado. Éstos pueden ser de dos tipos: directos e indirectos. Los primeros son los costes específicos que se ocasionan en el tratamiento de una enfermedad (medicinas y otros tratamientos, honorarios de los médicos y personal). Los gastos indirectos incluyen los descensos de productividad, el tiempo perdido por absentismo laboral, etc. (Dixon, 1987).

En algunos países se han hecho estudios aproximativos de los costes adicionales que suponen las infecciones nosocomiales. En Estados Unidos se calcularon en casi cuatro billones de dólares para 1985 (Haley y cols., 1985a) y en el Reino Unido (Editorial, 1981), en 30 millones de libras para el año 1980.

c) Fuentes de infección y reservorios

La fuente de infección es el lugar desde donde el agente infeccioso pasa directa o indirectamente al huésped. Tales fuentes pueden ser endógenas (autoinfección) y exógenas. En el primer caso, la flora del propio paciente produce la infección; en el segundo, son factores externos los que la ocasionan (otros pacientes, visitas, médicos, empleados del hospital y objetos inanimados, como soluciones intravenosas, comida, nebulizadores).

El reservorio es el lugar donde los gérmenes realizan sus funciones metabólicas. El reservorio de las bacterias Gram positivas suele ser humano, mientras que en las Gram negativas el reservorio puede ser humano, animal o inanimado. Puede ocurrir que el reservorio y la fuente de infección coincidan, si bien también es posible que el primero contamine a la segunda.

d) Transmisión

La transmisión del agente infeccioso desde la fuente o foco de infección hasta el huésped puede ocurrir por cuatro vías diferentes: por contacto (directo o indirecto), a través del aire, por un vehículo común a múltiples casos de infección (comida, agua) y por medio de vectores. Esta última vía es mucho más significativa en zonas tropicales (malaria, fiebre amarilla...) (Favero, 1978).

e) Prevención y control

Las medidas para la prevención y control de las infecciones nosocomiales deben ser eficaces y para ello, antes de ser puestas en práctica en los hospitales, deben ser evaluadas. La mayoría de estas medidas están basadas en la utilización de antisépticos y de instrumentos debidamente esterilizados; se encuentran ampliamente descritas en el conjunto de guías para la "prevención y el control de las infecciones nosocomiales" del CDC (Williams, 1983; Garner y Favero, 1986). En estas guías se resalta la importancia del lavado de manos después de haber entrado en contacto con un paciente y del aislamiento de dichos pacientes para romper así la cadena de contagio.

Actualmente en algunos hospitales se practican medidas cuya ineficacia ha quedado demostrada como la instalación de filtros en los respiraderos y nebulizadores (Eickoff, 1981) y el control del ambiente por muestreo microbiológico (Mc Gowan, 1981). Tales medidas deben ser abandonadas y sustituidas por aquellas cuya eficacia ha sido comprobada.

f) Vigilancia

La vigilancia, cuando se aplica a enfermedades, puede ser definida como la observación sistemática, activa y continua de la frecuencia y distribución de las enfermedades dentro de una

población, y de los sucesos o condiciones que hacen aumentar o disminuir el riesgo de contraer tales infecciones (Haley y cols., 1986).

El objetivo de dicha vigilancia es reducir el riesgo de adquisición de las infecciones nosocomiales entre los pacientes hospitalizados. La vigilancia puede proporcionarnos datos epidemiológicamente interesantes, como la identificación de epidemias, actividades prioritarias para el control de dichas infecciones, elucidación de tendencias (en los patógenos microbianos, proporción de infección) y, por último, nos permite obtener grandes beneficios en el control de la infección (Thompson, 1987).

La vigilancia de las infecciones adquiridas en los hospitales debería ser un proceso continuo que comprendiera los siguientes elementos:

- Definición de categorías de infección.
- Recogida sistemática de los datos.
- Tabulación de los datos.
- Análisis e interpretación de los datos.
- Informe de los datos más relevantes de la vigilancia de la infección, tanto en individuos como en grupos (Thompson, 1987).

Los recientes análisis sobre la efectividad de la vigilancia en los hospitales elaborados por el proyecto SENIC (Study on the Efficacy of Nosocomial Infection Control) indican que los programas son efectivos cuando hay una persona encargada de la vigilancia, cuando se emplean técnicas epidemiológicas para analizar la proporción de infección y se usan periódicamente los datos para tomar decisiones (Haley y cols., 1985b).

La vigilancia puede efectuarse en todo el hospital - con lo que se detectarían todas las infecciones, pero a un coste muy elevado - o bien observando las zonas de alto riesgo. Esto último puede aportar datos interesantes y es económicamente más rentable.

1.1.3.- MICROBIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES HOSPITALARIAS

Para diagnosticar que una infección ha sido adquirida en el hospital, son necesarios los datos microbiológicos que aporta el laboratorio de cada centro hospitalario. En los hospitales activos con programas de vigilancia y control de las infecciones nosocomiales se ha llegado a encontrar más de un 80% de dichas infecciones. Sin embargo, en los hospitales que carecen de dichos programas de vigilancia, el laboratorio de microbiología cumple una función muy importante en el estudio de las tendencias y evolución de las infecciones hospitalarias. Los registros del laboratorio pueden proporcionar datos de alerta acerca de la emergencia de patógenos muy infecciosos y resistentes a múltiples antibióticos, así como de aparición de infecciones poco usuales (McGowan y cols., 1986).

El estudio microbiológico de las infecciones nosocomiales se hace en:

- el laboratorio del hospital, en donde se aísla e identifica el agente causal de la infección; también se realizan antibiogramas necesarios para un tratamiento correcto (Weinstein y Mallison, 1978).

- el laboratorio de referencia, en donde, una vez comprobada la identificación de los aislados, se hace un estudio epidemiológico mediante la aplicación de marcadores o sistemas de tipificación (Meitert y Meitert, 1978; Ayliffe, 1978).

a) Aislamiento e identificación

El laboratorio del hospital debe tratar de conseguir una identificación correcta de los aislados en el tiempo más corto que le sea posible para asegurar el apropiado tratamiento del paciente y la aplicación de las adecuadas medidas de control.

Actualmente se han desarrollado unas técnicas de diagnóstico rápido (ELISA, electroforesis, inmunofluorescencia, ...) que permiten la identificación del agente causal en un corto periodo

de tiempo. No por ello los métodos tradicionales de aislamiento e identificación deben abandonarse, puesto que a veces son necesarios para estudios epidemiológicos posteriores (Bartlett y cols., 1979).

b) Métodos de tipificación por medio de marcadores epidemiológicos

Actualmente los epidemiólogos están utilizando unas técnicas en el laboratorio que permiten establecer relaciones biológicas y genéticas entre organismos cercanos, normalmente de una misma especie. Estas técnicas están basadas en caracteres sencillos del microorganismo al que denominamos "marcador". Realmente, estos métodos nos discriminan la "no relación" epidemiológica entre las cepas, más que su "relación", ya que ninguno, por sí solo, tiene una fiabilidad del cien por cien.

Un buen método de tipificación deberá cumplir tres propiedades básicas:

1.- Tipabilidad: que sea capaz de reconocer la mayoría de los aislados; si reconoce o tipifica pocos aislados, puede decirse que el método no es útil.

2.- Discriminación: que un alto porcentaje de los microorganismos sean clasificados en distintos tipos o patrones. El método carece de utilidad, cuando, aun reconociendo casi todos los microorganismos, todos pertenecen al mismo tipo o patrón.

3.- Reproductibilidad: los resultados obtenidos en distintos momentos y lugares deben ser similares o presentar pocas variaciones; es decir, el método tiene que ser estable a lo largo del tiempo.

Otras características que deberían tenerse en cuenta para un buen método de tipificación son que esté estandarizado y que sea sensible para distinguir la mayoría de los microorganismos biológica y genéticamente similares, pero no idénticos (Aber y Mackel, 1981).

Los métodos de tipificación deben ser aplicados en los estudios de brotes infecciosos para determinar la fuente de infección, reservorios y su amplitud, así como en los programas de vigilancia en zonas concretas para controlar la aparición de brotes infecciosos.

En el laboratorio de microbiología del hospital se puede iniciar un somero estudio epidemiológico utilizando métodos de tipificación sencillos, como pruebas bioquímicas de identificación (biotipia), de sensibilidad a antimicrobianos (antibiotipia) e incluso serológicas (serotipia). Cuando aparecen aislados epidemiológicamente importantes, se requiere una tipificación especial y por ello es necesario enviarlos a los laboratorios de microbiología de referencia, en donde se ponen en práctica métodos más precisos, tales como sensibilidad a fagos (fagotipia), producción de bacteriocinas (bacteriocinotipia), resistencia a productos químicos (resistotipia), análisis del DNA plasmídico (plasmidotipia), análisis del DNA plasmídico o cromosómico utilizando endonucleasas de restricción, electroforesis de proteínas y de isoenzimas, pruebas de hibridación de ácidos nucleicos homólogos, etc.

A continuación describimos brevemente los principales métodos de tipificación.

- **Biotipia:** diferenciación de los aislados a nivel de especie utilizando pruebas bioquímicas. Se aplica a gran cantidad de bacterias como *Serratia marcescens* (Pitt, 1982), *Staphylococcus aureus* (Goldmann, 1980) y estafilococos coagulasa negativos (Christensen y cols., 1983).

- **Fagotipia:** la susceptibilidad a la infección por los bacteriófagos es una característica muy usada para tipificar un gran número de microorganismos tanto Gram positivos -*S. aureus* (Smith, 1972) y estafilococos coagulasa negativos (Heczko y cols., 1977) -, como Gram negativos - *Pseudomonas aeruginosa* (Lindberg y Latta, 1974), *Serratia marcescens* (Pitt, 1982), *Escherichia coli*

(Marsik y Parisi, 1971), *Salmonella* (Gershman, 1977; Katsatiya y cols., 1978), *Klebsiella* (Rennie y cols., 1978), *Proteus* (Hickman y Farmer, 1976), y *Shigella* (Kallings y cols., 1968).

La fagotipia inversa es una modalidad de la fagotipia directa y consiste en la inducción de los fagos a partir del microorganismo aislado y en el estudio de los patrones de lisis al aplicar dichos fagos inducidos sobre una serie de cepas conocidas (Meitert y Meitert, 1978).

- **Serotipia:** se trata de la caracterización de los aislados mediante antisueros específicos que reaccionan con antígenos del microorganismo también específicos. Éstos pueden ser somáticos (O), flagelares (H), capsulares (K) y de pared o membrana externa. Para algunas especies microbianas, como *Salmonella* o *Shigella*, la serotipia representa una importante herramienta para su identificación (Edwards y Ewing, 1972). Para otras especies microbianas, la serotipia se ha convertido en un método de tipificación epidemiológico usado para diferenciar cepas obtenidas en importantes situaciones epidemiológicas. Se emplea tanto en bacterias Gram positivas - *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos (Cohen, 1972), *Streptococcus* (Hahn y Nyberg, 1976) -, como en Gram negativas - *E. coli* (Crichton y Hold, 1980), *Klebsiella* (Rennie y cols., 1978; Onokodi y Wauters, 1981), *Proteus* (Anderson y Engley, 1978; Penner y Hennessy, 1979), *P. aeruginosa* (Farmer y cols., 1982; Conroy y cols., 1983), *Serratia* (Pitt, 1982).

En organismos como *Streptococcus pneumoniae* (Lund y Henriksen, 1978) y *Klebsiella* (Casewell, 1972), se realiza una variante de la serotipia denominada "quellung" o hinchazón de la cápsula cuya presencia es muy significativa.

- **Bacteriocinotipia:** la producción de algunas sustancias (bacteriocinas) por algunas bacterias capaces de inhibir el crecimiento de otras bacterias o la susceptibilidad del organismo en cuestión a las bacteriocinas producidas por otro microorganismo

puede ser usada como un método de tipificación. La bacteriocinotipia se puede realizar:

- directamente: observando el efecto de las bacteriocinas producidas por unas cepas-patrón sobre los aislados que queremos estudiar;

- indirectamente: induciendo bacteriocinas en las cepas-problema y aplicándolas sobre unas cepas conocidas, para así conseguir patrones de inhibición.

Se trata de un método usado en *E. coli* (Hettiaratchy y cols., 1973), *Klebsiella* (Bauernfeind y cols., 1981), *Proteus* (Senior, 1977; Anderson y cols., 1978), *P. aeruginosa* (Conroy y cols., 1983), *Serratia* (Pitt, 1982) y *Shigella sonnei* (Morris y Wells, 1974).

- **Antibiotipia:** la determinación de los patrones de sensibilidad de los aislados a los agentes antimicrobianos se practica de forma rutinaria en los laboratorios clínicos y se aplica de forma sistemática a todos los microorganismos. Raramente se incluyen nuevos antibióticos para poder diferenciar cepas de importancia epidemiológica, ya que no se dispone normalmente de pruebas adicionales para poder examinar otras características (marcadores) del organismo (Aber y cols., 1981; Goldmann y cols., 1980).

- **Resistotipia:** se trata de diferenciar los aislados implicados en infecciones nosocomiales por su susceptibilidad hacia ciertos compuestos químicos, como los metales pesados (Elek y Higney, 1970). Este método se emplea para estudiar microorganismos Gram positivos, como *S. aureus* (Elek y Maryson, 1974), y Gram negativos, como *E. coli* (Crichton y Old, 1974; Elek y Higney, 1970), *Salmonella* (McHugh y cols., 1975; Somerville y cols., 1983) y *Shigella sonnei* (Elek y cols., 1973).

- **Plasmidotipia:** es una técnica que nos permite la detección, aislamiento y caracterización molecular del DNA

plasmídico de los aislados. La electroforesis en geles de agarosa de este DNA nos proporciona una serie de patrones útiles para diferenciar unos microorganismos de otros. El DNA extracromosómico a menudo puede llevar la información necesaria para:

- * Codificar la resistencia a un determinado antibiótico.
- * Producir una capacidad metabólica inusual.
- * Sobrevivir en condiciones adversas.

Esto ha sido estudiado con el fin de correlacionar dichas propiedades particulares de interés con la presencia de un plásmido determinado en la bacteria (Grinsted y Bennett, 1988). Por otra parte, la plasmidotipia ofrece la posibilidad de establecer relaciones epidemiológicas entre microorganismos cercanos o poco relacionados, ya que los plásmidos pueden ser transferidos entre microorganismos de distinta especie e incluso de distinto género (Datta y cols., 1979).

Este método es utilizado tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas: *Pseudomonas* (Jacoby, 1986; Plesiat y cols., 1988), *Escherichia*, *Shigella*, *Serratia*, *Proteus* (Bukhari y cols., 1977), *Staphylococcus* (Lyon y Skurray, 1987), *Streptococcus* (Colmar y Horaud, 1987)....

Las desventajas de este método son la poca resolución entre plásmidos de tamaño similar y las diferencias en la movilidad de plásmidos abiertos o cerrados (Tenover, 1985). Estos problemas se solucionan con la técnica siguiente.

-Análisis del DNA plasmídico con endonucleasas de restricción. Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen secuencias específicas del DNA (normalmente 4, 5 ó 6 pares de bases) y cortan el enlace fosfodiéster de la molécula. La determinación, en geles de agarosa, de los patrones de fragmentos generados por las endonucleasas de restricción sobre el DNA celular se ha aplicado, como método de tipificación en epidemiología hospitalaria, para investigar brotes de infección nosocomial y para ayudar a un efectivo control de la infección. En *S. aureus* (Pfaller y Hollis, 1989) y estafilococos coagulasa

negativos (Pfaller y Herwaldt, 1988) es donde más se ha aplicado ésta técnica.

- **Electroforesis de proteínas.** Caracterización de los aislados mediante patrones electroforéticos de las proteínas bacterianas separadas por su peso molecular. Hay varias modalidades de electroforesis, según de qué proteínas se trate: electroforesis de proteínas totales, de proteínas periplásmicas y de proteínas de membrana externa. Se ha realizado en *S. aureus* (Cohen y cols., 1983), estafilococos coagulasa negativos (Maggs y Pennington, 1989), *Serratia marcescens* (Rousseaux y cols., 1990) y *Neisseria meningitidis* (Frasch y cols., 1985).

Para el estudio de las bacterias Gram negativas son muy útiles las proteínas de membrana fijadoras de penicilina denominadas PBPs, cuyos patrones electroforéticos sirven para establecer relaciones epidemiológicas entre los diferentes aislados (Jabes y cols., 1989). En *S. aureus* también se ha llevado a cabo el estudio de las PBPs en cepas resistentes a meticilina para su caracterización mediante los patrones electroforéticos obtenidos (Murakami y cols., 1987)

- **Electroforesis de isoenzimas.** Este método, que ha sido muy usado en eucariontes (Ayala, 1976; Levontin, 1974; Kimura, 1983), se ha venido aplicando recientemente a gran número de estudios para valorar la diversidad y estructura genética de poblaciones naturales bacterianas. Se trata de caracterizar los aislados mediante el estudio de la movilidad electroforética de las enzimas celulares, solubles en agua, en un gel de poliacrilamida. Teniendo en cuenta que la movilidad electroforética de las enzimas viene determinada por su carga electrostática y, consecuentemente, por su secuencia de aminoácidos, las isoenzimas (diferentes formas de una misma enzima caracterizadas por una diferencia de carga eléctrica, pero que comparten una misma actividad biológica) pueden ser directamente comparadas con los alelos del gen estructural correspondiente. La

electroforesis de isoenzimas mide la diversidad alélica de genes estructurales (Selander y cols., 1986). Se han practicado pruebas isoenzimáticas en *E. coli* y *Shigella* (Ochman y cols., 1983), *P. aeruginosa* (Levin y cols., 1984), *Serratia* (Gargallo -Viola, 1987, 1989), en *S. hyicus* (Takauchi y cols., 1987) y otros muchos microorganismos.

-**Immunoblotting.** Prácticamente todos los microorganismos son potencialmente tipificados usando esta técnica. Consiste en la obtención de extractos antigénicos de los aislados, electroforesis en gel de poliacrilamida y reacción con un antisuero adecuado. La variedad antigénica entre los diferentes aislados nos permite establecer patrones de bandas antigénicas con pesos moleculares que varían desde 27 a 250 KD, y determinar el grado de similaridad entre ellos. El immunoblotting se ha estudiado en *S. aureus* (Krikler y cols., 1986; Burnie y cols., 1987), *S. epidermidis* (Matthews y cols., 1987; Burnnie y cols., 1988) y estafilococos coagulasa negativos en general (Thomson-Carter y Pennington, 1989).

- **Análisis de DNA.** En la última década los avances en el campo de la biología molecular e inmunología han permitido la creación de unas nuevas técnicas que nos facilitan el diagnóstico rápido de las infecciones nosocomiales.

Las pruebas de DNA aplicadas a la identificación de microorganismos tienen las ventajas de que:

- no se necesita cultivar "in vitro" los microorganismos; de hecho se pueden incluso detectar microorganismos muertos.

- se pueden realizar identificaciones mucho más precisas y

- el diagnóstico, en muchos casos, es más rápido y sensible, puesto que se basa en el contenido del ácido nucleico (Baquero y Martinez, 1989). No obstante, tienen el inconveniente de no contar con el microorganismo aislado, lo que impide la realización de la vigilancia epidemiológica a lo largo del tiempo, el análisis de poblaciones bacterianas mediante marcadores epidemiológicos, así

como la imposibilidad de realizar estudios de sensibilidad a antimicrobianos, por lo que estas pruebas, aunque muy útiles para el diagnóstico rápido, no deben sustituir de forma radical el aislamiento de las cepas productoras de infección.

Dentro de las pruebas del DNA podemos destacar:

1.- Fingerprinting del DNA cromosómico mediante endonucleasas de restricción y electroforesis en geles de agarosa. Los criterios para la selección de las enzimas de restricción son el contenido en bases pirimidínicas: guanina y citosina, grado de metilación y los codones más comunes del DNA bacteriano (Grothues y cols., 1990). El resultado es la obtención de unos patrones electroforéticos cuya utilidad como marcador es limitada, debido a la gran cantidad de bandas de diferentes tamaños que se obtienen, aunque también se han desarrollado métodos computadorizados para hacer más objetivas las comparaciones entre los aislados (Ades y cols., 1988). Renaud y colaboradores (1988) lo aplicaron a los estafilococos coagulasa negativos.

2.- Hibridación de DNA. Con esta técnica se pueden reconocer fragmentos específicos de DNA y, por lo tanto, detectar microorganismos portadores de esos fragmentos. Se trata de un ensayo muy sensible y de gran especificidad. La elaboración de sondas de DNA (fragmento de DNA clonados o bien oligonucleótidos sintéticos) ha permitido la detección de genes específicos, como son:

- factores de virulencia: enterotoxinas de *E. coli* (Hill y cols., 1986) y el antígeno de virulencia (Vi) de *Salmonella typhi* (Boileau y cols., 1984)
- genes de resistencia a antibióticos (Cooksey y Mayer, 1987)
- genes que codifican para el RNA ribosómico (16 y 23S).

Este último método, que se ha denominado ribotipia, ha sido utilizado para distinguir entre especies relacionadas o entre cepas dentro de una misma especie. Se ha usado con algunos microorganismos de importancia en las infecciones nosocomiales; por ejemplo, con *Salmonellas*, *Serratia*, *Pseudomonas* (Grimont y

Grimont, 1986) y estafilococos (Buyser y cols., 1989; Thomson-Carter y cols., 1989; Bialkowska-Hobrzanska y cols., 1990a).

1.2.- EL GÉNERO *STAPHYLOCOCCUS*

1.2.1.- TAXONOMÍA

Han transcurrido más de cien años desde la primera vez que los cocos fueron observados en heridas y en pus procedente de abscesos humanos. Estos organismos, que fueron llamados "micrococci" por Von Recklinghausen (1871), *Microsporon septicum* por Klebs (1872) y "mónadas" por Hueter (1872), fueron clasificados por Billroth (1874) en "monococos", "diplococos", "streptococos" y "gliacocos" de acuerdo con su disposición.

En 1880, Ogston demostró que unos cocos dispuestos en grupos eran la causa de ciertos abscesos en el hombre y los denominó "staphylococcus". Al mismo tiempo, Louis Pasteur llegó a similares conclusiones.

Rosenbach, en 1884, fue el primero que aisló e hizo crecer estafilococos en un cultivo puro en el laboratorio y así estudió sus características. Observó que los aislados formaban dos tipos de colonias, únicamente distinguibles por el color: naranjas y blancas. Propuso el nombre de *Staphylococcus pyogenes aureus* para la primera y *Staphylococcus pyogenes albus* para la segunda.

A finales del siglo XIX, todos los cocos se incluían dentro de la familia Coccaceae. Flügge en 1890 situó los *Staphylococcus* en esta familia, que más tarde fue dividida por Winslow y Rogers (1906) en dos subfamilias: *Metacoccaceae* y *Paracoccaceae*. Winslow y Winslow (1908) clasificaron los estafilococos cuyas colonias eran naranjas dentro del género *Aureococcus* y los de colonias blancas dentro del género *Albococcus*; y ambos géneros, junto a los estreptococos, dentro de la familia *Paracoccaceae*. Los micrococcos, junto con *Sarcina* y *Rhodococcus* fueron situados dentro de la familia *Metacoccaceae*.

En 1911, Buchanam cambió los nombres familiares de *Metacoccaceae* y *Paracoccaceae* por *Micrococceae* Trevisan y *Streptococceae* Trevisan respectivamente.

Más tarde, cuando Winslow y sus colaboradores (1920) volvieron a estudiar los géneros *Aureococcus* y *Albococcus*, concluyeron que no eran distintos y que los albococci eran cepas de *Staphylococcus aureus* que habían perdido alguna característica al crecer en condiciones desfavorables fuera del cuerpo humano.

En una serie de artículos, publicados entre 1924 y 1928, Hucker concluyó que los micrococos y los estafilococos no eran lo suficientemente diferentes para justificar la separación de ambos géneros. Rahn en 1929 llegó a la misma conclusión. Así pues, el *Manual de Bergey*, habiendo reconocido al género *Staphylococcus* en todas sus ediciones, desde la primera hasta la quinta (1939), relegó los estafilococos al género *Micrococcus* cuando Hucker revisó el *Manual* en su sexta edición (1948). En este mismo año, Abd-El-Malek y Gibson llamaron al grupo de estafilococos y micrococos "complejo *Staphylococcus-Micrococcus*", considerando a los estafilococos como patógenos y a los micrococos, inactivos o saprofitos.

No obstante, Evans, Bradford y Niven en 1955, no satisfechos con esta clasificación, propusieron separar estos organismos basándose en la necesidad de oxígeno para su crecimiento. Situaron especies que eran aerobias facultativas en el género *Staphylococcus* y las que eran aerobias estrictas en el género *Micrococcus*. Estos encuentros fueron aceptados por Breed al revisar la clasificación de los miembros de la familia *Micrococcaceae* en la séptima edición del *Manual de Bergey* (1957) y fueron confirmados por Baird-Parker (1963, 1965).

En la séptima edición del *Manual de Bergey* (1957) se reconocían dos especies de estafilococos: *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva y con capacidad de fermentar el manitol) y *Staphylococcus epidermidis* (negativa en ambos tests). El uso de la taxonomía numérica en 1959 indicó que los estafilococos

coagulasa positivos eran un grupo homogéneo, mientras que los estafilococos coagulasa negativos no lo eran (Hill, 1959).

El primero en reconocer tipos específicos dentro del grupo heterogéneo de los estafilococos coagulasa negativos fue Baird-Parker (1963). Él dividió los estafilococos en seis subgrupos, basándose en pruebas fisiológicas y bioquímicas que incluían la reacción de la coagulasa, la actividad fosfatasa, la producción de ácido aeróbica y aneróticamente del manitol, la producción de ácido anaeróticamente de la lactosa y de la maltosa, la producción de acetoina y el crecimiento a 10°C. El subgrupo I contenía la especie de *S. aureus* : coagulasa y fosfatasa positivas que generalmente producían ácido a partir de manitol aeróbica y aneróticamente; los subgrupos II hasta el VI contenían sólo *S. epidermidis*, que se diferenciaba en la producción de fosfatasa y acetoina y en la capacidad de formar ácido aeróticamente a partir de la lactosa, maltosa y manitol. En 1965, Baird-Parker definió los subgrupos II hasta el VI como biotipos desde el 1 al 5 e indicó que la mayoría de los biotipos merecían tener rango de especies.

En 1965, por lo tanto, la capacidad de crecimiento anaeróbico y la fermentación de la glucosa en un medio peptonado con extracto de levadura que contiene un indicador de pH, eran los medios para distinguir los miembros del género *Staphylococcus* de los del género *Micrococcus*. Estos criterios fueron ampliamente criticados por algunos autores como Klesius y Schuhardt (1968), Auletta y Kennedy (1966), Mortensen y Kocur (1967) y Gibson (1967), quienes apuntaban que muchos cocos Gram positivos y catalasa positivos eran capaces de tener un débil crecimiento anaerobio y fermentar lentamente la glucosa. Klesius y Schuhardt apoyan la separación de ambos géneros en la susceptibilidad de los estafilococos a la lisostafina, mientras que los micrococos no son susceptibles a ella. Auletta y Mortensen mostraron que el contenido de guanina y citosina del DNA de los estafilococos es de un 30-39%, mientras que en los micrococos es de un 63-73%, dato de interés para la separación de ambos géneros.

Los microorganismos capaces de crecer anaeróbicamente y de fermentar débilmente la glucosa fueron identificados como *Micrococcus saprophyticus*. Estas cepas tienen la misma proporción de guanina y citosina en el DNA, la misma sensibilidad a la lisis por la lisostafina e idéntica composición y estructura de su peptidoglicano que los estafilococos. No obstante, difieren de otros estafilococos en su gran resistencia a la novobiocina (Mitchell y Baird-Parker, 1967; Jeffries, 1969), en la presencia de diferentes menaquinonas en sus membranas celulares (Jeffries y cols., 1968) y, a menudo, en sus requerimientos nutricionales para el crecimiento (Baird-Parker, 1963).

A pesar de todas las limitaciones, la fermentación de la glucosa, propuesta en 1965 por el subcomité de taxonomía de Staphylococci y Micrococci del ICSB (Comité Internacional de Bacteriología Sistemática), para identificar las especies de *Staphylococcus*, en un medio que contenía azul de bromocresol púrpura como indicador de pH, es el procedimiento más fiable y práctico. No obstante, en el medio de tioglicolato semisólido, propuesto por Evans y Kloos (1972), el crecimiento y fermentación de la glucosa por parte de *Micrococcus saprophyticus* era también algo diferente.

La comisión editora de la octava edición del *Manual de Bergey* (1974) aceptó los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Planococcus* dentro de la familia Micrococcaceae. El género *Aureococcus*, que era reconocido por el subcomité de taxonomía de Staphylococci y Micrococci del ICSB como un miembro de las Micrococcaceae, es reconocido en el último *Manual de Bergey* (1974) dentro de la familia Streptococcaceae. En esta misma edición, se reconocen tres especies de *Staphylococcus*: *S. aureus*, *S. epidermidis*, biotipos 1-4 y *S. saprophyticus*, biotipos 1-4 (basándose en la producción de acetoina, actividad fosfatasa y producción de ácido a partir de la lactosa, maltosa y manitol aeróbicamente). Esto se debió a que *Micrococcus saprophyticus* fue transferido al género *Staphylococcus* como *S. saprophyticus* por su

composición de pared celular y contenido en bases de DNA similares a los estafilococos.

Una vez separados ambos géneros (por su contenido en guanina y citosina en el DNA, la composición de la pared celular, susceptibilidad a la lisostafina, crecimiento en un medio de tioglicolato semisólido y la producción aeróbica de ácido a partir de glicerol), los taxónomos empezaron a diseñar esquemas que permitían dividir cada género. Así, Schleifer y Kloos (1975a) y Kloos y Schleifer (1975a) publicaron varios estudios taxonómicos de las cepas de estafilococos aisladas de piel humana. Basándose en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas y en la composición del peptidoglicano de la pared celular y de los ácidos teicoicos, describieron siete nuevas especies de estafilococos coagulasa negativos: *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis* y *S. simulans*.

Simultáneamente a la descripción de estas nuevas especies, Kloos y Schleifer (1975b) propusieron un esquema simplificado para la identificación rutinaria de los estafilococos aislados del hombre, basado en una selección de diversos caracteres bioquímicos.

Kloos y sus colaboradores (1976b) describieron una especie nueva de estafilococos, *S. sciuri*, que contiene dos subespecies, *sciuri* y *lentus*.

Micrococcus hyicus fue aislado por Sompoljnsky (1953) de exudados de piel en cerdos y fue transferido al género *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, subgrupo II) por Baird-Parker en 1963. Devriese y sus colaboradores (1978) hicieron un estudio taxonómico de las cepas de *S. hyicus* aisladas de piel de cerdos, vacas y aves y subdividieron esa especie en dos subespecies: *hyicus* y *chromogenes*, aunque ésta última fue considerada, algo más tarde, como una nueva especie (Hájek y cols., 1986).

Una nueva especie, *S. intermedius*, que comprende cepas coagulasa positivas aisladas de nariz de palomas, visones, caballos y focas, fue descubierta por Hájek (1976).

Skerman y sus colaboradores (1980) determinaron la existencia de trece especies dentro del género *Staphylococcus*.

El sistema de clasificación propuesto por Kloos y Schleifer (1975b) está basado principalmente en estafilococos de origen humano, pero más tarde se extendió al estudio y clasificación de aislados de origen animal. Así, se han llegado a identificar las siguientes especies: *S. gallinarum* y *S. caprae* (Devriese y cols., 1983), *S. lentus* (Schleifer y cols., 1983), *S. arlettae*, *S. equorum* y *S. Kloosii* (Schleifer y cols., 1984), *S. carnosus* (Schleifer y Fischer, 1982), *S. caseolyticus* (Schleifer y cols., 1982).

Una nueva especie, *S. auricularis*, ha sido aislada del hombre (Kloos y Schleifer, 1983) y el organismo anaeróbico *Peptococcus saccharolyticus* ha sido transferido al género *Staphylococcus* (Kilpper-Bälz y Schleifer, 1981).

Últimamente se han descrito nuevas especies y subespecies de estafilococos. En 1985, De la Fuente y sus colaboradores descubrieron la subespecie *S. aureus* subsp. *anaerobius*. *S. delphini* (Varaldo y cols., 1988) es un estafilococo coagulasa positivo aislado de delfines. *S. lugdunensis* y *S. schleiferi* (Freney y cols., 1988) son coagulasa negativos de origen humano. De ésta última especie se ha descrito la subespecie *coagulans* (Igimi y cols., 1990) aislada de perros con capacidad de coagular el plasma. *S. felis* es otra especie de estafilococos coagulasa negativos aislado de gatos (Igimi y cols., 1989). *S. capitis* subsp. *ureolyticus*, aislada de piel humana ha sido descrita en 1991 por Bannerman y Kloos.

En la actualidad, el género *Staphylococcus* comprende veintiocho especies diferentes, la mayoría de las cuales son coagulasa negativas, mientras que *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini* y algunas cepas de *S. hyicus* son coagulasa positivas.

En la tabla 4 se recoge la evolución de las especies desde 1974 hasta la actualidad.

TABLA 4.- División actual del género *Staphylococcus*.

1974*	1980**	1986+	1991++
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. arlettae</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. auricularis</i>
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. capitis</i>
	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. caprae</i>
	<i>S. hominis</i>	<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. carnosus</i>
	<i>S. hyicus</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. caseolyticus</i>
	<i>S. intermedius</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. chromogenes</i>
	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. cohnii</i>
	<i>S. sciuri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. delphini</i>
	<i>S. simulans</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. epidermidis</i>
	<i>S. warneri</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. equorum</i>
	<i>S. xyloeus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. felis</i>
		<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. gallinarum</i>
		<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
		<i>S. sciuri</i>	<i>S. hominis</i>
		<i>S. simulans</i>	<i>S. hyicus</i>
		<i>S. warneri</i>	<i>S. intermedius</i>
		<i>S. xyloeus</i>	<i>S. kloosi</i>
			<i>S. lentus</i>
			<i>S. lugdunensis</i>
			<i>S. saccharolyticus</i>
			<i>S. saprophyticus</i>
			<i>S. schleiferi</i>
			<i>S. sciuri</i>
			<i>S. simulans</i>
			<i>S. warneri</i>
			<i>S. xyloeus</i>

* "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8ª edición, 1974. ** Skerman y cols., 1980.

+ "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", 1ª edición, 1986.

++ Citas en el texto.

1.2.2.- CARACTERÍSTICAS

a) Morfológicas y estructurales

Son células esféricas de 0.5 a 1.5 μm de diámetro. Aparecen solas o en parejas y característicamente se dividen en más de un plano, formando agrupaciones regulares o irregulares. Son Gram positivas e inmóviles y no forman estados de resistencia o esporas cuando las condiciones son adversas. La pared celular de los estafilococos contiene dos componentes mayoritarios unidos covalentemente: el peptidoglicano y el ácido teicoico. El diaminoácido presente en el peptidoglicano es L-lisina. La membrana citoplásmica contiene ácidos lipoteicoicos.

b) De cultivo

Son aerobios o anaerobios facultativos. Crecen fácilmente en medios ordinarios (utilizan hidratos de carbono y/o aminoácidos como fuente de energía) y bajo condiciones aeróbicas (excepto *S. saccharolyticus* que es anaerobio). La mayoría de las especies necesita una fuente orgánica de nitrógeno (por ejemplo, ciertos aminoácidos) y vitaminas del grupo B (vitamina B1 y ácido nicotínico). La temperatura y pH óptimos de crecimiento son de 37°C y 7.5 respectivamente.

Se ha descrito un cultivo selectivo para los estafilococos que lleva 7.5% de ClNa (medio Chapman), pues toleran altas concentraciones de cloruro sódico, aunque también se utiliza como medio selectivo el de Baird-Parker.

c) Metabólicas

Poseen un metabolismo respiratorio y fermentativo. Usualmente son catalasa positivos. Pueden producir unos pigmentos de naturaleza carotenoide en presencia de oxígeno, dióxido de carbono

y de calcio a una temperatura ligeramente inferior a la óptima de crecimiento. Su papel fisiológico se desconoce actualmente.

Característicamente no producen coagulasa, enzima extracelular que activa la protrombina o alguna sustancia similar que induce la conversión del fibrinógeno a fibrina.

Una gran variedad de carbohidratos puede ser utilizada aeróbicamente con la producción de ácido. Para la mayor parte de las especies, el principal producto de fermentación de la glucosa es el ácido láctico; en presencia de oxígeno, los principales productos son el ácido acético y el dióxido de carbono. La mayoría de las especies poseen fructosa 1,6-difosfatasa y aldolasa de la clase I. Son susceptibles de ser lisadas por la lisostafina y resistentes a la lisis por lisozima. Las especies o cepas que tienen grandes cantidades de L-alanina o L-serina, en vez de glicina en el peptidoglicano de la pared celular, son generalmente menos susceptibles a la lisostafina que aquellas con un puente interpeptídico compuesto únicamente por residuos de glicina.

Algunas especies son resistentes a la novobiocina; mientras que otras son típicamente susceptibles. Generalmente son también sensibles a antibacterianos, como el fenol y sus derivados y a los halógenos. El contenido en guanina y citosina en el DNA varía de 30-39%.

d) Hábitat

Las poblaciones naturales se encuentran principalmente asociadas con la piel, glándulas subcutáneas, membranas mucosas y animales de sangre caliente. En varios estudios (Kloos y cols., 1976a; Kloos, 1980), se ha encontrado que *S. aureus* predomina en fosas nasales, mientras que *S. epidermidis* y *S. hominis* persisten en la piel de ingles, axilas, cabeza, piernas y brazos. *S. capitis* se aísla frecuentemente de cabeza, cara, oído y piernas. *S. auricularis* se aísla de oído externo. *S. xylosum*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus* y *S. warneri* se aíslan sólo ocasionalmente de la piel. El resto de los estafilococos coagulasa

negativos se aíslan predominantemente o exclusivamente de animales o productos animales (carne, leche, queso) o bien de su entorno (suelo, agua..).

1.2.3.- ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS

a) Patogenicidad y virulencia

Los estafilococos coagulasa negativos pueden ser considerados como típicos oportunistas, presentes normalmente en la piel y la mucosa del hombre. Las funciones fisiológicas de los estafilococos coagulasa negativos en estos nichos no se conoce y no se sabe por qué los estafilococos coagulasa negativos llegan a ser virulentos en ciertas circunstancias.

Existe actualmente un acuerdo general sobre la importancia clínica de los estafilococos coagulasa negativos como agentes etiológicos de importantes infecciones en el hombre (endocarditis, infecciones del tracto urinario, bacteremias...).

Indudablemente, la reacción de la coagulasa tiene un valor taxonómico grande, pero esta reacción no está correlacionada con la patogenicidad y virulencia de los estafilococos. En particular, la capacidad de algunos aislados clínicos de producir varias exotoxinas y enzimas - parecidas a aquéllas que elabora *S. aureus* (Dornbusch y cols., 1976; Gemmel y Roberts, 1973) - ha sido tenida en cuenta como un factor de virulencia. Tales factores pueden ser los siguientes:

- Toxinas y enzimas.

1.-Hemolisinas. En algunos estudios se ha comprobado la capacidad de los estafilococos coagulasa negativos para la producción de α y β -hemolisinas (Gemmel y Roberts, 1973) y se ha tratado de relacionar con un posible papel patogénico. Así, Kleck y Donahue (1968) encontraron que las hemolisinas eran producidas por la mayoría de los estafilococos coagulasa negativos aislados

de nariz de portadores (100%) o de sangre de pacientes con endocarditis (83%). En otro estudio publicado por Brun y sus colaboradores en 1971, en el que examinaron 354 aislados clínicos de estafilococos coagulasa negativos, se observó que un 69% de estas cepas no eran β -hemolíticas. No obstante, entre aquéllas que mostraban actividad β -hemolítica, un 20.3% eran activas contra los eritrocitos humanos.

2.- DNasa. La estrecha relación entre la capacidad de las cepas de *S. aureus* de producir coagulasa y deoxirribonucleasa y su patogenicidad para el hombre y otros animales, indujo a muchos investigadores a buscar la posibilidad de que los estafilococos coagulasa negativos pudieran también producir la enzima DNasa. La incidencia relativa de la enzima entre los estafilococos coagulasa negativos ha sido estudiada en un gran número de ocasiones y varía entre el 8% y el 60% de las cepas examinadas, puesto que depende de la fuente de aislamiento de las cepas, así como de la relativa sensibilidad del método usado para detectar la DNasa (Dornbusch y cols., 1976; Hecko y cols., 1974). En la mayoría de los casos estudiados, la actividad hidrolítica de la enzima era estable frente al calor (Gemmell y Schumacher-Perdreau, 1986).

3.-Proteinasas. La mayor parte de las cepas de *S. aureus* son activamente proteolíticas. Esta propiedad se demuestra utilizando como sustrato gelatina o caseína. Hay tres tipos de proteasas, designadas I (serin-proteinasa), II (Thiol-proteinasa) y III (metalo-proteinasa) (Arvidson, 1984).

Un estudio hecho sobre 100 cepas de estafilococos coagulasa negativos reveló que producen principalmente proteinasas de los tipos II y III (Schumacher-Perdreau y cols., 1983).

4.- Fibrinolisisina (Estafiloquinasa). Esta enzima realiza la conversión del plasminógeno a plásmido y es responsable indirectamente de la actividad fibrinolítica de *S. aureus*. La estafiloquinasa es producida por un 90% de las cepas de *S. aureus*,

pero sólo por un 10-25% de estafilococos coagulasa negativos (Gemmell y Roberts, 1973; Heczko y cols., 1974; Jeljaszewicz, 1960). La baja incidencia de esta enzima entre los estafilococos coagulasa negativos asociados con infecciones clínicas hace que su contribución a la patogenicidad de estos aislados sea insignificante (Gemmell y Schumacher-Perdreau, 1986).

5.- Lipasa y esterasa. La capacidad de los estafilococos coagulasa negativos de hidrolizar lípidos y ésteres ha sido frecuentemente encontrada entre los aislados de sangre, abscesos y lesiones de piel, aunque menos en los de orina (Gemmell y Roberts, 1973). Se han encontrado dos enzimas diferentes entre los estafilococos coagulasa negativos de diferente punto isoeléctrico (6.2 y 5.1). Ninguna cepa posee ambas enzimas a la vez y la enzima cuyo pI es de 6.2 es similar a la producida por *S. aureus* (Brunner y cols., 1981).

- Factores de virulencia de la superficie celular

1.- Cápsula. En algunos estafilococos coagulasa negativos se puede localizar, por encima de la pared celular, una estructura polisacáridica que constituye la cápsula. Se han descrito pocas cepas que produzcan cápsulas clásicas "in vitro" (Anderson y Craven, 1984; Hogt y cols., 1983; Wilkinson, 1983). Baddour y sus colaboradores (1984) sugieren que la producción de la cápsula puede determinar la capacidad para colonizar paredes vasculares traumatizadas, así como el endocardio.

En cualquier caso, muchas de las propiedades de ciertas especies de estafilococos coagulasa negativos proporcionan una evidencia indirecta de la capacidad de estos microorganismos para producir sustancias capsulares, como la capacidad de colonizar superficies artificiales (catéteres, injertos etc.), la pérdida de susceptibilidad a los fagos, la resistencia a la fagocitosis en un

suero no inmune (por lo tanto, a la muerte fagocítica) y su carácter extremadamente hidrofílico cuando se hace el test de agregación en sal. Todas estas propiedades de los estafilococos coagulasa negativos sugieren que poseen capacidad de producción de cápsula.

2.- **Slime.** Numerosos estudios al microscopio electrónico, de transmisión y de barrido, han revelado la existencia de una sustancia amorfa alrededor de los estafilococos coagulasa negativos que están adheridos a catéteres intravasculares y a otro tipo de instrumentos de plástico de pacientes. A esta sustancia (glucoconjugado) se la ha denominado exopolisacárido, slime o glicocalix (Ludwicka y cols., 1984b; Marrie y Costerton, 1984; Peters y cols., 1982). La producción de slime por los estafilococos coagulasa negativos parece tener un importante papel en la colonización de tejidos injertados, catéteres y otros biomateriales (Hogt y cols., 1983).

3.- **Proteínas.** Las proteínas presentes en la superficie celular pueden representar una ventaja para el microorganismo patógeno. Cuando éste se introduce en el huésped, sus antígenos de superficie pueden ser enmascarados por componentes del huésped, como fibronectina, fibrinógeno y colágeno, al unirse éstos a unas proteínas superficiales y específicas del microorganismo (Kuusela, 1978; Speziale y cols., 1985; Switalski y cols., 1983'; Wadström y cols., 1976; Wilkinson, 1983).

En *S. haemolyticus* y en otros coagulasa negativos aislados de infecciones, se ha demostrado la unión de fibronectina marcada con iodo 125 (Switalski y cols., 1983), mientras que cepas de *S. xylosus*, *S. capitis* y otros estafilococos coagulasa negativos aislados de muestras clínicas raramente se unen. Además, ninguno de los estafilococos coagulasa negativos une fibrinógeno ni tiene la proteína A. Esta proteína, presente en *S. aureus*, une la región Fc de la mayoría de las inmunoglobulinas G (excepto la IgG₃) pero no las IgA ni las IgM. También se ha demostrado que *S. haemolyticus*

y *S. epidermidis* unen colágeno a sus proteínas externas (Speziale y cols., 1985).

Es evidente que tanto la producción de enzimas y toxinas extracelulares como los factores de virulencia de la superficie celular de los estafilococos coagulasa negativos tendrán que ser más estudiados para poder involucrar definitivamente estos estafilococos en la patogénesis de las infecciones nosocomiales. Lo que sí parece claro es que tales características pueden facilitar la colonización sobre cuerpos extraños del organismo (válvulas, catéteres...).

b) Implicación en las infecciones hospitalarias

Los datos elaborados por el CDC en 1986 (Horan y cols., 1986) indican que los estafilococos coagulasa negativos persisten como importantes patógenos nosocomiales. Así, el 6.3% de las infecciones en los hospitales están producidas por estas bacterias. Constituyen el sexto microorganismo causante de infección hospitalaria, después de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus sp*, *S. aureus* y *Klebsiella sp*.

Actualmente, los estafilococos coagulasa negativos son la causa más importante de las bacteremias, seguidos por *S. aureus*, de tal forma que el conjunto de los estafilococos son responsables del 40% de este tipo de infección nosocomial (Horan y cols., 1988).

La mayoría de los aislados con significación clínica pertenecen a *S. epidermidis*. Esto puede ser debido a la preponderancia de la especie en la piel y a que estos estafilococos coagulasa negativos poseen ciertos factores de virulencia ausentes en otros estafilococos. *S. epidermidis* aparece principalmente en bacteremias, aunque también en infecciones quirúrgicas y del tracto respiratorio. *S. saprophyticus* suele ser la causa de infecciones del tracto urinario en mujeres jóvenes y rara vez está implicado en otro tipo de infección, debido a la marcada afinidad de este microorganismo para adherirse a la

células urogenitales humanas (Collen y cols., 1979; Hovelius y cols., 1979).

S. hominis, *S. haemolyticus* y *S. simulans* han sido aislados de un 5-20% del total de las infecciones humanas atribuidas a estos microorganismos. El resto han sido raramente implicados en casos de infección.

Hay factores del huésped que favorecen las infecciones por los estafilococos coagulasa negativos, como son las roturas de barreras naturales, la exposición previa a antibióticos y los inmunosupresores. Aunque los fallos en la defensa del huésped son un factor importante, quizá la causa real del incremento de las infecciones debidas a los estafilococos coagulasa negativos sea el mayor uso de válvulas protéticas y de catéteres.

1.3.- IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE LOS ESTAFILICOCOS COAGULASA NEGATIVOS.

1.3.1.- ESQUEMAS BÁSICOS Y AUTOMATIZADOS

En un pasado no muy distante, el único patógeno reconocido del género *Staphylococcus* era *S. aureus*, mientras que los estafilococos coagulasa negativos eran apreciados como simples contaminantes. Una vez que empezaron a ser considerados como patógenos, muchos laboratorios no los llegaron a identificar.

Es necesario identificar los estafilococos coagulasa negativos por varias razones:

- para proporcionar un valor predictivo sobre si el germen aislado tiene significación clínica o si se trata de un contaminante.
- para aumentar el conocimiento de la patogénesis de las especies de los estafilococos coagulasa negativos.
- para poseer información útil en estudios epidemiológicos (Koontz y Pfaller, 1989).

Desde que se han descrito los estafilococos coagulasa negativos como patógenos importantes, produciendo en pacientes normales e inmunodeprimidos endocarditis y septicemia (Kirchhoff y Sheagren, 1985), infecciones quirúrgicas (Blouse y cols., 1978), infecciones de material protético y catéteres (Fluornoy y Price, 1982) e infecciones del tracto urinario (John y cols., 1978), se han puesto en práctica varios métodos y técnicas para su identificación.

Kloos y Schleifer (1975b) fueron los primeros que describieron un esquema simplificado para la identificación de los estafilococos coagulasa negativos. Ellos seleccionaron caracteres claves de los estafilococos y llegaron a identificar más de un 80% de las cepas. Estos autores se basaron en los siguientes datos:

- Crecimiento anaeróbico en un medio de tioglicolato.
- Susceptibilidad a la lisostafina (50µg/ml).
- Prueba de la coagulasa y factor de agregación (cumpling factor).
- Actividad hemolítica.
- Reducción de nitratos.
- Actividad fosfatasa.
- Producción de ácido a partir de carbohidratos bajo condiciones aeróbicas. Los carbohidratos probados fueron: fructosa, galactosa, manosa, xilosa y/o arabinosa, ribosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trealosa, turanosa, meleiztosa, manitol y xilitol.
- Susceptibilidad a la novobiocina (1.6µg/ml)

Debido a que este método requiere unos largos periodos de incubación y es impracticable en el laboratorio clínico, se han desarrollado sistemas comerciales rápidos y algunos automatizados para la identificación de los estafilococos coagulasa negativos. A continuación hacemos una breve descripción de estos métodos:

* Staph Ident System (Analytab Products, Plainview, N.Y.). No requiere instrumentación, sin embargo es necesario hacer pruebas adicionales, como la actividad fosfatasa para identificar *S. epidermidis* y la susceptibilidad a la novobiocina para aislados de orina de *S. saprophyticus* (Aldridge y cols., 1983).

Kloos y Wolfshohl (1982) encontraron que las identificaciones conseguidas con este rápido sistema coincidían en un 90% con las identificaciones por métodos convencionales.

* Staph-Tract System (Analytab Products, Plainview, N.Y.). Las ventajas que tiene son su fácil inoculación e interpretación. Además no requiere instrumentación. Sin embargo, se han observado fallos en la identificación de *S. warneri*, *S. capitis* y *S. haemolyticus* (Giger y cols., 1984).

* Minitek (BBL Microbiology System, Cockeysville, MD). Tiene la ventaja de ser un sistema flexible, puesto que se puede elegir el disco de trabajo según la situación. Por ejemplo: un disco de novobiocina de 5µg puede usarse para modificar la prueba de susceptibilidad a la novobiocina. Tampoco es automatizado, con lo que su coste es menor, pero tiene la desventaja de que no identifica todas las cepas de *S. hominis* y *S. warneri* (Watts y cols., 1986).

* Microscan Pos Combo (American Microscan, Mahwah, N.J.). Después de la inoculación e incubación, los paneles pueden ser leídos manualmente o bien mediante un instrumento (auto-SCAN-4). Hussain y sus colaboradores (1986) encontraron una coincidencia del 79% al 95% en la identificación de los estafilococos coagulasa negativos al comparar este sistema con métodos convencionales. Las desventajas del Microscan es que no identifica todas las cepas de *S. warneri* y *S. hominis* y que el 66% de las identificaciones requieren 48 horas de incubación. Las ventajas son la lectura automatizada del biotipo y del antibiograma (Hussain y cols., 1986).

* Sceptor Gram positive MIC/ID (Johnston Labs, Towson, MD). Se trata de un panel que tiene las mismas ventajas que el anterior sistema de identificación. El 91% de las identificaciones coinciden con las realizadas por el método de Kloos y Schleifer (1975b), según Skulnick y sus colaboradores (1987).

* Automicrobic System Gram positive Identification Card (Vitek systems, Inc., Hazel Wood, Mo.). Es un método de identificación totalmente automatizado, de corto tiempo de

incubación y pequeño inóculo. Sólo llega a identificar seis cepas - *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* y *S. simulans* (Almeida y cols., 1983) -, aunque su base de datos ha sido ampliada últimamente para llegar a identificar doce especies.

En la tabla 5 podemos observar algunas de las características de cada uno de estos sistemas de identificación rápida:

TABLA 5.- Sistemas comerciales de identificación rápida (Koontz y Pfaller, 1989)

Sistema	Tiempo (horas)	Nº especies identificadas	Porcentaje correcto		
			todas	<i>S. epi</i> *	<i>S. sapro</i> *
Staph Ident	5	12	65-90	74	97
Staph Tract	24	14	87-90	96	-
Minitek	18-24	12	86-92	96	100
Microscan	18-48	11	79-95	97	97
Sceptor	18-24	10	91	-	-
Automicrobic (vitek)	4-12	5	67-83	88-95	87-100

* *S. epidermidis*

+ *S. saprophyticus*

Estos métodos de identificación para los estafilococos coagulasa negativos se aplican principalmente en el laboratorio clínico. En el laboratorio de referencia se prepara el esquema de identificación propuesto por Kloos y Schleifer (1975b), que, aunque no ha encontrado plena aceptación, es el más utilizado, pues los autores han confirmado su esquema usando métodos taxonómicos modernos sobre la composición de la pared celular, hibridación del DNA, electroforesis de enzimas isofuncionales y relaciones inmunológicas de proteínas (Schleifer y cols., 1979).



Hay otras características de los estafilococos coagulasa negativos que ayudan a diferenciar unas especies de otras, como son:

- La hemólisis con sinergismo: evalúa la producción de δ -toxinas (Hébert y Hancock, 1985).

- La hidrólisis del PYR (piroglutamil - β - naphthinamida) usando una prueba comercial (Carr-Scarborough, Stone Mountain, Ca.).

- Los estudios de susceptibilidad a la novobiocina (5 μ g), polimixina B (300 U), bacitracina (10 U), furazolidona (100 μ g) y taxo A (bacitracina 0.04 U).

Hasta que los factores responsables de las enfermedades producidas por estos microorganismos puedan ser manipulados genéticamente, el interés para distinguir entre microorganismos patógenos y no patógenos, que comenzó hace más de cien años, continúa hoy.

Hasta hace poco, se pensaba que los estafilococos coagulasa positivos que se aislaban tenían casi siempre significado patológico, mientras que las cepas de estafilococos coagulasa negativos no lo tenían, ya que podían ser fácilmente contaminantes al tener un hábitat tan ubicuo.

La tipificación de los microorganismos para determinar sus relaciones biológicas y genéticas ha sido muy utilizada en estudios epidemiológicos de infecciones por *S. epidermidis*. Los métodos de tipificación más comunes son:

- Patrones de susceptibilidad a agentes antimicrobianos (antibiotipia).
- Caracterización bioquímica (biotipia).
- Patrones de susceptibilidad a fagos (fagotipia).
- Serotipia.
- Análisis molecular de plásmidos (plasmidotipia).
- Digestión de DNA con endonucleasas de restricción.
- Hibridación de DNA.
- Producción de slime.

La mayoría de estos métodos no tipifican gran cantidad de microorganismos. Por eso ha sido más utilizada una combinación de diferentes sistemas con el fin de conocer el origen, reservorios y modos de transmisión de estos importantes patógenos nosocomiales. Por otra parte, sobre un paciente al que se le hayan aislado dos o más cepas de estafilococos coagulasa negativos en más de una ocasión, es necesario conocer si estos múltiples aislados tienen las mismas características fenotípicas e incluso genotípicas para indicar bacteremia persistente o contaminación. Para decidir si estos múltiples aislados son iguales o diferentes, se han desarrollado varios sistemas de tipificación que normalmente se utilizan en combinación.

1.3.2.- MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN

Los métodos de tipificación más importantes usados para los estafilococos coagulasa negativos son los siguientes:

- Antibiotipia

Se han puesto en práctica en el laboratorio clínico mediante procedimientos estandarizados. Se obtienen fácilmente patrones, por lo que los médicos los utilizan rutinariamente para identificar cepas de *S. epidermidis*. Dado que los patrones de antibiogramas están influidos por el uso de los antibióticos en un hospital, este método debe ser usado dentro de un entorno localizado (Parisi y Hecht, 1980).

La antibiotipia es un marcador epidemiológico aceptable. Así se comprobó en un estudio publicado por Christensen y sus colaboradores en 1983 y en otros publicados por Ludlam y sus colaboradores (1989a,b) quienes encontraron que los antibiogramas tenían un 98% de reproductibilidad y un alto poder discriminatorio en un estudio de peritonitis causadas por estafilococos coagulasa negativos en pacientes que recibían diariamente diálisis peritoneal. Sin embargo, es importante considerar la estabilidad

genética de los aislados. Existe evidencia de la pérdida de plásmidos de resistencia por *S. epidermidis* en pacientes que están mucho tiempo hospitalizados.

Aunque la resistencia a la meticilina ha sido usada como marcador para el estudio de la frecuencia de aislados resistentes de *S. epidermidis* en pacientes operados del corazón (Bentley y cols., 1970), la aparición de muchas cepas de *S. epidermidis* resistentes a meticilina (Archer y Tenebaum, 1980) hace que el uso de este marcador de resistencia sea inadecuado en estudios epidemiológicos. Ya desde 1981, *S. epidermidis* ha sido visto como un coco Gram positivo cuya resistencia a casi todos los agentes antimicrobianos iba aumentando (Atkinson y Lorian, 1984). A pesar de este hecho, los antibiogramas siguen practicándose por su fácil y rápida realización, aunque en la mayoría de los casos ha sido usado en conjunción con la biotipia.

- Biotipia

Muchos y diferentes sistemas de biotipificación de los estafilococos coagulasa negativos han sido desarrollados basándose en numerosas pruebas bioquímicas y fisiológicas. Baird-Parker (1963, 1965, 1974) clasificó por primera vez los estafilococos coagulasa negativos de origen no clínico (comida, suelo, agua, aire y animales domésticos) en biotipos. Su esquema de clasificación no tenía validez epidemiológica, debido al limitado número de fenotipos reconocidos, la predominancia del biotipo 1 en la piel y la extendida distribución del biotipo 1 en los hospitales.

Bentley y sus colaboradores (1968) desarrollaron un esquema específico para los aislados clínicos de los estafilococos coagulasa negativos. Utilizaron seis pruebas (oxidación de maltosa y manitol y producción de lipasa, fosfatasa, glucuronidasa y gelatinosa) para estudiar la frecuencia de los diferentes biotipos. No obstante, no tuvo un uso muy extendido a causa del pequeño número de biotipos que reconocía.

Otro esquema que utilizaba la producción de ácido a partir de la galactosa, fructosa y manosa y la producción de gelatinosa y ureasa, fue desarrollado por Holt (1969) para estudiar los estafilococos coagulasa negativos aislados de sondas y sangre de niños con sondas en el fluido cerebroespinal.

También se han desarrollado otros esquemas de biotipificación, pero nunca se han usado de forma generalizada. Algunos de estos esquemas utilizaban pocas pruebas (Akaton y Khatenever, 1976; Heczko y cols., 1974; Pelzer y cols., 1973); otros usaban demasiadas o contenían excesivos pasos para que resultaran prácticas (Mortensen, 1973).

El reconocimiento de las nuevas especies por Kloos y Schleifer (1975a) y Schleifer y Kloos (1975a) y su esquema de identificación (Kloos y Schleifer, 1975) han sido de gran utilidad.

Posteriormente empezaron a usarse las técnicas de identificación rápida que más arriba hemos descrito (Staph Ident, Staph Trac, Minitex, Microscan, Sceptor y Automicrobic).

- Fagotipia

El éxito de la fagotipia en *S. aureus* indujo a la utilización del mismo juego internacional de fagos para *S. epidermidis*. Los resultados fueron desalentadores, pues los estafilococos coagulasa negativos raramente eran lisados por fagos aislados de *S. aureus* (Pereira, 1962; Pulverer y Pillich, 1971). De ahí se dedujo la necesidad de desarrollar un sistema de fagotipia para los estafilococos coagulasa negativos.

El primer juego de fagos fue desarrollado en 1970 por Verhoef, van Boven y Winkler (van Boven y cols., 1969; van Boven, 1976; Verhoef y cols., 1972) en Holanda; Pulverer, Pillich y Krivankova, en Alemania occidental y Checoslovaquia (Pulverer y Pillich, 1971; Pulverer y cols., 1973); y Dean, Williams, Hall y Corse en Inglaterra (Dean y cols., 1973). Los fagos se obtenían mediante inducción con mitomicina C o irradiación ultravioleta

sobre las cepas. Los resultados no tuvieron mucho éxito. El porcentaje más alto de tipabilidad fue del 75.5% (Verhoef y cols., 1971), los patrones líticos fueron bastante largos (Dean y cols., 1973) y las cepas resultaban diferenciadas en demasiados fagotipos (Pulverer y cols., 1973).

En los Estados Unidos, Parisi y sus colaboradores (Skahan y Parisi, 1977; Talbot y Parisi, 1976), al obtener resultados insatisfactorios con los fagos de Verhoef y sus colaboradores sobre sus aislados de *S. epidermidis*, consiguieron su propio set de fagos. Indicaron que parecía existir una variación geográfica en la sensibilidad de los fagos: los fagos eran más activos sobre las cepas aisladas en el mismo sitio en que los fagos fueron obtenidos. También encontraron que sus fagos eran más eficaces sobre las cepas de *S. epidermidis* que sobre las descritas por Kloos y Schleifer (Jefferson y Parisi, 1979).

- Serotipia

La serotipia, como técnica para estudios epidemiológicos, no ha sido tan desarrollada como la fagotipia. Esto es debido a las dificultades para preparar antisueros específicos y a la estandarización del método. Las reacciones de aglutinación cruzadas entre *S. epidermidis* y *S. aureus* fueron descubiertas hace tiempo (Morse, 1962; Pillet y Orta, 1954). No obstante, algunas pruebas de absorción cruzada indicaron que *S. epidermidis* tenía su propio juego de aglutinógenos (Aasen y Oeding, 1971). Mientras que el ribitol-ácido teicoico con residuos de N-acetil glucosamina es característico de las paredes celulares de *S. aureus*, el glicerol-ácido teicoico con residuos glucosilo está presente en la pared celular de *S. epidermidis* (Davison y Baddlley, 1963; Morse, 1963; Losnegard y Oeding, 1963).

Últimamente se ha desarrollado un sistema de tipificación serológica basado en anticuerpos monoclonales (Gabelish y cols., 1990).

- Plasmidotipia

Parisi y Hecht (1980) fueron los primeros que utilizaron los perfiles plasmídicos para distinguir diferentes cepas de *S. epidermidis*. A partir de aislados de neonatos enfermos demostraron que las cepas que tenían el mismo fagotipo, biotipo y antibiograma podían distinguirse claramente por el perfil plasmídico. Otros han combinado esta técnica con la fagotipia y antibiogramas para establecer la relación epidemiológica entre aislados de pacientes con endocarditis (Archer y cols., 1982). También ha sido utilizada para diferenciar los contaminantes de la piel de los cultivos responsables de endocarditis, infecciones del fluido cerebroespinal, infecciones del tracto urinario, osteomielitis (Archer y cols., 1984) y bacteremia por catéteres intravenosos (Struelens y cols., 1990).

La técnica para el aislamiento de plásmidos de *S. epidermidis* es sencilla y ya se practica en los laboratorios clínicos. *S. epidermidis* es ideal para este tipo de análisis por el gran número de plásmidos que alberga, muchos de los cuales son crípticos. Un factor que reduce la sensibilidad de este método es la tendencia de las cepas a perder plásmidos, resultando que cepas idénticas producen diferentes perfiles plasmídicos (Parisi y Hetch, 1980).

-Análisis molecular de plásmidos

El rápido desarrollo de las técnicas para estudiar los plásmidos bacterianos ha permitido a la epidemiología usar nuevos métodos con los que estudiar las infecciones nosocomiales. El uso por parte de Myers y sus colaboradores (1976) de la electroforesis en geles de agarosa para detectar plásmidos y estimar su peso molecular ha permitido que esta técnica sea aplicada en muchos laboratorios clínicos. Cuando combinamos lo anterior con la digestión de los plásmidos mediante endonucleasas de restricción (que catalizan la rotura de la doble hebra de DNA en sitios de reconocimiento específicos), obtenemos unos fragmentos de DNA de

diferentes tamaños dependiendo de dónde estuvieran los sitios específicos que reconocen las endonucleasas. Estos fragmentos son separados por electroforesis y se obtienen unos patrones que pueden ser comparados para determinar su grado de afinidad. No obstante, esta técnica nos proporciona una información preliminar sobre las homologías de los plásmidos, ya que tamaños similares no tienen por qué poseer necesariamente idénticas secuencias de sus bases. Para obtener evidencia de lo anterior se necesita una prueba de hibridación DNA-DNA. En estafilococos coagulasa negativos ha sido estudiada por Pfaller y Herwaldt (1988). Las endonucleasas de restricción también han sido usadas sobre el DNA total bacteriano en los estafilococos coagulasa negativos (Renaud y cols., 1988).

- Producción de "slime"

Bayston y Penny observaron en 1972 la capacidad de los estafilococos coagulasa negativos para producir una sustancia mucoide que les permita adherirse a superficies lisas o colonizar sondas. Recientemente se ha encontrado que la producción de slime es una propiedad estable y discriminatoria entre cepas de *S. epidermidis*. El test para su producción se realiza fácilmente y puede ser cuantificado. Finalmente, esta propiedad está asociada con la adherencia bacteriana a catéteres intravasculares (Peters y cols., 1982). Cuando se usa junto a los antibiogramas y el API Staph Ident, la producción de slime tiene un alto poder discriminatorio (Christensen y cols., 1983). Además de una ayuda en la identificación de las cepas, esta propiedad puede proporcionarnos el discernimiento de las capacidad de *S. epidermidis* para producir infecciones en pacientes con cuerpos extraños al propio organismo. Hay evidencias de que el ataque de *S. epidermidis* a polímeros sintéticos de biomateriales no depende sólo de la producción de slime, sino de muchos otros factores, como la tensión superficial, carga y energía libre de superficie e hidrofobicidad (Ludwicka y cols., 1984a).

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (Clink y Pennington, 1987; Maggs y Pennington, 1989), el immunoblotting (Thomson-Carter y Pennington, 1989), el análisis del DNA plasmídico y cromosómico con endonucleasas de restricción (Bialkowska-Hobrzanska y cols., 1990b) y la ribotipia (Bialkowska-Hobrzanska y cols., 1990a) también han sido usados para la identificación de los estafilococos coagulasa negativos, aunque en menor proporción.

Podemos concluir diciendo que algunos de estos métodos proporcionan más datos epidemiológicos que otros y que el uso de una combinación de ellos sería la solución idónea.

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

La variedad de especies bacterianas capaces de producir infección hospitalaria es enorme. Los estafilococos coagulasa negativos han adquirido una gran relevancia en los últimos años como agentes etiológicos de importantes infecciones nosocomiales en el hombre. Se trata del sexto microorganismo causante de dichas infecciones, después de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus sp.*, *S. aureus* y *Klebsiella sp.*

Ante la ausencia de métodos de tipificación admitidos de forma general que nos permitan caracterizar a los estafilococos coagulasa negativos, nos hemos planteado, como principal objetivo, desarrollar varios sistemas de tipificación con el fin de:

- obtener un conocimiento más preciso de la patogenicidad de las especies de estafilococos coagulasa negativos frecuentes en los hospitales;
- mejorar el valor predictivo de un aislado clínicamente significativo;
- proporcionar una información epidemiológicamente útil en el análisis de brotes.
- estudiar la transmisión de cepas en ausencia de infección.

Los objetivos de este trabajo se puede resumir en los siguientes puntos:

1) Obtención de un juego de fagos autóctono que nos permita caracterizar el mayor número de cepas posible de estafilococos coagulasa negativos mediante la fagotipia. Para ello, a partir de una muestra de estafilococos coagulasa negativos amplia y representativa de toda el área geográfica de España del año 1986 (estudio multicéntrico), se indujeron los profagos o fagos lisogénicos de todas las cepas de *S. epidermidis* previamente identificadas mediante pruebas fenotípicas, de acuerdo con el esquema propuesto por Kloos y Schleifer (1975b).

2) Obtención del juego de fagos de "Dean and Williams" . Se trata de fagos que se están utilizando en diversos países.

3) Fagotipia convencional al 100 RTD, 1000 RTD y fagotipia tras el tratamiento con calor, con los juegos de fagos señalados, sobre las cepas de *S. epidermidis*, para realizar un estudio comparativo de la eficacia de los dos juegos de fagos y de las técnicas empleadas en la fagotipia.

4) Identificación y fagotipia de cepas de estafilococos coagulasa negativos procedentes de un estudio multicéntrico realizado en España durante el año 1990.

5) A partir de un grupo de cepas de estafilococos coagulasa negativos relacionadas epidemiológicamente (dos o más aislados proceden de un mismo paciente) se llevó a cabo el estudio de los siguientes marcadores epidemiológicos:

A.-Biotipia: identificación de las especies siguiendo el esquema propuesto por Kloos y Schleifer.

B.- Fagotipia: aplicación de los dos juegos de fagos a una concentración 1000 veces superior a la dilución de rutina (RTD) tras un tratamiento térmico (48°C).

C.-Fagotipia inversa como método alternativo de tipificación.

D.-Plasmidotipia. Con el análisis plasmídico se pretende el aislamiento y caracterización de los plásmidos contenidos en los aislados. Esto es necesario para obtener una información complementaria en los casos en que las cepas de un mismo paciente presenten el mismo patrón fágico o no puedan ser tipificadas por ninguno de los dos métodos anteriormente citados.

E.-Antibiotipia. Se estudia la sensibilidad a los principales antimicrobianos utilizados en el control de la infección hospitalaria.

F.-Estudio del factor de virulencia "slime". Se sabe que la producción de polisacáridos extracelulares favorece la adherencia de las cepas a biomateriales utilizados en sondas, catéteres y válvulas, por lo que se puede establecer una relación entre las cepas productoras de "slime" y su implicación en patología.

G.-Estudio comparativo de los diferentes marcadores utilizados para determinar cuál de ellos proporciona los datos más convincentes en la caracterización de las cepas de estafilococos coagulasa negativos.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- AISLADOS

3.1.1.- PROCEDENCIA DE LAS CEPAS

Se han estudiado tres grupos de cepas:

a) 268 aislados de estafilococos coagulasa negativos procedentes de un estudio multicéntrico, realizado en 1986, en el que han participado 74 hospitales de toda España. El número de aislados resultó menor al descontar aquellos que no fueron viables (por ausencia de crecimiento o por contaminación masiva), los que no se pudieron clasificar y los identificados como *S. aureus* y no estafilococos. Por otra parte, de las 247 cepas de estafilococos coagulasa negativos, 168 pertenecían a *S. epidermidis*. Todas estas cepas eran de origen hospitalario.

b) 188 cepas de estafilococos coagulasa negativos procedentes de los laboratorios de microbiología de distintos hospitales del país, como consecuencia de un estudio multicéntrico realizado en el año 1990.

c) El tercer grupo comprende 202 cepas de estafilococos coagulasa negativos epidemiológicamente relacionadas, es decir, pertenecientes a distintos pacientes a los cuales se les aislaron más de un estafilococo coagulasa negativo. Se recibieron en nuestro laboratorio entre los años 1988-1989 procedentes de dos hospitales ("Gregorio Marañón" de Madrid y "Vall d'Hebrón" de Barcelona) que envían muestras periódicamente con el fin de vigilar zonas de alto riesgo o la posible aparición de brotes infecciosos.

3.1.2.- CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN

La descripción de los medios de cultivo y reactivos utilizados en este trabajo se pueden ver en el epígrafe 3.9.

Para la multiplicación de las cepas recibidas en el laboratorio, se utilizaron placas de agar sangre. Se realizó una

siembra en aislamiento y se incubó 18 horas a 37°C en presencia de oxígeno.

Aquellas cepas que llegaban contaminadas eran reaisladas en placas de agar manitol salado a 37°C durante 18 a 24 horas.

A partir de un cultivo puro, se conservó el germen en leche descremada distribuida a 0.5 ml en pequeños viales (liofilizado o guardado en congelador a -70°C).

Para su conservación durante cortos periodos de tiempo, se empleó un medio de triptosa con extracto de levadura (TSA) inclinado, repartido en 2-3 ml y guardados a 4°C.

3.2.- IDENTIFICACIÓN (biotipia)

Cada cepa, tras ser aislada en el momento de su recepción, fue sembrada en un tubo de TSA inclinado. Este cultivo fue el utilizado para realizar la identificación mediante las siguientes pruebas:

a) ACTIVIDAD COAGULASA

Se realizó siguiendo la técnica de Barry y sus colaboradores (1973) en tubos con plasma de conejo diluido 1/4 en solución salina. Para ello se sangró un conejo del animalario y se recogió la sangre con citrato trisódico al 1%. Se separó el plasma por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se distribuyó a 0.5 ml en pequeños viales, a los que se añadieron dos gotas de un cultivo de estafilococo crecido en BHI (infusión de cerebro corazón) durante toda la noche a 37°C. A continuación, se incubaron los tubos en un baño a 37°C durante 4 horas. Se observó la presencia o ausencia de coágulo. Cualquier grado de coagulación era considerado como positivo.

Se incluyeron dos cepas como control: la cepa Oxford, como control positivo, y la cepa de nuestra colección 8887, como control negativo.

b) NUCLEASA TERMOESTABLE

Esta prueba fue realizada siguiendo la técnica de Barry y sus colaboradores (1973). El mismo cultivo líquido de BHI, utilizado para hacer la prueba de la coagulasa, se calentó a 100°C durante 15 minutos y fue distribuido mediante una pipeta Pasteur en pocillos de aproximadamente 3 mm de diámetro, cortados en una placa de agar que contenía DNA y azul de toluidina.

Tras la incubación a 37°C durante 4 horas, los estafilococos productores de nucleasa termoestable lisaban el DNA contenido en el agar produciendo un halo rosado alrededor del pocillo que contenía el extracto de estafilococo correspondiente. Aunque el método no es cuantitativo, el logaritmo de la concentración de DNAsa/ml está relacionado linealmente con el diámetro de la reacción. En esta técnica se incluyeron los mismos controles que para la prueba de la coagulasa.

c) ESTUDIO MORFOLÓGICO Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTO

En el estudio morfológico de las colonias se consideró la forma, el tamaño, el perfil, el borde, la transmisión de la luz y la pigmentación de las mismas. La determinación de estos caracteres se hizo en agar-P después de incubar las diferentes cepas durante 4-5 días a 37°C.

d) ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Las diferencias en la actividad hemolítica de las especies fueron puestas de manifiesto sembrando los aislados en placas de agar sangre preparadas con agar Mueller-Hinton y 5% de hemáties de carnero. Las placas se incubaron a 37°C y se realizó la lectura a las 48 horas de incubación. Los resultados fueron interpretados de acuerdo con el siguiente esquema:

(+): fuerte hemólisis (≥ 1.5 mm de halo)

(±): hemólisis débil o moderada (< 1.5 mm de halo)

(-): hemólisis no detectable.

e) PRODUCCIÓN DE ACETILMETILCARBINOL (acetoina)

A partir de un inóculo poco denso, los aislados fueron sembrados en el medio de Clark y Lubs (caldo RM/VP), que contiene peptona y glucosa, y se incubaron a 35°C durante cinco días. En presencia de oxígeno atmosférico, los productos finales (acetoina y 2,3-butanediol) son oxidados a diacetilo. Al cabo de este tiempo, a una alícuota de 2.5 ml de cultivo se le agregaron los reactivos VP de Barritt (1936) directamente y en el siguiente orden:

- 0.6 ml de una solución α -naftol al 5%. Se trata de una solución alcohólica que actúa como intensificador del color.
- 0.2 ml de una solución de hidróxido potásico (KOH) al 40% que contribuye a la absorción del CO₂.

Se agitó el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico con el fin de oxidar la acetoina en diacetilo, que es el reactante para el color producido en la reacción de Voges-Proskauer. Se dejó descansar el tubo por lo menos 10 ó 15 minutos antes de intentar la interpretación de los resultados.

La reacción es positiva cuando aparece un color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoina) y es negativa cuando aparece un color amarillo.

f) REDUCCIÓN DE NITRATOS

Las cepas se sembraron en un tubo que contenía 5 ml de caldo nitrado (medio de nitrato de potasio). Este medio favorece el crecimiento y ofrece las condiciones anaeróbicas necesarias para que sea activada la enzima nitrataasa sensible al oxígeno. Se incubaron a 37°C durante 5 días, junto a un tubo sin inocular que hacía de testigo, al cabo de los cuales se añadieron los reactivos:

- 1 ml de reactivo A (dimetil- α -naftilamida al 0.6%)

- 1 ml de reactivo B (ácido sulfanílico al 0.8%).

La reducción del nitrato (NO_3) en nitrito (NO_2) está indicada por la aparición de color cuando el nitrito reacciona con los dos reactivos y se forma un compuesto diazoico (p-sulfobenceno-azo- α -naftilamida). El enlace del grupo azo ($-\text{N}=\text{N}-$) da como resultado un compuesto de color rosado a rojo intenso. Cuando no se desarrolla color, se interpretan los resultados como negativos. Se atribuye un + a las cepas que reducen débilmente los nitratos cuando adquieren un color rosado. El tubo testigo debe presentar muy poca o ninguna coloración.

Algunos organismos son capaces de reducir el nitrato en nitrito, aunque destruyen el nitrito con la misma rapidez con que se formó dando un resultado falsamente negativo. Por ello, se realizó la prueba de la reducción del zinc con el objeto de confirmar los resultados. Consistió en agregar una pequeña cantidad de polvos de zinc sobre los tubos que no desarrollaron color. Una prueba positiva de esta reducción (ausencia de color) indica que el nitrato es reducido en nitrito y vuelto a reducir. Una prueba negativa (color rosado a rojo intenso) quiere decir que el nitrato está presente en el medio y no ha sido reducido por el microorganismo.

g) ACTIVIDAD FOSFATASA

Las cepas fueron sembradas en un tubo que contenía agar nutritivo inclinado, al que se le añadió la sal sódica difosfato de fenoltaleina (PDP al 1.5%), y se incubaron a 37°C durante cinco días.

Se utilizó 0.5 ml de hidróxido sódico (Na OH) 10N como reactivo para revelar la actividad fosfatasa.

Se consideró una prueba positiva cuando las colonias se volvían de color rojo-rosado brillante, mientras que, si las colonias se mantenían claras o blancas, se consideró la prueba negativa.

h) FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

La capacidad de un organismo de fermentar los hidratos de carbonono incorporados a un medio básico bajo condiciones aeróbicas fue detectada usando el método de agar en placa. Cada carbohidrato filtrado fue añadido a un medio llamado púrpura agar-base previamente esterilizado en autoclave, que tiene como indicador de pH púrpura de bromocresol. La concentración final del carbohidrato en agar fue del 1%.

A partir de un cultivo fresco en BHI, las cepas fueron inoculadas en las placas mediante un multiinoculador. Se incubaron a 30°C durante 5 días, al cabo de los cuales se realizó su lectura.

Las reacciones fueron interpretadas de la siguiente manera:

(+): producción de ácido. Aparece un color amarillo en el medio alrededor del inóculo.

(±): débil producción de ácido. Color amarillo pálido en el lugar en donde está el inóculo.

(-): no hay producción de ácido y no existe viraje de color.

Los azúcares probados fueron los siguientes: xilosa, glucosa, galactosa, manosa, sacarosa, maltosa, lactosa, trealosa, xilitol y manitol.

i) SUSCEPTIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA

La susceptibilidad de los estafilococos coagulasa negativos a la novobiocina se comprobó inoculando las cepas crecidas en BHI mediante un multiinoculador en una placa que contiene medio A y novobiocina a una concentración de 1.6 µg/ml.

Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37°C y se procedió a su lectura. Si había crecimiento en el sitio del inóculo la cepa era resistente. Era sensible cuando no se observaba ninguna colonia.

j) PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DEL GLICEROL AERÓBICAMENTE EN PRESENCIA DE ERITROMICINA

Esta prueba está basada en la propiedad que tienen los estafilococos (pero no los micrococos) de crecer y producir ácido a partir del glicerol en presencia de 0.4µg/ml de eritromicina. Para su ejecución se siguió la técnica propuesta por Schleifer y Kloos (1975b).

Como medio basal utilizamos el agar púrpura de bromocresol al que se le añadió un 1% de glicerol y la eritromicina.

Cada placa se sembró mediante el multiinoculador y la lectura se realizó tras 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C, considerando positivas las cepas que crecían y evidenciaban un cambio en la coloración del medio por viraje del indicador púrpura original a amarillo alrededor del inóculo.

3.3.- INDUCCIÓN DE FAGOS LISOGÉNICOS O FAGOTIPIA INVERSA (juego autóctono)

La técnica fue realizada según el método de Saxe y Notley (1978) por inducción de los profagos o fagos lisogénicos de los estafilococos con mitomicina C.

Cada cepa-problema se hacía crecer en caldo común durante 18-24 horas. Este cultivo era diluido 1/3 con caldo común e incubado en baño a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se añadió mitomicina C (Sigma) para obtener una concentración final de 0.5µg/ml. Tras incubar nuevamente en baño a 37°C durante media hora se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 2ml de caldo común y se incubó 90 minutos en baño a 37°C. Para permitir la liberación de los fagos de los restos bacterianos, se centrifugó nuevamente a 5000 r.p.m. 15 minutos y se recogió el sobrenadante, en donde se supone que se encontraban los fagos inducidos.

Todos los fagos obtenidos fueron aplicados sobre todas las cepas a partir de las cuales se habían inducido los fagos (ver técnica de la fagotipia).

3.4.- FAGOTIPIA

3.4.1.- PROPAGACIÓN DEL JUEGO DE BACTERIÓFAGOS

Los fagos utilizados en este estudio fueron doce, seleccionados a partir de su inducción en cepas-problema. Cada fago tiene su cepa propagadora en la cual se multiplica. Tanto el fago como la cepa se guardan en viales a -70°C . Para su uso, las cepas se siembran en tubos de TSA con el agar inclinado.

a) Purificación del fago

La purificación del fago es necesaria para que pueda ser propagado. Con este fin se realizan como mínimo tres pases sucesivos en placas de agar común 1.1 (Talbot y Parisi, 1976):

- Primer pase: se inunda una placa de agar común 1.1 con un cultivo de caldo común de la cepa propagadora crecida a 37°C durante 4 horas en agitación. Se retira el exceso de líquido con una pipeta Pasteur. Una vez seca la placa, se colocan sobre la superficie gotas de diluciones crecientes del fago desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Tras incubarlo durante 18 horas a 30°C se observa la presencia de placas de lisis. Se toca una placa de lisis con la punta de una pipeta Pasteur cerrada y se diluye en 0.5 mililitros de caldo común. Esta cantidad se considera como "fago puro".

- Segundo pase: la técnica es la misma que en el pase anterior. Se hacen diluciones desde la 10^{-1} hasta 10^{-7} del fago del primer pase considerado puro y se colocan sobre la superficie de la placa de agar ya inoculada y seca. Tras incubarlo 18 horas a

30°C se observa la presencia de placas de lisis y se vuelve a tocar una de ellas con una pipeta Pasteur cerrada, diluyéndola en 0.5 mililitros de caldo común. Este fago es el que ahora consideramos puro.

- Tercer pase: se realiza igual que los anteriores, pero partiendo del fago purificado en el segundo pase. Se vuelve a tocar una placa de lisis y se diluye en 0.5 mililitros de caldo común. Este es el fago purificado que vamos a utilizar para su propagación.

b) Determinación del RTD

Antes de realizar la propagación de un fago, hay que determinar su RTD (routine test dilution) titulándolo sobre su cepa propagadora. Para ello, se inunda una placa de agar común 1.1 con un cultivo en caldo de la cepa propagadora, retirando el exceso de líquido con una pipeta Pasteur. A continuación se colocan sobre la superficie de la placa de agar, ya inoculada y seca, gotas de diluciones crecientes del fago que queremos titular, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Tras incubar durante 18 horas a 30°C se observa la presencia de placas de lisis considerandoc como RTD la máxima dilución que da lisis confluyente.

c) Propagación en medio sólido

Se realizó por el método de agar semisólido descrito por Swanstrom y Adams (1951). Se calentó el tubo de agar semisólido distribuido en 6 ml para fundirlo, dejándolo enfriar a 45°C. Se añadió entonces:

- 0.6 ml de un cultivo en caldo común de la cepa propagadora crecido a 37°C durante 4 horas en agitación.
- 0.6 ml de fago diluido a su RTD
- 0.25 ml de cloruro cálcico al 1%.

Sobre una placa de agar común 1.1 de 15 cm de diámetro se añadió el agar semisólido que contenía la mezcla del fago y de la cepa propagadora en proporciones equilibradas, para que se produjera una lisis semiconfluente. Se incubó durante 18 horas a 30°C y se recogió el fago contenido en la sobrecapa añadiendo 15 ml de caldo común a la placa. La sobrecapa se desprendió y se resuspendió en el caldo por medio de una pipeta Pasteur doblada en ángulo recto. Esta suspensión se centrifugó a 5000 r.p.m. una hora y el sobrenadante fue recogido y filtrado mediante unas membranas millipore de 0.22 μ m de diámetro.

Por último, se realizó una nueva titulación sobre la cepa propagadora y se desecharon aquellos fagos cuyo título no era elevado. Se conservaron a 4°C hasta su uso. También fueron guardados a -70°C y liofilizados.

d) Espectro lítico

Cada fago propagado fue enfrentado a 20 cepas patrón para comprobar su espectro lítico. Así se consigue detectar cualquier mutación o modificación que haya podido tener lugar durante la propagación.

El espectro lítico de los fagos se determinó según la descripción de Blair y Williams (1961). Cada fago se tituló sobre las siguientes cepas: 15, 27, 28, 28A, 37, 48, 71, 82, 155, 157A, 165, 275, 275A, 456, 459, 471A, A6C, A9C, Bly RG y se compararon los títulos obtenidos sobre ellas con el obtenido sobre la cepa propagadora. Se evaluaron estos títulos en una escala de 1 a 5 en la que el número 5 se adjudicaba a aquellas cepas en las que el título obtenido era igual al de la cepa propagadora, el 4 a las cepas que presentaban un título 10^{-1} a 10^{-2} menor, el 3 a títulos 10^{-3} a 10^{-4} veces menor y así sucesivamente.

Los valores del espectro lítico de cada fago fueron comparados con los ya conocidos (elaborados previamente por nosotros) y se desecharon aquellos cuyo espectro no coincidía.

TABLA 6.- Espectro lítico de los doce fagos autóctonos.

CEPAS ⁺	FAGOS*											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
15	0	5	4	5	3	3	0	5	0	4	3	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	3	3	5	5	5	5	3	5	5	5	5	5
82	0	0	1	3	0	0	3	3	0	0	0	0
155	5	5	4	5	5	4	3	5	5	5	5	5
157A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
275	3	3	3	4	3	4	3	5	5	5	4	3
275A	2	1	2	3	2	3	3	4	4	5	4	3
456	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
459	5	4	4	2	4	5	4	5	5	5	4	4
471A	0	0	0	5	2	0	5	3	5	2	0	3
A6C	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1	0	0	0	2	0	0	5	2	1	0	0	0
RG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* A: 89904; B: 89954; C: 90319; D: 90338; E: 90340; F: 90341; G: 90352;
H: 90502; I: 90509; J: 43763; K: 43764; L: 43785.

+ Cepas propagadoras del juego de fagos de "Dean and Williams"
Números: grados de lisis. Ninguna=0 hasta confluyente=5.

Los fagos se conservaron a 4°C. A partir de ellos se prepararon las diluciones del RTD, 100 RTD y 1000 RTD para hacer la fagotipia y se repusieron periódicamente cada 15 días en previsión de una posible pérdida de título.

3.4.2.- TÉCNICA DE LA FAGOTIPIA

a) Realización

Cada aislado se inoculó en un tubo de caldo común a partir de un cultivo puro y se incubó a 37°C durante 4 horas en agitación. Una vez crecidos los cultivos líquidos, se sembraron por inundación en placas de agar común 1.1 secadas previamente a 37°C durante al menos 2 horas. Se retiró el exceso de líquido con una pipeta Pasteur y se dejaron secar las placas, destapadas y boca arriba, entre 15 y 20 minutos a temperatura ambiente.

A continuación se aplicaron los fagos, mediante un aparato dispensador de fagos diseñado por Lidwell (1959) que deposita simultáneamente todas las gotas de los fagos (0.02 ml) cargadas en asas metálicas espirales. Cada asa se cargó con el fago contenido en los pocillos de un bloque de metacrilato estéril en el que previamente se habían colocado las suspensiones de los fagos.

Cuando las gotas estuvieron secas, se taparon las placas, se incubaron a 37°C durante 18 horas y se procedió a su lectura, observando las placas con lupa sobre fondo oscuro.

b) Lectura de los resultados

Debido a la diferente sensibilidad de las cepas para ser lisadas por los fagos, la lectura se realizó de acuerdo con el siguiente criterio;

C1: lisis confluyente

++: más de 50 placas de lisis

+: entre 20 y 50 placas de lisis

±: menos de 20 placas.

Los resultados de la fagotipia en una cepa se conseguía enumerando los fagos en los que producía reacción separados entre sí por una barra. El resultado o patrón así expuesto es el fagotipo de la cepa en cuestión.

c) Interpretación de los resultados

Como describieron Williams y Rippon (1952), se pueden encontrar pequeñas diferencias en el fagotipo de cultivos individuales derivados de la misma cepa original. Estos autores sugirieron la aplicación de la "norma de las dos diferencias", según la cual, cuando dos cultivos presentan dos o más diferencias significativas, la posibilidad de que tengan un origen común es menor del 5%. Así pues, la fagotipia, igual que otros métodos de tipificación, reconocerá aislados diferentes, pero, en el caso de ofrecer patrones iguales, indicará una probable (aunque no segura) identidad.

d) Controles

Para garantizar la reproductibilidad de la técnica de fagotipia, es necesario realizar controles de forma continuada. Así, en la rutina de fagotipia, se incluían siempre tres cepas polivalentes (90343, 90434 y 5713) cuyo fagotipo era conocido (Tabla 7), corrigiendo aquellas diluciones cuyo efecto no era el esperado.

TABLA 7.- Fagotipo de las cepas control (juego autóctono).

<u>Fago</u>	<u>Cepas control</u>					
	90343		90434		5713	
89904	+	++	+	cl	±	++
89954	±	+	+	++	±	+
90319	cl	cl	++	cl	++	cl
90338	++	cl	++	cl	++	cl
90340	+	++	++	++	+	cl
90341	+	cl	++	cl	++	cl
90352	cl	cl	cl	cl	cl	cl
90502	+	++	cl	cl	++	cl
90509	cl	cl	cl	cl	cl	cl
43763	+	++	cl	cl	++	cl
43764	o	o	++	++	±	+
43785	++	cl	cl	cl	+	++

Fagotipia convencional (1000 RTD) y fagotipia del calor.

Estas tres cepas se incluían siempre, tanto en la técnica habitual al 1000 RTD como en la técnica alternativa, tras el tratamiento con calor.

e) Fagotipia tras el tratamiento con calor

Las cepas se hicieron crecer en caldo común durante 4 horas en baño a 48°C, en vez de hacerlas crecer a 37°C y en agitación (Dowset y cols., 1984). Posteriormente, se inundaron las placas de agar común 1.1, procediéndose de la misma forma que en la fagotipia ordinaria, al aplicar el juego de fagos a una concentración del 1000 RTD.

3.5.- OBTENCIÓN DEL JUEGO DE FAGOS DE "DEAN & WILLIAMS".

Este juego de fagos, así como sus cepas propagadoras, fue enviado a nuestro laboratorio por la Dra. Rosdahl del "Statens Seruminstitut de Copenhague". Dicho juego está formado por los siguientes fagos:

- Diez fagos (15, 27, RG, 28, 37, 155, 165, 28A, A6C, A9C) aislados por Dean y sus colaboradores (1973).
- Nueve (71, 275, 48, 82, 456, 157A, 471A, 459, 275A) caracterizados por Verhoef y sus colaboradores (1971).
- Uno (B1) aislado por De Saxe y Notley (1978).

A partir de fagos y cepas liofilizadas, se realizó una propagación, conservando a -70°C una parte tanto de los fagos como de las cepas propagadoras, designadas con el mismo número que los fagos.

Con estos fagos se siguió el mismo protocolo que con el juego de fagos autóctono:

- Determinación del RTD
- Propagación en medio sólido
- Espectro lítico
- Fagotipia al 1000 RTD y fagotipia tras el tratamiento térmico. Se incluyeron las cepas 90343, 90434 y 5713 como controles para la fagotipia (Tabla 8)



TABLA 8.- Fagotipo de las cepas control (juego de "Dean & Williams")

Fagos	<u>Cepas control</u>					
	90343		90434		5713	
15	±	++	o	o	o	o
27	cl	cl	cl	cl	cl	cl
28	±	+	o	o	o	±
28A	±	+	±	++	o	±
37	o	+	o	o	o	±
48	+	++	±	+	±	+
71	o	o	+	++	o	o
82	o	±	±	+	±	+
155	++	cl	±	+	±	+
157A	±	++	±	+	±	+
165	o	+	±	+	o	o
275	±	++	±	+	o	o
275A	±	+	+	++	+	++
456	±	+	cl	cl	cl	cl
459	++	cl	cl	cl	cl	cl
471A	++	cl	cl	cl	cl	cl
A6C	cl	cl	cl	cl	cl	cl
A9C	o	o	o	o	+	++
B1	cl	cl	+	cl	cl	cl
RG	++	cl	o	o	o	o

Fagotipia convencional (1000 RTD) y fagotipia del calor.

3.6.- PLASMIDIOTIPIA

a) PREPARACIÓN DE LOS LISADOS

La preparación de lisados para la electroforesis en geles de agarosa se hizo mediante el protocolo de Birnboim y Doly (1979), con algunas modificaciones:

- Las cepas se hicieron crecer en placas de agar sangre durante 18 horas a 37°C.

- Un asa bien cargada se resuspendió en 100µl de solución de lisis (con lisostafina a una concentración final de 250 µg/ml), contenida en tubos eppendorf de polipropileno, para romper la pared celular.

- Se incubaron en baño con agitación a 37°C media hora.

- Se añadieron 200µl de la solución alcalina (NaOH y SDS) agitando suavemente el tubo. La suspensión se hizo viscosa debido a la lisis celular alcalina.

- El tubo se mantuvo durante 5 minutos en un baño de hielo y entonces se añadieron 150 µl de una solución salina alta (acetato potásico), que neutralizó el DNA y lo agregó constituyendo una red insoluble.

- Se mantuvo el tubo a 0°C durante 60 minutos, para permitir que la alta concentración de acetato potásico precipitara la mayor parte del complejo proteínas-SDS, el RNA de alto peso molecular y el DNA cromosómico.

- Estas tres macromoléculas contaminantes fueron separadas por centrifugación a 12000 r.p.m. durante 5 minutos. Se retiraron 400µl de sobrenadante mediante una micropipeta y se transfirieron a otro tubo eppendorf.

- Un volumen de una solución fenol-cloroformo fue añadido al sobrenadante, para eliminar las proteínas residuales antes de precipitar el DNA plasmídico con etanol.

- Se centrifugó 5 minutos a 12000 r.p.m. y se recogieron 300 µl de sobrenadante, transfiriéndolo a otro eppendorf.

- Se añadieron dos volúmenes (600 μ l) de etanol frío y 18 μ l de cloruro sódico 5M y se centrifugaron 5 minutos a 12000 r.p.m. El sobrenadante se quitó con una micropipeta.

- El sedimento se resuspendió en 25 μ l de una solución TE con RNasa a una concentración final de 25 μ g/ml.

- Se incubó en estufa a 37°C durante 15 minutos para que actuara la enzima RNasa.

b) ELECTROFORESIS

En los pocillos de los geles de agarosa al 0.8% fueron colocados 10 μ l de muestra junto con 2 μ l del colorante (azul de bromofenol y xilencianol). Los plásmidos fueron separados en razón de su peso molecular mediante una electroforesis horizontal a 60 voltios con tampón de electroforesis 1X. Tras ser teñidos con bromuro de etidio durante media hora, los plásmidos fueron visualizados con un transiluminador de luz ultravioleta de 250nm y fotografiados con una cámara instantánea "Polaroid".

c) CONTROLES

En un pocillo de los extremos se colocó, como control de peso molecular, el ladder (sigma), que contenía 11 plásmidos cuyos tamaños variaban desde 2.1 a 16.2 kb.

3.7.- ESTUDIO DEL FACTOR DE VIRULENCIA "SLIME"

3.7.1.- MÉTODOS

La detección del "slime" como posible factor de virulencia se ha realizado utilizando dos métodos:

a) Método de Christensen y sus colaboradores (1982) de adherencia a las paredes de tubos de poliestireno o de cristal. Para ello se hizo crecer la cepa en un tubo de cristal que contenía 10ml de TSB y, tras su incubación a 37°C durante 18 horas, se vació su contenido y se tiñó con safranina. Los resultados fueron considerados positivos cuando se formó una capa teñida de safranina por las paredes del tubo. La formación de un halo en la interfase líquido-aire no es indicativa de la producción de "slime". Se puede hacer una clasificación semicuantitativa con los siguientes grados de producción:

- (3+): Fuerte
- (2+): Moderada
- (1+): Débil
- (0): Ausente.

b) Aglutinación en porta con concavalina A. La concavalina A, lectina que reacciona específicamente con residuos de manosa, fue utilizada para determinar la presencia de "slime", según describieron Ludwicka y sus colaboradores (1984b). La prueba consistió en hacer crecer la cepa en 10 ml de TSB (caldo con soja triptica) a 37°C durante 18 horas. Después de centrifugar a 5000 r.p.m. durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante y el sedimento fue lavado con 5 ml de PBS. Tras una posterior centrifugación, se resuspendió el sedimento en 100µl de PBS (una concentración de 5×10^9 ufc/ml). 25µl de esta suspensión bacteriana se enfrentaron a:

- 25 µl de concavalina A al 1% en PBS.
- 25 µl de concavalina A pura.

La reacción se leyó al cabo de un minuto a 20°C y fue interpretada como sigue:

- (3+): células completamente cohesionadas
- (2+): agregación marcada
- (1+): suspensión lechosa con algunos agregados
- (-): ninguna agregación.

3.7.2.- CONTROLES

Paralelamente a la prueba, se enfrentaron 25 μ l de la misma suspensión bacteriana con 25 μ l de PBS, para comprobar si las cepas eran autoaglutinables.

3.8.- PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

a) UTILIZACIÓN DE UN PANEL COMERCIAL

Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se realizaron con los paneles de Microscan Pos MIC tipo 3 (Baxter). Estas pruebas son miniaturizaciones del test de susceptibilidad a los antibióticos mediante diluciones en caldo (Jones y cols., 1985).

A partir de un cultivo crecido en placa de agar sangre a 37°C durante 18-24 horas, se sembraron una o dos colonias morfológicamente idénticas en un tubo que contenía agua con "pluronic" (antiespumante). Se agitó suavemente para evitar la formación de burbujas y se inoculó en el panel pos MIC tipo 3 que contenía los diferentes antibióticos. Dichos paneles fueron incubados a 37°C durante 18 horas y la lectura de las CMI se realizó con ayuda de un programa informático suministrado por la propia casa comercial.

b) ANTIBIÓTICOS PROBADOS

Los antibióticos que se encuentran en el panel y su concentración en microgramos por mililitro se pueden observar en la tabla 9.

TABLA 9.- Antibióticos y rango de concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)

Amoxicilina/ K clavulánico (Aug)	2/1-4/2
Ampicilina (Am).....	0.12-8
Cefamandol (Cfm).....	2-16
Cefazolina (Cfz).....	2-16
Cefotaxima (Cft).....	4-32
Ceftriaxona (Cax).....	4-32
Cefuroxima (Crm).....	2-16
Cloranfenicol (C).....	2-16
Clindamicina (Cd).....	0.25-4
Eritromicina (E).....	0.25-4
Gentamicina (Gm).....	1-4,6,8
Imipenem (Imp).....	1-8
Nitrofurantoina (Fd).....	64
Norfloxacin (Nxn).....	16
Oxacilina (Ox).....	0.25-8
Penicilina (P).....	0.03-8
Rifampicina (Rif).....	2-4
Sulfametoxazol (Sx).....	256
Tetraciclina (Te).....	0.5-8,128
Trimetoprim (T).....	8
Trimetoprim/Sulfametoxazol(T/S).....	2/38-8/152
Vancomicina (Va).....	2-16

c) CONTROL DE LOS ANTIMICROBIANOS

Los paneles comerciales se controlaron con una periodicidad mensual mediante una cepa-control denominada *S. aureus* ATCC 29213 suministrada por la propia casa comercial .

d) INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los valores proporcionados por el programa informático se realizó con la ayuda de la tabla estándar de interpretación del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990). Ver tabla 10.

TABLA 10.- Tabla estándar de CMI ($\mu\text{g/ml}$) (NCCLS)

	<u>Resistente</u>	<u>Intermedio</u>	<u>Sensible</u>
Amoxicilina/R clavulánico.	$\geq 8/4$	-	$\leq 4/2$
Ampicilina.....	≥ 0.5	-	≤ 0.25
Cefamandol.....	≥ 32	16	≤ 8
Cefazolina.....	≥ 32	16	≤ 8
Cefotaxima.....	≥ 64	16-32	≤ 8
Ceftriaxona.....	≥ 64	16-32	≤ 8
Cefuroxima.....	≥ 32	16	≤ 8
Cloranfenicol.....	≥ 32	16	≤ 8
Clindamicina.....	≥ 4	1-2	≤ 0.5
Eritromicina.....	≥ 8	1-4	≤ 0.5
Gentamicina.....	≥ 16	8	≤ 4
Imipenem.....	≥ 16	8	≤ 4
Nitrofurantoina.....	> 128	64'	≤ 32
Norfloxacin.....	≥ 16	8	≤ 4
Oxacilina.....	≥ 4	-	≤ 2
Penicilina.....	≥ 0.25	-	≤ 0.12
Rifampicina.....	≥ 4	2	≤ 1
Sulfametoxazol.....	≥ 512	-	≤ 256
Tetraciclina.....	≥ 16	8	≤ 4
Trimetoprim.....	≥ 16	-	≤ 8
Trimetoprim/Sulfametoxazol.	$\geq 4/76$	-	$\leq 2/38$
Vancomicina.....	≥ 32	8-16	≤ 4

3.9.- MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

AGAR SANGRE

- Bacto Mueller Hinton medium (ingredientes por litro):
- | | |
|-------------------------|---------|
| Infusión de carne..... | 300 g. |
| Ácidos de casamino..... | 17.5 g. |
| Almidón..... | 17 g. |
| Bacto agar..... | 17 g. |
| pH final 7.3 | |
- Sangre de carnero..... 5%

Preparación: resuspender 38 gramos de polvos Mueller Hinton en un litro de agua destilada y hervir hasta disolver el medio por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C y añadir 50 ml de sangre para obtener una concentración del 5%.

AGAR MANITOL SALADO

- Ingredientes (por litro):
- | | |
|------------------------|----------|
| Peptona proteasa..... | 10 g. |
| Extracto de carne..... | 1 g. |
| D-manitol..... | 10 g. |
| Cloruro sódico..... | 75 g. |
| Bacto agar..... | 15 g. |
| Rojo fenol..... | 0.025 g. |
| pH final 7.4 | |

Preparación: resuspender 111 gramos en un litro de agua destilada y calentar hasta la ebullición para disolver completamente. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C y enfriar hasta 45-50°C. Dispensar en placas Petri estériles.

LECHE DESNATADA

Es un producto estandarizado recomendado para medios de cultivo. Cuando se prepara en una solución al 10% equivale a leche desnatada fresca.

Preparación: disolver 100 gramos en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

TSA (Agar triptosa con extracto de levadura)**Ingredientes (por litro):**

Triptona.....	15 g.
Soitona.....	5 g.
Cloruro sódico.....	5 g.
Bacto agar.....	15 g.
pH final	7.3

Preparación: resuspender 40 gramos en un litro de agua destilada y calentar hasta ebullición para que se disuelva por completo. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Enfriar hasta 45-50°C.

PBS (Tampón fosfato)**Ingredientes (por litro):**

Fosfato disódico.....	1.09 g.
Fosfato sódico.....	0.31 g.
Cloruro sódico.....	8.5 g.
pH final	7

Preparación: disolver las cantidades indicadas en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

BHI (Infusión de cerebro y corazón)

Ingredientes (por litro):

Infusión de cerebro de ternera.....	200 g.
Infusión de corazón de vacuno.....	250 g.
Peptona proteosa.....	10 g.
Dextrosa (glucosa).....	2 g.
Cloruro sódico.....	5 g.
Fosfato disódico.....	2.5 g.
pH final 7.4	

Preparación: disolver 37 gramos en un litro de agua destilada. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C

AGAR NUCLEASA TERMOESTABLE

Ingredientes (por litro):

Tris (hidroximetil) aminometano....	6.1 g.
DNA.....	0.3 g.
Cloruro sódico.....	10 g.
Bacto agar.....	10 g.
Cloruro cálcico anhidro.....	1.1 g.
Azul de toluidina.....	0.083 g.

Preparación: pesar 6.1 gramos de tris y añadir un litro de agua destilada. Ajustar el pH a 9.0. Añadir el DNA, cloruro sódico, agar y cloruro cálcico anhidro y disolver hasta la ebullición. Enfriar a 45-50°C y añadir 0.083 gramos de azul de toluidina. Mezclar bien y repartir en placas. No es necesaria la esterilización.

MEDIO P**Ingredientes (por litro):**

Peptona.....	10 g.
Extracto de levadura.....	5 g.
Cloruro sódico.....	5 g.
Glucosa.....	1 g.
Bacto agar.....	15 g.
pH final 7.2	

Preparación: disolver en un litro de agua destilada y ajustar el pH a 7.2. Calentar para que se disuelva. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C y repartir en placas.

CALDO RM/VP (Producción de acetoina)**Ingredientes (por litro):**

Peptona tamponada.....	7 g.
Fosfato dipotásico.....	5 g.
Dextrosa (glucosa).....	5 g.
pH final 6.9	

Preparación: disolver en un litro de agua destilada y calentar suavemente para su disolución. Distribuir en tubos aproximadamente 5 ml/tubo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

REACTIVOS RM/VP (Producción de acetoina)**A) α -naftol al 5%:**

α -naftol.....	5 g.
Alcohol etílico (absoluto)..	100 ml.

B) Hidróxido de potasio al 40%:

Hidróxido de potasio.....	40 g.
Agua destilada.....	100 ml.

CALDO NITRATADO

Ingredientes (por litro):

Extracto de carne..... 3 g.
Peptona..... 5 g.
Nitrato potásico..... 1 g.
pH final 7

Preparación: se disuelven los componentes en un litro de agua destilada, se distribuyen en tubos y se esterilizan en autoclave 15 minutos a 121°C.

REACTIVOS PARA LA REDUCCIÓN DE NITRATOSA) Dimetil- α -naftilamida al 0.6%:

Dimetil- α -naftilamida..... 6 g.
Ácido acético 5N (30%)..... 1 l.

Preparación: disolver el dimetil- α -naftilamida en el ácido acético mediante un suave calentamiento. Filtrar y guardar en frasco topacio.

B) Ácido sulfanílico al 0.8%:

Ácido sulfanílico..... 8 g.
Ácido acético 5N (30%)..... 1 l.

AGAR NUTRITIVO DIFOSFATO DE FENOFTALEINA (Actividad fosfatasa)

Ingredientes (por litro):

- Agar:

Extracto de carne..... 3 g.
 Peptona..... 5 g.
 Cloruro sódico..... 8 g.
 Bacto agar..... 15 g.

pH final 7.3

- Sustrato:

Sal sódica difosfato de fenolftaleina (5%).... 2 ml.
 Agar nutritivo fundido (45°C)..... 98 ml.

Preparación: fundir la cantidad exacta de agar en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 115°C y enfriar hasta 45-50°C. Agregar el sustrato previamente filtrado mediante una membrana de 0.22 μ m de diámetro y volcar asépticamente en placas Petri.

REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE LA FOSFATASA

Hidróxido sódico 10N (40%):

Hidróxido sódico..... 40 g.
 Agua destilada..... 100 ml. ,

PÚRPURA AGAR BASE (fermentación de hidratos de carbono)

Ingredientes (por litro):

- Agar:

Peptona..... 10 g.
 Extracto de carne..... 1 g.
 Cloruro sódico..... 5 g.
 Bacto agar..... 15 g.
 Púrpura de bromocresol.... 0.02 g.

pH final 6.8

- Sustrato:

Azúcares al 10% en agua destilada.. 200 ml.

Preparación: disolver la cantidad apropiada de agar para un litro de agua destilada calentando hasta la ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar hasta 45-50°C y añadir 200 mililitros del carbohidrato que queremos preparar previamente esterilizado por filtración para obtener una concentración final del 1%.

NOVOBIOCINA

Ingredientes:

Medio P..... 180 ml.
Novobiocina [16 µg/ml].... 20 ml.

Preparación: pesar las cantidades necesarias para preparar 180 ml de medio P. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °C y dejar enfriar a 45-50 °C. Añadir entonces 20 ml de novobiocina para obtener una concentración final de 1.6 µg/ml.

ERITROMICINA CON GLICEROL

Ingredientes:

Púrpura agar base..... 1 l.
Glicerol..... 10 ml.
Eritromicina [40 µg/ml]..... 1 ml.

Preparación: añadir al púrpura agar base 10 mililitros (1%) de glicerol. Esterilizar en autoclave a 116°C durante 20 minutos y enfriar en baño hasta 50°C. La solución de eritromicina (sigma) se prepara disolviendo 40 mg en 5 ml de etanol al 95% y añadiendo agua hasta 100 ml. Se esteriliza por filtración y se añade 1 ml a un litro del medio base con glicerol estéril y enfriado a 50°C. Se

mezcla perfectamente por agitación y se reparte en placas Petri. Obtenemos una concentración final de eritromicina de 0.4 µg/ml.

CALDO COMÚN (Nutrient broth)

Ingredientes (por litro):

Extracto de carne..... 3 g.
Peptona..... 5 g.
pH final 6.8

Preparación: disolver 8 gramos en un litro de agua destilada. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

AGAR COMÚN 1.1

Ingredientes (por litro):

Agar nutritivo..... 17 g.
TSB..... 7.8 g.

Preparación: pesar las cantidades necesarias para un litro. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C y verter en placas Petri.

AGAR SEMISÓLIDO

Ingredientes:

Caldo común..... 1.2 g.
Bacto agar..... 0.75 g.
Agua destilada..... 150 ml.

Preparación: disolver las cantidades indicadas en baño de ebullición y, cuando el agar esté disuelto, repartir a 6ml en tubos . Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

CLORURO CÁLCICO

Ingredientes:

Cloruro cálcico..... 1 g.
Agua destilada..... 100 ml.

Preparación: disolver un gramo de cloruro cálcico en 100 ml de agua destilada y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

SOLUCIÓN DE LISIS

Ingredientes;

Tris ClH1 M pH 8..... 2.5 ml.
EDTA 0.5 M pH 8..... 2 ml.
Glucosa 500 mM..... 10 ml.
Agua destilada..... 85.5 ml.

Preparación: medir todos los componentes y filtrar mediante una membrana de 0.22µm de diámetro. Guardar a 4°C.

Al utilizarla hay que añadir 25 µl de lisostafina (preparada con Tris clorhídrico 1M a una concentración de 10000 µg/ml para conseguir la concentración final de 250 µg/ml) a 1 ml de solución de lisis.

SOLUCIÓN ALCALINA

Ingredientes:

Hidróxido sódico 0.2 M
SDS 1%

Preparación:

- El NaOH se prepara 0.4 M (1.6 g en 100 ml de agua destilada estéril)

- El SDS se prepara al 2% (2 g en 100 ml de agua destilada estéril)

En el momento de usarse se coge un volumen de NaOH 0.4 M y un volumen de SDS al 2%. Así se obtienen las concentraciones necesarias.

SOLUCIÓN SALINA ALTA

Ingredientes:

Acetato potásico 5 M.....	60 ml.
Ácido acético glacial.....	11.5 ml.
Agua destilada.....	28.5 ml.

Preparación: el acetato potásico 5 M se prepara pesando 490.75 gramos y disolviéndolo en un litro de agua destilada estéril.

SOLUCIÓN FENOL-CLOROFORMO

Ingredientes:

Fenol.....	500 ml.
Cloroformo.....	500 ml.
Alcohol isoamílico.....	10 ml.
Hidroxiquinoleína.....	1 g.
Agua destilada estéril.....	100 ml.
TNE 1X.....	100 ml.

Preparación: mezclar todos los ingredientes y dejarlos reposar durante 18 horas en un recipiente bien tapado. Aspirar toda la fase acuosa, tirarla y añadir 100 ml de TNE 1X (10 ml Tris 1 M, 2 ml EDTA 0.5 M, 20 ml ClNa 5 M y agua hasta un litro). Mezclar bien y dejar reposar otras 18 horas. Aspirar de nuevo toda la fase acuosa, desecharla y añadirle otros 100 ml de TNE 1X. Mezclar y dejar reposar. Guardar a 4°C.

CLORURO SÓDICO 5 M

Ingredientes:

Cl Na..... 292.2 g.
 Agua destilada..... enrasar hasta un litro

Preparación: disolver el cloruro sódico en un litro de agua en baño a 50°C mediante agitación.

SOLUCIÓN TE

Ingredientes:

Tris 1 M..... 10 ml.
 EDTA 0.5 M..... 2 ml.
 Agua destilada..... enrasar hasta un litro
 pH final 8

Preparación: medir las cantidades indicadas y filtrar con una membrana de 0.22µm de diámetro.

TAMPÓN DE ELECTROFORESIS (TAE 1X)

Ingredientes para el TAE 50X:

Tris..... 242 g.
 Ácido acético glacial..... 57.1 ml.
 EDTA 0.5 M..... 100 ml.
 Agua destilada..... enrasar hasta un litro

Preparación: disolver todos los componentes a temperatura ambiente y en agitación.

Para preparar el TAE 1X se cogen 10 ml de TAE 50X y se enrasa con agua destilada hasta 2 litros.

COLORANTE PARA ELECTROFORESIS**Ingredientes:**

Glicerol en agua	30 ‰
Azul de bromofenol.....	0.25‰
Xilencianol.....	0.25‰

BROMURO DE ETIDIO**Ingredientes para una solución stock [10µg/ml]:**

Bromuro de etidio.....	250 mg.
Agua destilada.....	25 ml.

Preparación: solubilizar el bromuro de etidio mediante agitación.

Para la solución de uso se añaden a un litro de agua destilada 500 µl de la solución stock de bromuro de etidio. La concentración final que se obtiene es de 5µg/ml.

TSB (Caldo con soja triptica)**Ingredientes (por litro):**

Triptona.....	17 g.
Soitona.....	3 g.
Dextrosa (glucosa).....	2.5 g.
Cloruro sódico.....	5 g.
Fosfato dipotásico.....	2.5 g.
pH final	7.3

Preparación: disolver la cantidad apropiada de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- ESTUDIOS MULTICÉNTRICOS

4.1.1.- AÑO 1986:

a) Procedencia e identificación de los aislados.

El estudio multicéntrico pretendía obtener un mayor conocimiento de la prevalencia de los aislados de estafilococos en España y de su sensibilidad a los antibióticos. Para ello se hizo un estudio de corte transversal con los aislados obtenidos en un solo día en 74 hospitales de la red pública española. Se obtuvieron 470 microorganismos, de los cuales 195 fueron *S. aureus* y 275 fueron identificados como estafilococos coagulasa negativos siguiendo el esquema propuesto por Kloos y Schleifer (1975b). En nuestro laboratorio se identificaron 247 cepas de estafilococos coagulasa negativos que procedían de 63 hospitales (Tabla 11).

TABLA 11.- Procedencia de los aislados (estudio multicéntrico de 1986).

Hospitales (Nº)	S. e p i d e r m i d i s	S. h a e m o l y t i l c u s	S. a i m l i n i s	S. h o m i n i s	S. w a r r i s	S. x y l o s s	S. c a p i t u s	S. c o n t i n i d e n t e s	S. i n d e t e r m i n a d o s	TOTAL
Andalucía (9)	18	0	0	2	0	2	1	0	0	23
Aragón (3)	12	1	0	0	1	0	1	1	1	16
Asturias (2)	4	1	1	2	0	0	0	0	0	8
Baleares (1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cantabria (2)	5	1	2	0	0	0	0	0	0	8
C. - la Mancha (1)	4	0	0	0	1	0	0	0	0	5
C. - León (8)	12	6	2	4	1	0	0	0	0	25
Cataluña (6)	15	3	0	0	0	2	0	0	0	20
C. Valenciana (5)	15	5	1	3	1	0	0	0	0	25
Extremadura (2)	5	1	0	0	0	0	0	0	0	6
Galicia (3)	5	1	1	0	0	0	0	0	0	7
Madrid (10)	48	5	6	4	1	0	1	0	0	65
Murcia (4)	5	0	0	0	1	1	0	0	0	7
Navarra (3)	5	3	1	2	1	1	0	0	0	13
País Vasco (3)	11	0	2	0	0	0	0	0	0	13
Rioja (1)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Desconocido	3	0	1	0	0	0	0	0	0	4
Total	168	27	18	17	7	6	3	1	1	247

En la tabla 12 podemos observar el número de aislados recibidos en nuestro laboratorio del estudio multicéntrico. Se recibieron 268 cepas de las cuales ocho no resultaron viables por ausencia de crecimiento o contaminación masiva, cinco no pudieron clasificarse, seis fueron identificadas como *S. aureus* y dos no eran estafilococos. Así pues, fueron 247 cepas de estafilococos coagulasa negativos las que se identificaron a nivel de especie, la mayoría pertenecientes a *Staphylococcus epidermidis* (68%).

TABLA 12.- Número de especies de estafilococos coagulasa negativos identificadas (estudio multicéntrico de 1986).

Número de especies (%)

<i>S. epidermidis</i>	168 (68 %)
<i>S. haemolyticus</i>	27 (10.9%)
<i>S. simulans</i>	18 (7.3%)
<i>S. hominis</i>	17 (6.9%)
<i>S. warneri</i>	7 (2.8%)
<i>S. xylosus</i>	6 (2.4%)
<i>S. capitis</i>	3 (1.2%)
<i>S. cohnii</i>	1 (0.4%)
Total.....	247.

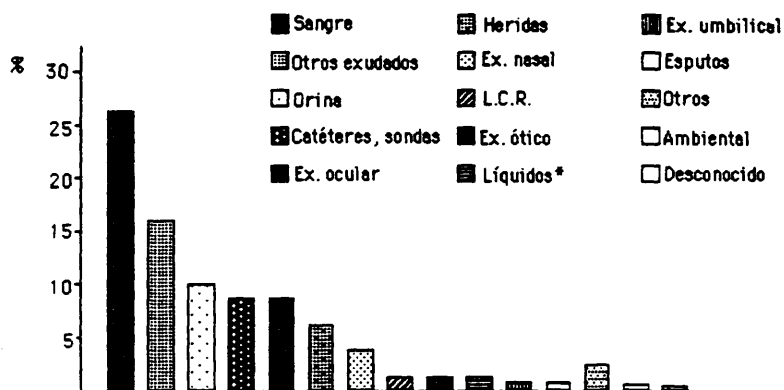
b) Valoración de la muestra estudiada

b.1.- Origen de los aislados

En la figura 2 se ha representado la distribución de los estafilococos coagulasa negativos según su origen. Los aislados de sangre son los más numerosos (27.9%) seguido del grupo que incluye muestras de pus, abscesos y exudados (15.8%). En tercer término se

encuentran los aislados de orina (10.9%). El resto de las muestras ofrecen valores más pequeños.

Figura 2.- Distribución de los aislados de estafilococos coagulasa negativos según el tipo de muestra (estudio multicéntrico de 1986).



* Líquidos: pleural, peritoneal y escítico.

En la tabla 13 podemos observar el origen de cada una de las especies de estafilococos coagulasa negativos. De las 247 cepas recibidas, el 68% se identificaron como *S. epidermidis* y en su mayor parte los aislados procedían de hemocultivos, de exudados y catéteres. *S. haemolyticus* es el segundo microorganismo aislado con mayor frecuencia (10.9%) seguido de *S. simulans* (7.3%), el primero aislado mayoritariamente de sangre y el segundo, de orina.

TABLA 13.- Origen de las especies de estafilococos coagulasa negativos (estudio multicéntrico de 1986).

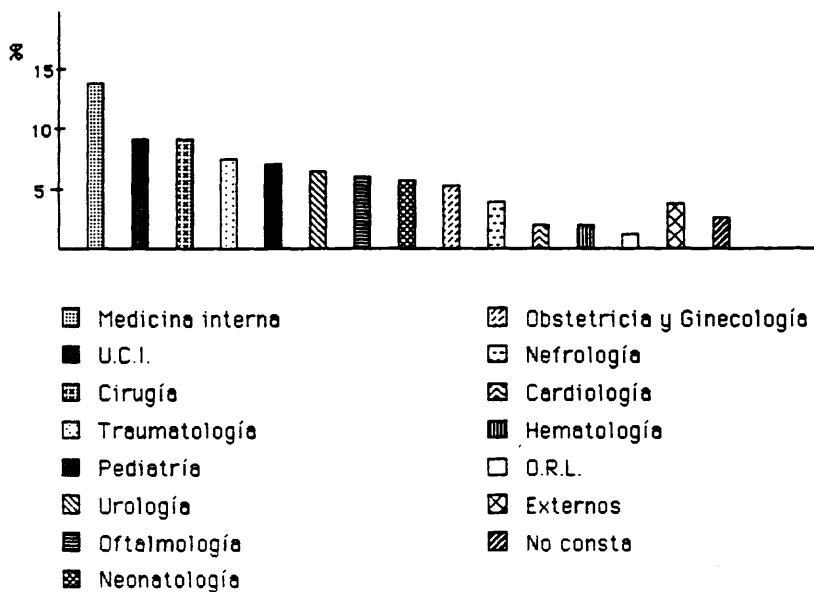
Origen	S. h a e p i d e r m i d i s								TOTAL
	S. h a e p i d e r m i d i s	S. h a e p i d e r m i d i s	S. h a e p i d e r m i d i s	S. h a e p i d e r m i d i s	S. h a e p i d e r m i d i s	S. h a e p i d e r m i d i s	S. h a e p i d e r m i d i s	S. h a e p i d e r m i d i s	
Sangre	49	6	4	7	2	0	1	0	69
L.C.R.	4	0	0	1	0	0	0	0	5
Ex. herida	10	4	1	0	1	0	1	0	17
Ex. ocular	20	2	0	0	1	0	0	0	23
Ex. ótico	4	0	1	0	0	0	0	0	5
Pus	7	1	0	2	0	0	0	0	10
Catéteres	18	2	1	2	0	0	0	0	23
Abscesos	4	0	0	2	0	0	0	0	6
Esputo	2	0	0	0	0	2	0	0	4
Orina	13	3	6	1	1	3	0	0	27
Ex. nasal	11	2	0	0	0	0	0	0	13
Otros exudados	17	4	3	2	0	1	0	0	27
Líquidos*	3	0	1	0	1	0	0	0	5
Otros	6	3	1	0	1	0	1	1	13
Total	168	27	18	17	7	6	3	1	247
(%)	(68)	(10.9)	(7.2)	(6.8)	(2.8)	(2.4)	(1.2)	(0.4)	

* Líquidos: pleural, peritoneal y ascítico.

b.2.- Distribución en los distintos servicios del hospital.

El mayor número de aislados provenían de enfermos de medicina interna (14.6%) seguido de U.C.I. (9.3%) y cirugía (9.3%). Un 4% de los aislados tenían origen probablemente externo y en un 3.2% no consta el origen. (Figura 3).

Figura 3.- Distribución de los aislados de estafilococos coagulasa negativos por servicios médicos (estudio multicéntrico de 1986).



c) Inducción de fagos lisogénicos o fagotipia inversa. (Juego de fagos autóctono).

De las 247 cepas de estafilococos coagulasa negativos del estudio multicéntrico, 168 fueron identificadas como *S. epidermidis*. Se hizo la inducción de fagos con mitomicina C a todas estas cepas y cada uno de los 168 supuestos fagos inducidos fue aplicado sobre las 168 cepas de *S. epidermidis*. Después de probarlos todos, se seleccionaron 12 fagos dado que eran los que tenían un mayor efecto lítico sobre las cepas probadas y que la proporción conseguida en la tipificación era mayor.

d) Propagación de los fagos.

Cada fago seleccionado fue propagado, tras sucesivas titulaciones realizadas en las cepas en las que daba un mayor efecto lítico, sobre aquella cepa en la que el título era más elevado.

En la siguiente tabla (tabla 14) podemos observar las doce cepas lisogénicas a partir de las cuales se indujeron los fagos, así como las cepas propagadoras de los mismos.

TABLA 14.- Cepas bacterianas lisogénicas, cepas propagadoras y fagos de *S. epidermidis*.

<u>Cepa lisogénica</u> <u>(origen)</u>	<u>Cepa propagadora</u> <u>(origen)</u>	<u>Fagos</u>
89904 (exudado conjuntival)	89925 (sangre)	89904
89954 (exudado conjuntival)	90418 (exudado nasal)	89954
90319 (sangre)	90343 (sangre)	90319
90338 (sangre)	89943 (exudado conjuntival)	90338
90340 (exudado herida)	89939 (exudado vaginal)	90340
90341 (sangre)	90510 (exudado herida)	90341
90352 (piel)	89939 (exudado vaginal)	90352
90502 (sangre)	89940 (sangre)	90502
90509 (exudado herida)	90374 (recto)	90509
43763 (orina)	89939 (exudado vaginal)	43763
43764 (sangre)	89939 (exudado vaginal)	43764
43785 (sangre)	90319 (sangre)	43785

e) Obtención del juego de fagos de "Dean and Williams".

Los veinte fagos del juego fueron propagados en medio sólido sobre sus cepas propagadoras y titulados para determinar el R.T.D. y posteriormente hacer la fagotipia.

f) Espectro lítico de ambos juegos de fagos.

El espectro lítico de los doce fagos (juego autóctono) y del juego de "Dean and Williams" se describe en las tablas 15 y 16, en donde el grado de lisis va desde 0 (ninguna lisis) hasta 5 (lisis confluyente).

TABLA 15.- Espectro lítico del juego de fagos autóctono.

CEPAS+	FAGOS+											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
15	0	5	4	5	3	3	0	5	0	4	3	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	3	3	5	5	5	5	3	5	5	5	5	5
82	0	0	1	3	0	0	3	3	0	0	0	0
155	5	5	4	5	5	4	3	5	5	5	5	5
157A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
275	3	3	3	4	3	4	3	5	5	5	4	3
275A	2	1	2	3	2	3	3	4	4	5	4	3
456	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
459	5	4	4	2	4	5	4	5	5	5	4	4
471A	0	0	0	5	2	0	5	3	5	2	0	3
A6C	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A9C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1	0	0	0	2	0	0	5	2	1	0	0	0
RG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* A: 89904; B: 89954; C: 90319; D: 90338; E: 90340; F: 90341; G: 90352;
 H: 90502; I: 90509; J: 43763; K: 43764; L: 43785.

+ Cepas propagadoras del juego de fagos de "Dean and Williams"

Números: grados de lisis. Ninguna=0 Confluente=5.

TABLA 16.- Espectro lítico del juego de fagos de "Dean and Williams".

CEPAS	FAGOS*																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
15	5	0	0	0	0	0	4	0	5	0	0	3	4	0	5	0	0	0	5	0
27	5	5	0	0	0	3	4	0	5	0	0	5	5	5	5	5	5	0	2	0
28	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28A	0	0	0	5	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	5	0
37	2	0	0	0	5	0	2	0	2	0	0	2	2	0	3	2	0	0	0	0
48	3	5	0	0	0	5	5	0	5	0	0	3	3	0	5	0	3	0	1	0
71	3	5	0	0	0	5	5	0	5	2	0	5	5	5	5	0	3	0	5	0
82	5	0	0	0	0	2	2	5	2	0	0	2	2	0	5	2	3	0	0	0
155	5	0	0	0	4	0	4	0	5	0	0	4	0	0	3	0	0	0	5	0
157A	5	3	0	0	0	3	3	0	5	5	0	5	5	0	5	0	0	0	0	0
165	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
275	4	0	0	0	0	0	4	0	5	0	0	5	5	0	5	3	3	0	5	0
275A	4	5	0	0	0	4	4	0	5	0	0	5	5	3	5	2	3	0	5	0
456	5	5	0	0	0	0	5	2	5	0	0	5	5	5	5	5	3	0	5	0
459	5	5	0	0	0	0	5	0	4	0	0	5	5	5	5	5	5	0	5	0
471A	5	0	0	0	0	0	5	0	5	0	0	5	5	5	5	5	5	0	5	0
A6C	5	4	0	0	0	0	5	0	5	0	0	5	5	5	5	5	5	0	1	0
RG	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	5	0	0
B1	1	5	0	3	0	3	0	4	5	0	0	5	4	5	5	2	5	0	5	0
A9C	5	0	0	0	0	0	5	0	5	0	0	5	5	0	5	2	5	0	0	5

* A:15; B:27; C:28; D:28A; E:37; F:48; G:71; H:82; I:155; J:157A; K:165; L:275; M:275A; N:456; O:459; P:471A; Q:A6C; R:RG; S:B1; T:A9C.

Números: grados de lisis. Ninguna=0 Confluente=5.

g) Fagotipia.

g.1.- Proporción de tipabilidad.

La reproductibilidad de los resultados de fagotipia se estableció realizando la fagotipia sobre diez cepas de *S. epidermidis* elegidas al azar, tres veces en tres días consecutivos.

La fagotipia sobre las 168 cepas de *S. epidermidis* se llevó a cabo con tres juegos de fagos:

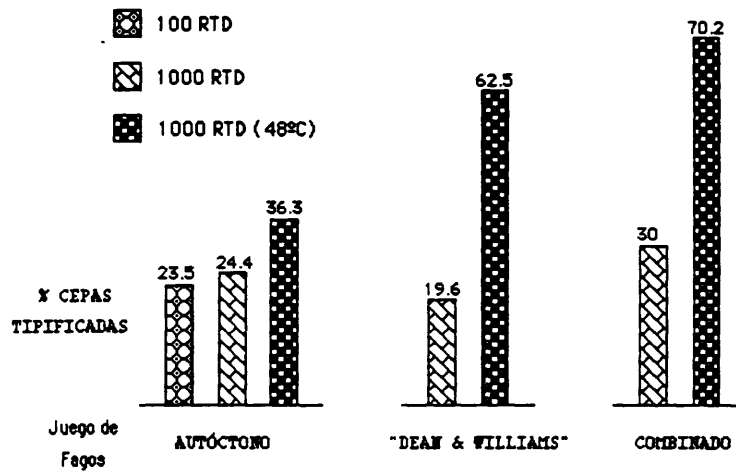
- 1) Juego de fagos autóctono
- 2) Juego de fagos de "Dean and Williams"
- 3) Juego combinado compuesto de los doce fagos obtenidos en nuestro laboratorio junto a otros trece fagos seleccionados del set de "Dean and Williams" atendiendo a su amplio rango de actividad. Algunos fagos producían el mismo efecto sobre las mismas cepas, actuando como un bloque de fagos. De éstos sólo se eligió uno de cada grupo o bloque de fagos.

Los métodos empleados para la fagotipia fueron los siguientes:

- fagotipia al 100 RTD (los fagos se aplican a una concentración cien veces mayor que la dilución de rutina)
- fagotipia al 1000 RTD
- fagotipia tras el tratamiento con calor en la que los fagos se aplican a una concentración mil veces mayor que el RTD.

La figura 4 muestra la proporción de tipabilidad que se obtiene con los tres juegos de fagos mediante los tres métodos de fagotipia.

Figura 4.- Proporción de tipabilidad con los tres juegos de fagos.



La proporción de cepas tipificadas cuando aplicamos el juego de fagos autóctonos al 100 RTD es de 23.5% y de 24.4% al aplicarlo al 1000 RTD. Dado que las diferencias porcentuales entre el 100 y el 1000 RTD no eran significativamente diferentes, decidimos suprimir el primer método de fagotipia, con lo cual los siguientes juegos de fagos fueron aplicados al 1000 RTD, realizando la fagotipia habitual y la fagotipia tras el tratamiento con calor. Con esta última se conseguía tipificar un mayor número de cepas (62.5%).

Con el juego de fagos de "Dean and Williams", la proporción de cepas tipificadas al 1000 RTD fue de 19.6%. El número de cepas caracterizadas cuando aplicamos la fagotipia tras el tratamiento con calor aumentó considerablemente, consiguiendo que únicamente un 37.5% quedaran sin tipificar.

Cuando se aplicó el juego combinado se consiguió una mayor reducción del número de cepas no tipificables. El número de cepas tipificadas aumentó desde un 30% con la fagotipia convencional al 1000 RTD, hasta un 70.2% después del tratamiento con calor.

g.2.- Patrones de fagotipia.

Los patrones de fagotipia con los tres juegos de fagos pueden observarse en la tabla 17 (A,B y C).

TABLA 17.- Frecuencias de patrones fágicos entre las 168 cepas de *S. epidermidis* (estudio multicéntrico de 1986).

<u>Patrón de fagotipia</u>	<u>Nº cepas</u>
(A) Con el juego autóctono	
Todos los fagos.....	11
43785.....	5
43763, 43785.....	5
90509, 43763, 43785.....	5
Todos, excepto: 89954, 90341, 43764, 43785.....	3
89854.....	3
Todos excepto: 89904, 89954.....	2
90319, 90338, 90340.....	2
90352.....	2
Otros patrones.....	23
No tipificables.....	107

(B) Con el juego de "Dean and Williams"

37.....	23
37, 48.....	15
456.....	10
15, 37, 48.....	10
456, 459.....	6
27,28,28A,82,155,157A,275A,456,459,471A,A6C,B1...	4
27, 456, 459, 471A, A6C, B1.....	3
48, 456.....	2
28A.....	2
15,27,28,37,48,82,155,157A,275,456,459,471A,A6C..	2
Otros patrones.....	28
No tipificables.....	63

(C) Juego combinado

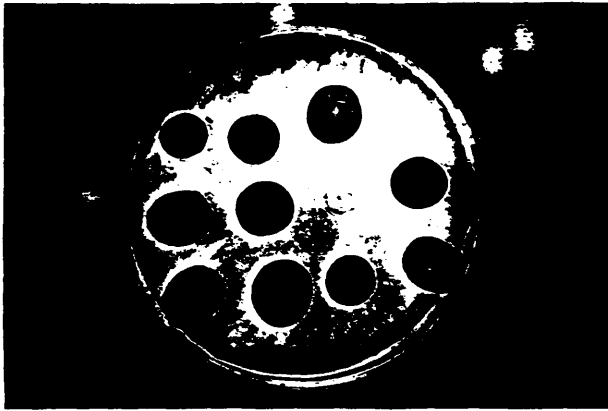
37.....	21
37, 48.....	11
15, 37, 48.....	9
456.....	6
Fagos autóctonos 27,28,28A,155,157A,275,456,471A,B1	4
27, 456, 471A, B1.....	4
43785.....	2
Todos, excepto: 28A, 165.....	2
90319,90338,90340,90341,90352,90502,90509,43763,43764,43785.	2
Otros patrones.....	57
No tipificables.....	50

Con el juego de fagos autóctono, el patrón largo, formado por la reacción de los doce fagos, fue el más numeroso (11 cepas). Sin embargo, con el juego de fagos de "Dean and Williams" y con el combinado, el patrón corto del fago 37 fue el más frecuente, hallándose en 23 y en 21 cepas en el primer y segundo juego respectivamente.

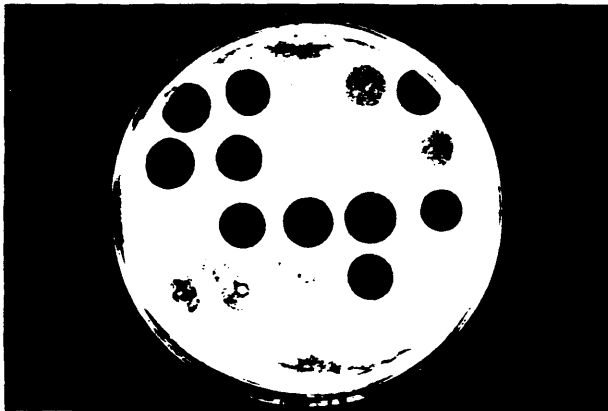
En la figura 5, se observan los patrones fágicos de una cepa de *S.epidermidis* con el juego de fagos autóctono y con el de "Dean & Williams".

Figura 5.- Placas de fagotipia.

Juego autóctono



Juego de "Dean & Williams"



g.3.- Frecuencias de patrones de fagotipia.

Los patrones encontrados entre las cepas tipificables se dividieron en tres categorías: patrón largo (seis o más reacciones), intermedio (de tres a cinco reacciones) y corto (una o dos reacciones). En la tabla 18 se recogen los porcentajes obtenidos de dichos patrones con los tres juegos de fagos. En general, los patrones cortos fueron los más abundantes. Con el juego de fagos autóctono se consiguió un 14.3% de patrones cortos, con el juego de "Dean and Williams" un 37.5% y con el combinado un 31.5%.

TABLA 18.- Frecuencias de patrones de fagotipia con los tres juegos de fagos (estudio multicéntrico de 1986).

	Cepas no tipificables	Cepas tipificables	Reacciones de las cepas tipificables					Total	
			6*	5+	4+	3+	2±		1±
Autóctono	107 (63.7%)	61	23 (13.7%)	2	1 (8.3%)	11	10 (14.3%)	14	168
"Dean & Williams"	63 (37.5%)	105	22 (13.1%)	1	6 (11.9%)	13	24 (37.5%)	39	168
Combinado	50 (29.8%)	118	31 (18.4%)	6 (20.2%)	14	14	18 (31.5%)	35	168

* Reacciones de patrón largo

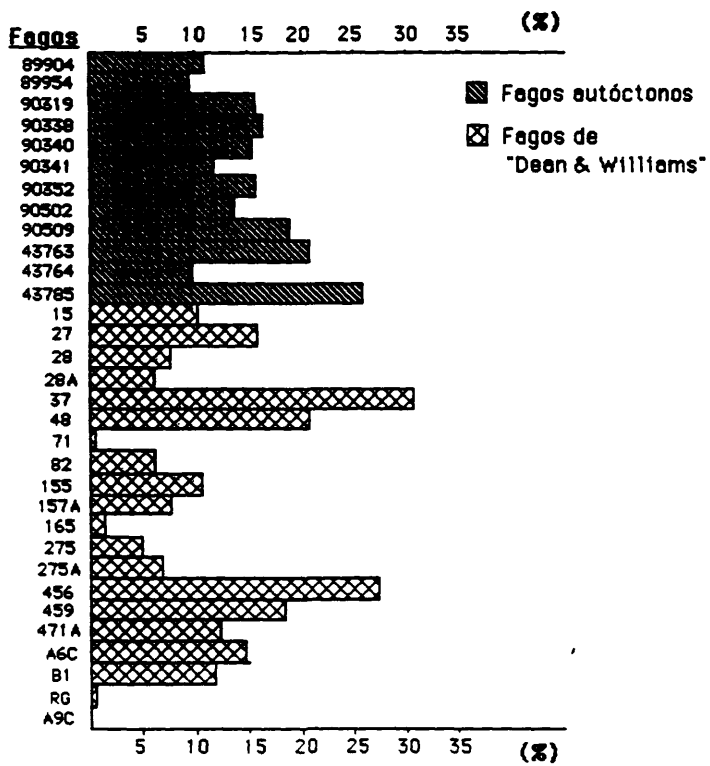
+ Reacciones de patrón intermedio

± Reacciones de patrón corto

g.4.- Frecuencias de reacción de los diferentes fagos.

El fago que tiene una mayor frecuencia de reacción es el 37 del juego de "Dean and Williams" con un 30.9%, seguido del 456 (28%) también del mismo juego y de los fagos autóctonos 43785 (26.2%) y 43763 (22%) como se puede comprobar en la figura 6.

Figura 6.- Frecuencias de reacción de los diferentes fagos (estudio multicéntrico de 1986).



4.1.2.- AÑO 1990**a) Procedencia e identificación de los aislados**

Este segundo estudio multicéntrico, como el anterior, pretendía llegar a un conocimiento más amplio de la prevalencia de los estafilococos en España. De la misma forma, se hizo un estudio de corte transversal con los aislados obtenidos en un solo día en 63 hospitales españoles. En nuestro laboratorio se identificaron 188 estafilococos coagulasa negativos procedentes de 56 hospitales. Para ello seguimos el esquema propuesto por Kloos y Schleifer (1975b) (tabla 19).

TABLA 19.- Procedencia de los aislados (estudio multicéntrico de 1990).

Hospitales (Nº)	S. epidemiológico		S. hospitalario		S. comunitario		S. zoonótico		TOTAL
	S. endémico	S. esporádico	S. familiar	S. nosocomial	S. de contacto	S. de alimentos	S. de animales		
Andalucía (5)	12	1	0	2	2	0	0	0	17
Aragón (2)	4	0	0	0	1	0	0	0	5
Asturias (1)	2	0	0	1	0	0	0	0	3
Baleares (1)	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Canarias (4)	12	3	0	1	1	0	0	0	17
Cantabria (1)	2	1	0	1	0	0	0	0	4
C. - La Mancha (1)	2	1	0	0	0	0	0	0	3
C. - León(8)	9	0	3	1	2	1	1	0	17
Cataluña (5)	21	2	2	0	0	1	1	0	27
C. Valenciana (4)	7	1	2	2	0	0	0	0	12
Extremadura (2)	5	2	0	0	0	0	0	0	7
Galicia (2)	1	0	0	0	0	1	0	0	2
Madrid (10)	20	5	6	3	2	1	2	1	40
Murcia (3)	3	0	2	0	2	0	0	0	7
Navarra (2)	4	1	0	0	0	1	0	0	6
País Vasco (3)	6	0	0	1	0	0	0	0	7
Rioja (1)	6	1	0	0	0	0	0	0	7
Desconocido	5	0	0	0	0	0	0	0	5
Total	121	18	15	14	10	5	4	1	188

De los 211 aislados, enviados a nuestro laboratorio para su identificación, 188 fueron estafilococos coagulasa negativos y, en su mayor parte, pertenecían a *S. epidermidis* (64.4%). El resto de las especies ofrecían valores menores del 10% (tabla 20).

TABLA 20.- Especies de estafilococos coagulasa negativos identificadas (estudio multicéntrico de 1990).

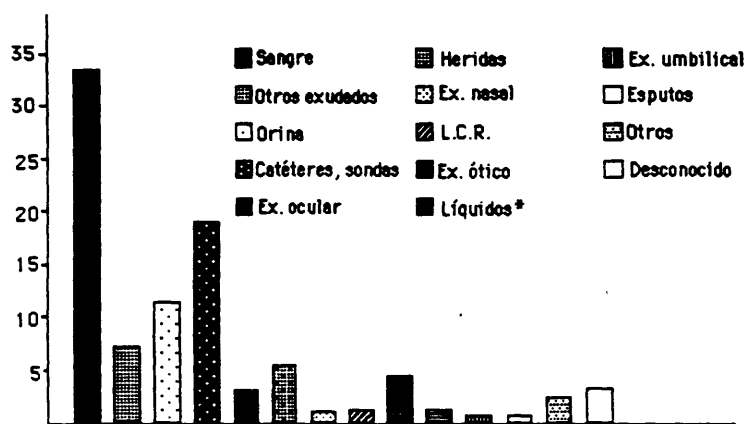
	<u>Nº de especies (%)</u>
<i>S. epidermidis</i>	121 (64.4%)
<i>S. hominis</i>	18 (9.5%)
<i>S. simulans</i>	15 (7.9%)
<i>S. haemolyticus</i>	14 (7.4%)
<i>S. xylosus</i>	10 (5.3%)
<i>S. capitis</i>	5 (2.6%)
<i>S. warneri</i>	4 (2.1%)
<i>S. saprophyticus</i>	1 (0.5%)
Total	188

b) Valoración de la muestra estudiada

b.1.- Origen de los aislados

En la figura 7 se ha representado la distribución de los estafilococos coagulasa negativos según su origen. Como se puede observar, los aislados de sangre constituyen el grupo más numeroso (34%) seguido de los aislados de catéteres (19.7%) y orina (12.3%). El resto de las muestras ofrece valores poco significativos e inferiores al 10%.

Figura 7.- Distribución de los aislados de estafilococos coagulasa negativos según el tipo de muestra (estudio multicéntrico de 1990).



* Líquidos: pleural, peritoneal y ascítico.

En cuanto al origen de las especies de estafilococos coagulasa negativos hay que destacar que la mayoría de las cepas de *S. epidermidis* aisladas (64.4%) procedían de hemocultivos, catéteres y orina. *S. hominis* era el segundo microorganismo aislado con mayor frecuencia (9.5%); la mayoría de los aislados también procedían de hemocultivos y catéteres (tabla 21).

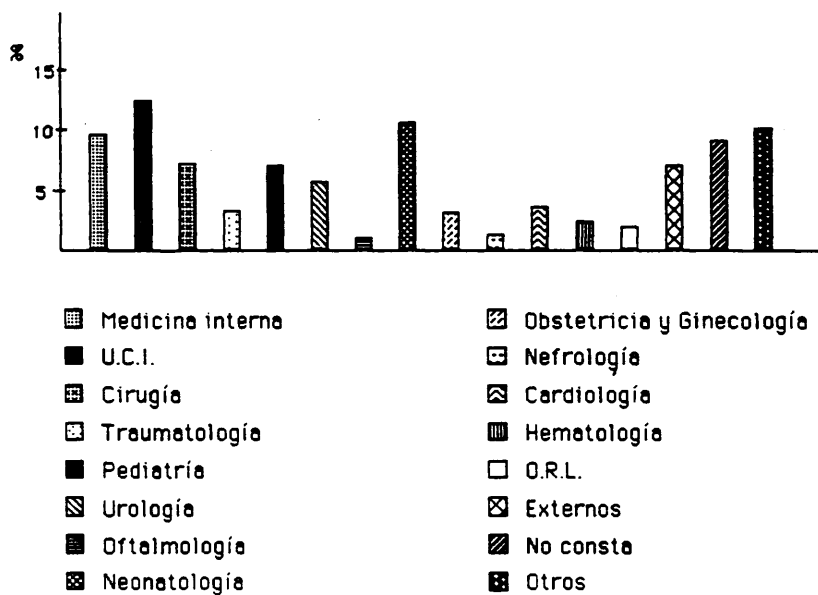
TABLA 21.- Origen de las especies de estafilococos coagulasa negativos (estudio multicéntrico de 1990).

Origen	S. e p i d e r m i d i s	S. h o m i n i s	S. s i m u l t i c e n t r i c o	S. h a e m o l i t i c o	S. x y l o s u s	S. c a p t i s	S. w a r e r i s	S. s a p r o p h y t i c u s	TOTAL
Sangre	44	7	2	5	1	4	1	0	64
Catéteres	28	3	2	2	1	0	1	0	37
Orina	10	1	4	2	5	0	0	1	23
Otros exudados	9	2	1	3	0	0	0	0	15
Ex. heridas	9	0	1	0	0	0	1	0	11
Ex. ótico	5	0	1	2	0	0	1	0	9
Ex.ocular	5	1	0	0	0	0	0	0	6
L.C.R.	1	1	1	0	0	0	0	0	3
Líquidos*	1	0	2	0	0	0	0	0	3
Ex. nasal	2	0	0	0	0	0	0	0	2
Abscesos	1	0	0	0	0	1	0	0	2
Espuito	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Otros	3	1	0	0	1	0	0	0	5
Desconocido	3	1	1	0	2	0	0	0	7
Total	121	18	15	14	10	5	4	1	188
(%)	(64.4)	(9.5)	(7.9)	(7.4)	(5.3)	(2.6)	(2.1)	(0.5)	

b.2.- Distribución en los distintos servicios del hospital

La mayoría de los estafilococos coagulasa negativos aislados procedían de la unidad de cuidados intensivos (12.8%), del servicio de neonatología (10.1%) y de medicina interna (9.6%). Un 7.4% de los aislados tenían origen extrahospitalario y, por último, en el 8.5% de los aislados no consta el origen (figura 8).

Figura 8.- Distribución de los aislados de estafilococos coagulasa negativos por servicios médicos (estudio multicéntrico de 1990).



c) Fagotipia al 1000 RTD tras el tratamiento térmico

c.1.- Proporción de tipabilidad

La fagotipia se llevó a cabo, sobre los 188 aislados de estafilococos coagulasa negativos, con los dos juegos de fagos concentrados mil veces su dilución de rutina (1000 RTD) después de haber sido incubadas las cepas a 48°C durante 4 horas.

La proporción de cepas tipificadas con ambos juegos de fagos fue de 25.1% (53 cepas). En la tabla 22 se puede observar el número de cepas tipificadas por especies, siendo *S. epidermidis* la especie con una mayor frecuencia de tipabilidad (34.7%) seguida de *S. hominis* (22.2%) y de *S. xylosus* (20%).

TABLA 22.- Proporción de cepas tipificadas por especies (estudio multicéntrico de 1990).

<u>Especie</u>	<u>Nº cepas tipificadas / Total</u>	<u>(%)</u>
<i>S. epidermidis</i>	42/121	(34.7)
<i>S. hominis</i>	4/18	(22.2)
<i>S. simulans</i>	2/15	(13.3)
<i>S. haemolyticus</i>	1/14	(7.1)
<i>S. xylosus</i>	2/10	(20)
<i>S. capitis</i>	1/5	(20)
<i>S. warneri</i>	0/4	(0)
<i>S. saprophyticus</i>	1/1	(100)

c.2.- Patrones de fagotipia.

Una característica de los patrones fágicos que hemos encontrado es la gran variedad existente, habiendo pocas cepas que compartan el mismo patrón de fagotipia (tabla 23).

TABLA 23.- Patrones de fagotipia (estudio multicéntrico de 1990).

<u>Patrón de fagotipia</u>	<u>Nº cepas</u>
27.....	3
37.....	3
82, 456, 459, 471A.....	3
27, 90509.....	3
456, 471A.....	3
B1.....	3
90509.....	3
15,27,48,456,459,471A,A6C,B1,90338,90340,90341,90509,43763,43764,43785.....	2
-8.....	2
92, 275, 456, 459, 471A, A6C, B1, 90319, 90338, 90509.....	2
27, 48, 456, 471A, A6C, 90509.....	2
15, 90509.....	2
15, 456, 459, 471A, 90509.....	2
27, 48, 157A.....	2
Otros patrones.....	18
No tipificables.....	135

c.3.- Frecuencias de patrones de fagotipia

Los patrones de fagotipia fueron divididos en las tres categorías anteriormente mencionadas. Las frecuencias de estos patrones pueden observarse en la tabla 24, donde se aprecia una mayor proporción de patrones cortos (12.8%), la misma que se obtenía con los tres juegos de fagos en el primer estudio multicéntrico.

TABLA 24.- Frecuencias de patrones de fagotipia (estudio multicéntrico de 1990).

	Cepas no tipificables	Cepas tipificables	Reacciones de las cepas tipificables					Total	
			6*	5+	4+	3+	2±		1±
Ambos juegos	135 (71.8%)	53	17 (9%)	2	6 (6.4%)	4	8 (12.8%)	16	188

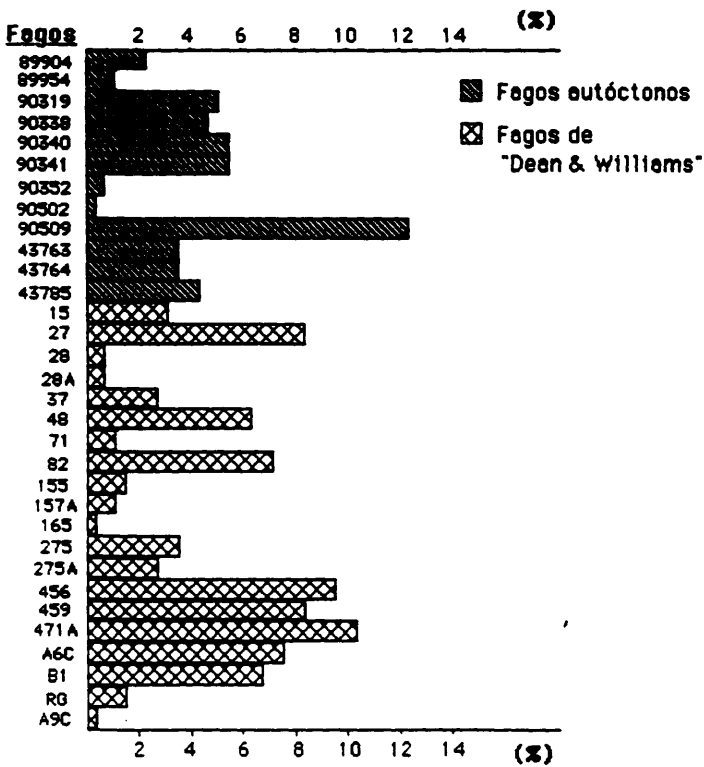
- * Reacciones de patrón largo
- + Reacciones de patrón intermedio
- ± Reacciones de patrón corto

c.4.- Frecuencias de reacción de los diferentes fagos

El fago autóctono 90509 es el que tiene una mayor frecuencia de reacción sobre las cepas (12.3%) seguido por el 471A del juego de fagos de "Dean and Williams" con un 10.4% de actividad. El resto de los fagos muestra unas frecuencias de reacción cuyos valores están por debajo del 10% (figura 9).



Figura 9.- Frecuencias de reacción de los diferentes fagos (estudio multicéntrico de 1990).



4.1.3.- COMPARACIÓN DE AMBOS ESTUDIOS MULTICÉNTRICOS

Los resultados obtenidos en los dos estudios multicéntricos quedan expuestos en la siguiente tabla (tabla 25).

TABLA 25.- Resultados de ambos estudios multicéntricos.

	<u>AÑO 1986</u>	<u>AÑO 1990</u>
· Nº cepas estudiadas	247	188
· Hospitales	63	56
· Especies mayoritarias	<i>S. epidermidis</i> (68%) <i>S. haemolyticus</i> (10.9%)	<i>S. epidermidis</i> (64.4%) <i>S. hominis</i> (9.5%)
· Origen predominante	sangre (27.9%) Pus, abscesos y exudados (15.8%)	sangre (34%) catéteres (19.7%)
· Servicios más frecuentes	M. I. (14.6%) U.C.I. (9.3%) Cirugía (9.3%)	U.C.I. (12.8%) Neonatoología (10.1%) M.I. (9.6%)
· Patrones de fagotipia mayoritarios	Cortos	Cortos
· Fagos predominantes	37 (30.9%) 456 (28%) 43785 (26.2%)	90509 (12.3%) 471A (10.4%) 456 (9.5%)

Como se puede observar, la especie mayoritaria en ambos estudios fue *S. epidermidis*, aislados principalmente de sangre. Mientras en el primer estudio multicéntrico las cepas provenían, en primer lugar de enfermos del servicio de medicina interna (14.6%) y, en el segundo, de pacientes de U.C.I. y cirugía (ambos con un 9.3%), en el segundo estudio multicéntrico, provenían principalmente de U.C.I. (12.8%) y neonatología (10.1%).

Los patrones de fagotipia que predominan tanto en un estudio como en otro son los cortos. La frecuencia de reacción de los diferentes fagos varía de un estudio multicéntrico a otro. En el

año 1986 el fago más potente es el 37 del juego de fagos de "Dean and Williams" y en el estudio de 1990 es el 90509 (fago autóctono) el de mayor frecuencia de reacción sobre las cepas.

4.2.- ESTUDIOS SOBRE CEPAS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS EPIDEMIOLÓGICAMENTE RELACIONADAS.

4.2.1.- Procedencia e identificación de los aislados

Todos los aislados fueron recibidos en el Laboratorio de Referencia de *S. aureus* durante los años 1988 y 1989 procedentes de dos hospitales ("Gregorio Marañón" de Madrid y "Vall d'Hebrón" de Barcelona).

Todas las cepas estudiadas fueron cocos Gram positivos, productores de catalasa y no presentaron actividad coagulasa cuando aplicamos el test del tubo con plasma de conejo. La identificación de todos los aislados fue confirmada mediante pruebas fenotípicas de acuerdo con el esquema propuesto por Kloos y Schleifer (1975b). En la siguiente tabla (tabla 26) se expone el número de especies de estafilococos coagulasa negativos identificadas. Como se puede apreciar, la mayoría pertenecen a *S. epidermidis* (82.7%).

TABLA 26.- Especies de estafilococos coagulasa negativos identificadas.

	<u>Nº de especies (%)</u>
<i>S. epidermidis</i>	167 (82.7)
<i>S. hominis</i>	15 (7.4)
<i>S. haemolyticus</i>	15 (7.4)
<i>S. capitis</i>	4 (2)
<i>S. simulans</i>	1 (0.5)
Total.....	202

4.2.2.- Origen de los aislados

El grupo más numeroso es el formado por muestras de catéteres (54.4%), seguido de los aislados de sangre (43.6%). El resto de las muestras ofrecen valores menores y poco significativos (tabla 27).

TABLA 27.- Origen de las especies de estafilococos coagulasa negativos.

<u>Origen</u> Especie	Cateter	Sangre	L.C.R.	Piel	Desconocido	Total
<i>S. epidermidis</i>	88	75	1	1	2	167
<i>S. haemolyticus</i>	8	7	0	0	0	15
<i>S. hominis</i>	12	3	0	0	0	15
<i>S. capitis</i>	2	2	0	0	0	4
<i>S. simulans</i>	1	0	0	0	0	1
Total	110	88	1	1	2	202
(%)	(54.4)	(43.6)	(0.5)	(0.5)	(1)	

4.2.3.- Significado clínico de la muestra

Durante los años 1988-1989 se recibieron cepas pertenecientes a diversos pacientes, con el fin de observar si el microorganismo aislado era el mismo o diferente y poder confirmar la existencia

de infección o contaminación producida por un estafilococo. Estos aislados eran el tipo idóneo de muestra para comprobar la efectividad y reproductibilidad de las diversas técnicas de marcadores epidemiológicos y para hacer un estudio comparativo sobre todas ellas.

Las 202 cepas recibidas pertenecían a 78 pacientes a los que se les habían aislado dos o más estafilococos coagulasa negativos que procedían de un mismo o diferente origen.

4.2.4.- Fagotipia al 1000 RTD tras el tratamiento térmico.

a) Proporción de tipabilidad

El número de cepas tipificadas al aplicar ambos juegos de fagos al 1000 RTD sobre las cepas crecidas en baño a 48°C durante 4 horas fue de 113 (55.9%). En la tabla 25 se ofrecen los valores del número de cepas tipificadas por especie. *S. capitis* es la especie que tiene la frecuencia más alta de tipificación (75%), aunque hay que pensar que el número total de cepas pertenecientes a esta especie no sea representativo. Le sigue *S. epidermidis* con un 59.3% y *S. hominis* con el 46.6% de cepas tipificadas.

TABLA 28.- Proporción de cepas tipificadas por especies.

<u>Especie</u>	<u>NR cepas tipificadas / Total</u>	<u>(%)</u>
<i>S. epidermidis</i>	99/167	(59.3)
<i>S. haemolyticus</i>	4/15	(26.6)
<i>S. hominis</i>	7/15	(46.6)
<i>S. capitis</i>	3/4	(75)
<i>S. simulans</i>	0/1	(0)

b) Patrones de fagotipia

Los patrones hallados son muy numerosos y pocas cepas coinciden en un mismo patrón. El patrón corto A formado por la reacción del fago 27 es el que aparece en el mayor número de cepas (10 en total), seguido por otros dos patrones, también cortos (patrón B y C), que aparecen cada uno en siete cepas (tabla 29).

TABLA 29.- Patrones de fagotipia.

<u>Patrones</u>	<u>Nº de cepas</u>
(A) 27.....	10
(B) 37, 71, RG.....	7
(C) 90502.....	7
(D) 15, 27, 48, 82, 155, 275, 275A, 456, 459, 471A, A6C, B1, A9C y los autóctonos...	5
(E) 27, 37, 82, 275, 456, 459, 471A, A6C, A9C, 90502.....	5
(F) 27, 456, 459, 471A, A6C, RG, 90338, 90502, 43783.....	5
(G) 27, 48, 90502.....	4
(H) 27, 89904, 90502.....	4
(I) 27, 456, A6C, B1.....	3
(J) 27, 456, 459, A6C.....	3
(K) 90338.....	3
(L) 27, 48, 456, 471A, A6C, 90502.....	3
(M) 27, 82, 456, 459, 471A, B1.....	3
(N) 37.....	3
(O) 27, 90352.....	3
(P) 27, 82.....	2
(Q) 456.....	2
(R) 89904, 89954.....	2
(S) 90338, 43785.....	2
(T) 27, 456, 459, 471A, A6C, 90502.....	2
(U) 27, 82, 456, 471A, B1, 90502.....	2
(V) 155, 456, B1, RG, A9C, 90502, 90509.....	2
Sin ce patrones.....	31
No identificables.....	89

c) Frecuencias de patrones de fagotipia.

El patrón corto, formado por la reacción de uno o dos fagos es el más numeroso (21.3%), aunque también hay que destacar los patrones de seis o más reacciones cuya frecuencia de aparición es de 18.3%. (tabla 30).

TABLA 30.- Frecuencias de patrones de fagotipia.

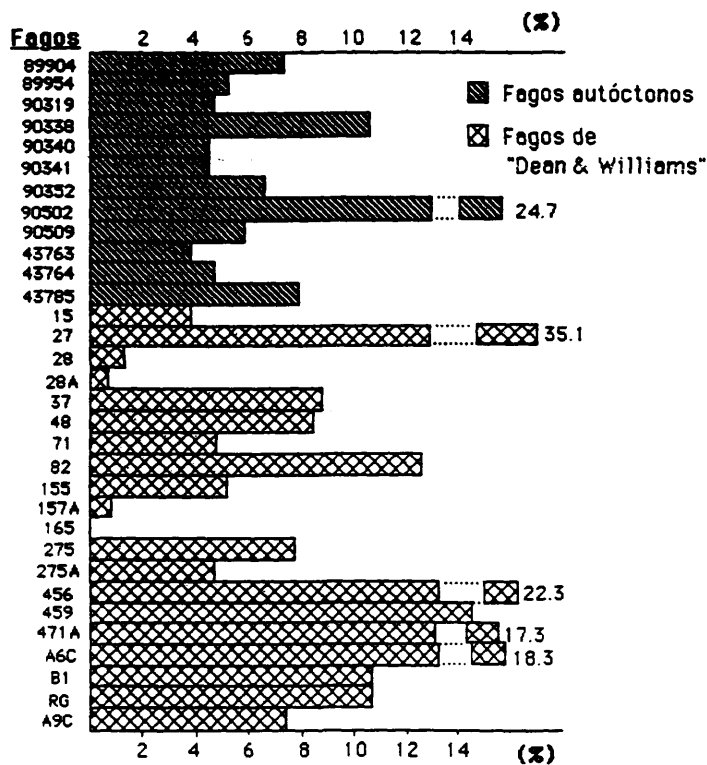
	Cepas no tipificables	Cepas tipificables	Reacciones de las cepas tipificables					Total	
			6*	5+	4+	3+	2±		1±
Ambos juegos	89 (44%)	113	37 (18.3%)	2 (1.6%)	14 (16.3%)	17 (21.3%)	11 (21.3%)	32 (21.3%)	202

- * Reacciones de patrón largo
- + Reacciones de patrón intermedio
- ± Reacciones de patrón corto

d) Frecuencias de reacción de los diferentes fagos

El fago más activo frente a las 202 cepas fue el fago 27 del juego de "Dean and Williams" con un 35.1% de reactividad y el fago autóctono 90502 (24.7%)(figura 10).

Figura 10.- Frecuencia de reacción de los diferentes fagos (cepas epidemiológicamente relacionadas).



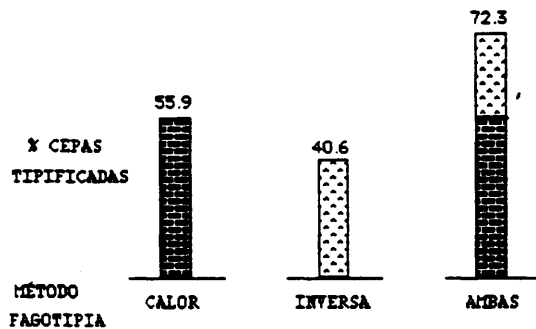
4.2.5.- Fagotipia inversa.

a) Proporción de tipabilidad

La fagotipia inversa se realizó sobre todas las cepas recibidas de los 78 pacientes. Las 202 cepas fueron tratadas con mitomicina C para convertir sus fagos lisogénicos en líticos. Cada fago supuestamente inducido fue aplicado de igual manera que la fagotipia directa, pero, en este caso, sobre 20 cepas-patrón (cepas propagadoras del juego de fagos de "Dean and Williams") y cuatro cepas polivalentes que actuaban de control (1030, W57, 18042 y 2009).

Se consiguió que se tipificaran 82 cepas (40.6%) quedando 120 cepas (59.4%) sin tipificar. De las 82 cepas, 33 (16.3%) no fueron tipificadas con la fagotipia del calor con los fagos al 1000 RTD. Así pues, con ambas fagotipias se consigue que la tipabilidad aumente hasta un 72.2% (figura 11).

Figura 11.- Proporción de tipabilidad de las dos fagotipias.



b) Patrones de fagotipia inversa.

Los patrones de lisis de fagotipia inversa se estudiaron sobre las cepas propagadoras del juego de fagos de "Dean and Williams" y sobre las cuatro cepas control polivalentes (1030, W57, 18042 y 2009) (tabla 31).

TABLA 31.- Patrones de fagotipia inversa.

<u>Patrones</u>	<u>Nº cepas (%)</u>
(I) W 57.....	18 (8.91)
(II) W 57, 18042.....	12 (5.94)
(III) 15, 71, 155, 275, 275A, 459, 471A.....	7 (3.46)
(IV) 71.....	6 (2.97)
(V) 459.....	4 (1.98)
(VI) 2009, W 57.....	4 (1.98)
(VII) 1030, W 57, 18042.....	4 (1.98)
(VIII) 71, W57, 18042.....	4 (1.98)
(IX) 48.....	3 (1.48)
(X) 15, 71, 155, 275, 275A, 459, 471A, 1030, W 57, 18042.....	3 (1.48)
(XI) 71, 459.....	3 (1.48)
(XII) 155.....	3 (1.48)
(XIII) 2009, 1030, W 57, 18042.....	2 (0.99)
(XIV) 71, 155, 275A, 456, 471A.....	2 (0.99)
(XV) 1030.....	2 (0.99)
(XVI) 71, 459, 471A.....	2 (0.99)
(XVII) 15, 71, 275, 275A, 459, 18042.....	2 (0.99)
Otros patrones.....	1 (0.49)
No tipificables.....	120 (59.40%)

El patrón corto I, formado por la reacción del fago sobre la cepa polivalente W57, es el más frecuente (8.9%), seguido del patrón II(W57, 18042), también corto, con una frecuencia de aparición del 5.9%.

4.2.6.- ANÁLISIS PLASMÍDICO.

A) Frecuencia de aparición.

De las 202 cepas estudiadas, se han encontrado plásmidos en el 79.2% de los aislados, mientras que 42 (20.8%) carecían de ellos. El número de plásmidos hallados en cada cepa varía desde ninguno hasta once. A continuación (tabla 32) se exponen los porcentajes de las cepas en las cuales se han encontrado ninguno, uno, dos, tres, cuatro y más de cuatro plásmidos.

TABLA 32.- Frecuencia de aparición de plásmidos.

	<u>Nº de cepas (%)</u>
Ningún plásmido.....	42 (20.8)
Un plásmido.....	19 (9.4)
Dos plásmidos.....	42 (20.8)
Tres plásmidos.....	45 (22.3)
Cuatro plásmidos.....	34 (16.8)
Más de cuatro plásmidos.....	20 (9.9)

Son infrecuentes las cepas que contienen un solo plásmido (9.4%) o más de cuatro (9.9%); las que poseen tres plásmidos son las que más aparecen (22.3%).

b) Tipos de plásmidos hallados.

El tamaño de los plásmidos encontrados varía desde una hasta 30 kilobases (Kb). Podemos establecer tres categorías en cuanto al tamaño de los plásmidos:

- mayores de 16.2 Kb
- entre 16.2 y 7 Kb

- menores de 7 Kb.

La frecuencia de plásmidos hallados teniendo en cuenta la anterior división es la que se observa en la tabla 33.

TABLA 33.- Proporción de plásmidos según su tamaño.

<u>Tamaño</u>	<u>Nº de plásmidos (%)</u>
> 16.2 Kb.....	44 (8.8)
16.2 Kb - 7 Kb.....	215 (43.2)
< 7 Kb.....	239 (48)

Los plásmidos de bajo peso molecular son los que con mayor frecuencia se encuentran entre las cepas de estafilococos coagulasa negativos (48%), aunque los de tamaño intermedio, comprendidos entre 16.2 Kb y 7 Kb, son también bastante frecuentes (43.2%). Por el contrario, los plásmidos de más de 16.2 Kb raramente aparecen (8.8%).

c) Variedad en los perfiles plasmídicos.

La gran variedad de perfiles plasmídicos encontrada nos ha permitido establecer 30 patrones que se repiten al menos dos veces y 46 perfiles únicos, es decir, que aparecen sólo en una cepa y en ninguna otra del estudio. En la siguiente figura puede verse algunos de los patrones establecidos (figura 12).

Figura 12.- Patrones plasmídicos.

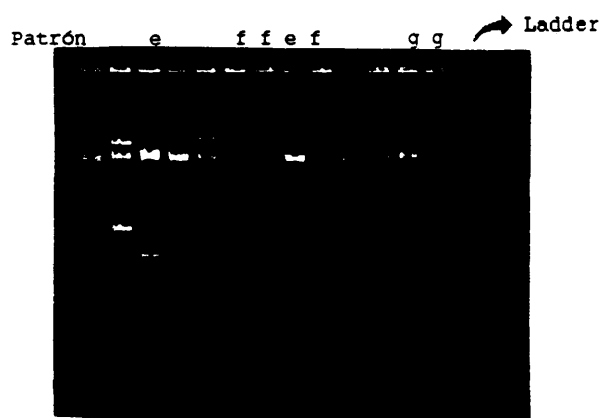
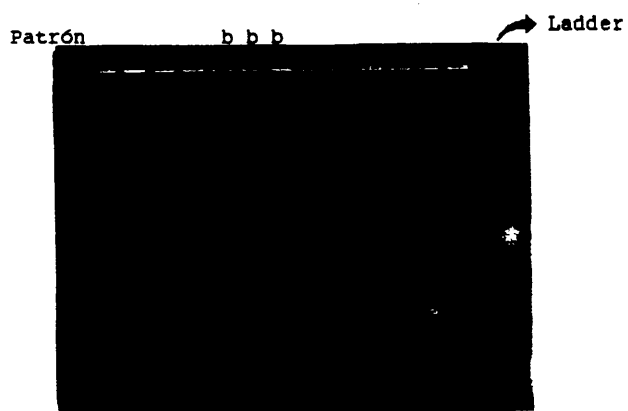
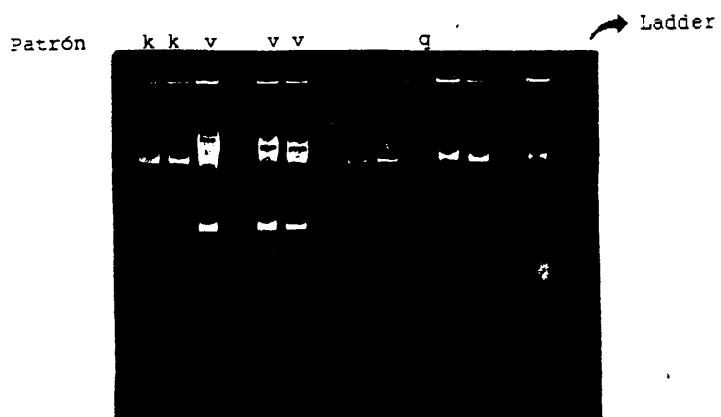
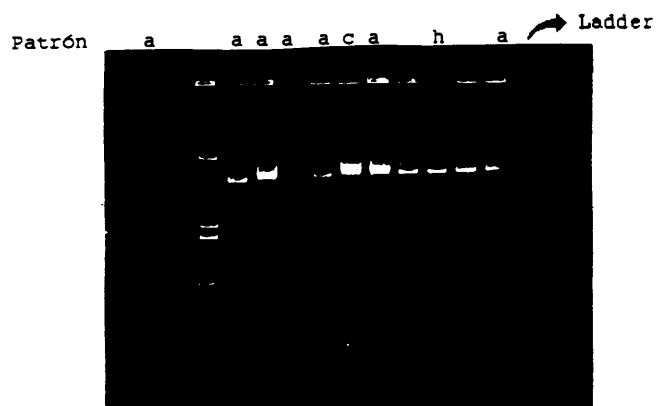


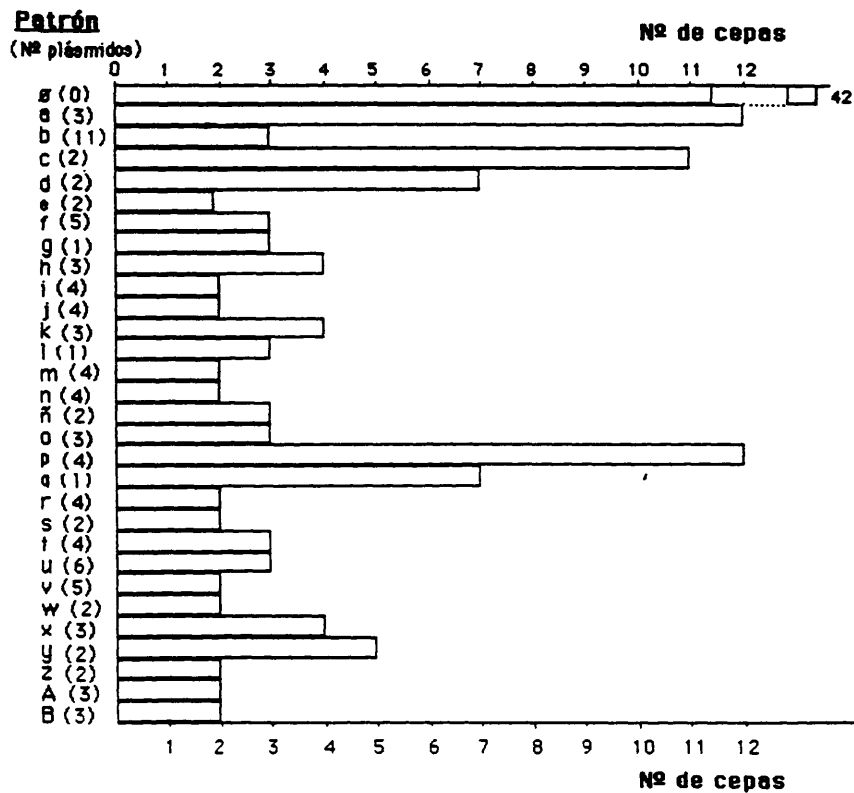
Figura 12 (continuación).



d) Frecuencia de los patrones plasmídicos.

Como se ha mencionado anteriormente, la gran variabilidad de patrones plasmídicos encontrados que se repiten al menos dos veces, hace que la frecuencia de dichos patrones sea baja, como se puede comprobar en la figura 13.

Figura 13.-Frecuencia de los patrones plasmídicos.



El patrón "a", de tres plásmidos de tamaño intermedio, y el patrón "p", de cuatro plásmidos (dos pequeños y dos intermedios), son los patrones que con mayor frecuencia aparecen, encontrándose en doce cepas, seguidos por el patrón "c", con dos plásmidos de bajo peso molecular, que aparece en once aislados.

Si dividimos los patrones plasmídicos en largos (con más de seis plásmidos), intermedios (de tres a cinco plásmidos) y cortos (con uno o dos plásmidos), podemos observar (tabla 34) que los patrones intermedios son los más frecuentes (45%), seguidos por los patrones cortos (30.2%). Los patrones largos tienen una baja frecuencia de aparición (4%).

Tabla 34.- Frecuencia de patrones según su categoría.

		Patrones plasmídicos (nº plásmidos)						
Cepas sin plásmidos	Cepas con plásmidos	6*	5+	4+	3+	2±	1±	Total
42 (20.8%)	160	8 (4%)	12	34 (45%)	45	42 (30.2%)	19	202

- * patrón largo
- + patrón intermedio
- ± patrón corto

4.2.7.- Antibiogramas: sensibilidad a los distintos antibióticos probados.

Los resultados de sensibilidad obtenidos se indican en la tabla 35.

TABLA 35.- Sensibilidad antimicrobiana de los estafilococos coagulasa negativos.

<u>Antibiótico</u>	<u>Sensible(%)</u>	<u>Intermedio (%)</u>	<u>Resistente (%)</u>
- Amoxicilina/ Ácido clavulánico (Aug)	143 (70.8)	0	59 (29.2)
- Ampicilina (Am)	35 (17.3)	0	167 (82.7)
- Cefamandol (Cfm)	79 (39.1)	0	123 (60.9)
- Cefazolina (Cfz)	79 (39.1)	0	123 (60.9)
- Cefotaxima (Cft)	79 (39.1)	0	123 (60.9)
- Cefuroxima (Crm)	79 (39.1)	0	123 (60.9)
- Ceftriaxona (Cax)	79 (39.1)	0	123 (60.9)
- Cloranfenicol (C)	135 (66.8)	0	67 (33.2)
- Clindamicina (Cd)	89 (44)	4 (2)	109 (54)
- Eritromicina (E)	91 (45)	6 (3)	105 (52)
- Gentamicina (Gm)	88 (43.6)	7 (3.5)	107 (53)
- Imipenem (Im)	137 (67.8)	7 (3.5)	58 (28.7)
- Nitrofurantoina (Fd)	195 (96.5)	0	7 (3.5)
- Norfloxacin (Nxn)	191 (94.5)	0	11 (5.4)
- Oxacilina (Ox)	79 (39.1)	0	123 (60.9)
- Penicilina (P)	35 (17.3)	0	167 (82.7)
- Rifampicina (Rif)	182 (90.1)	0	20 (9.9)
- Sulfametoxazol (Sx)	169 (83.7)	0	33 (16.3)
- Tetraciclina (Te)	126 (62.4)	2 (1)	74 (36.6)
- Trimetoprim (T)	125 (61.9)	0	77 (38.1)
- Trimetoprim/ sulfametoxazol (T/S)	190 (94.05)	0	12 (5.95)
- Vancomicina (Va)	202 (100)	0	0

Como era de esperar, dado que los estafilococos coagulasa negativos son sensibles a la vancomicina, la sensibilidad resultó ser del cien por cien. En cuanto a la resistencia a la meticilina, se encontró un 60.9% de cepas resistentes, cuando se utilizó como criterio la sensibilidad a la oxacilina. Ello implica, como es sabido, la resistencia a todas las cefalosporinas, aunque, siguiendo estrictamente los criterios de sensibilidad y resistencia de la NCCLS, algunos resultados pueden ser discrepantes.

La sensibilidad a la penicilina fue baja (17.3%) y la actividad de la eritromicina y clindamicina fue del 45% y del 44% respectivamente.

La nitrofurantoina es el antimicrobiano cuya actividad frente a los estafilococos coagulasa negativos ha sido más alta (96.5%), después de la vancomicina y seguida por la quinolona norfloxacina, también con una excelente actividad (94.5%), y por la rifampicina, con un 90.1% de cepas sensibles.

El sulfametoxazol tuvo buena actividad: el 83.7% de las cepas fueron sensibles. Cuando se combinó esta sulfamida con el trimetoprim, la actividad se elevó ligeramente a un 94.05%. El trimetoprim utilizado solo nos dió una proporción de cepas sensibles del 61.9%.

La resistencia a la tetraciclina fue del 36.6% y la del cloranfenicol del 33.2%. La resistencia hacia la gentamicina fue mayor y se obtuvo un 53% de cepas resistentes a este antibiótico.

La sensibilidad a los beta lactámicos fue del 70.8% para la amoxicilina/ácido clavulánico, del 17.3% para la ampicilina y del 67.8% para el imipenem.

Se han podido establecer 35 patrones de antibióticos que se repiten al menos dos veces entre los diferentes aislados. Dichos patrones y sus frecuencias se pueden ver en la siguiente tabla (tabla 36).

TABLA 36.- Frecuencia y patrones de antibióticos.

<u>Patrones (resistencias)</u>	<u>Nº cepas (%)</u>
(1) Sensibles a todos los antimicrobianos.....	20 (9.9)
(2) Am, P, Te.....	13 (6.4)
(3) Am, P.....	10 (4.9)
(4) Am, cefalosporinas, Cd, E, Gm, Ox, P.....	6 (3)
(5) Aug, Am, cefalosporinas, C, Cd, E, Gm, Im, Ox, P, Te.....	6 (3)
(6) Aug, Am, cefalosporinas, Cd, E, Gm, Im, Ox, P, Sx, Te.....	5 (2.5)
(7) T.....	5 (2.5)
(8) Aug, Am, cefalosporinas, C, Cd, E, Gm, Im, Ox, P, T.....	5 (2.5)
(9) Am, cefalosporinas, Gm, Ox, P, T.....	4 (2)
(10) Am, cefalosporinas, C, Cd, E, Gm, Ox, P.....	4 (2)
(11) Am, cefalosporinas, Cd, E, Ox, P, Te.....	4 (2)
(12) Am, cefalosporinas, C, Cd, E, Gm, Ox, P, Te, T.....	4 (2)
(13) Am, cefalosporinas, Cd, E, Gm, Ox, P, Te, T.....	4 (2)
(14) Aug, Am, cefalosporinas, Cd, E, Gm, Im, Ox, P, Te, T.....	3 (1.5)
(15) Am, cefalosporinas, C, Cd, E, Gm, Im, Ox, P, T.....	3 (1.5)
(16) Aug, Am, cefalosporinas, C, Cd, E, Gm, Im, Ox, P.....	3 (1.5)
(17) Te.....	3 (1.5)
(18) Am, C, P, Rif.....	3 (1.5)
(19) Aug, Am, cefalosporinas, Cd, E, Gm, Im, Nxn, Ox, P, Te, T.....	2 (1)
(20) Am, cefalosporinas, C, Cd, E, Gm, Im, Ox, P, Te.....	2 (1)
(21) Am, Cd, E, Gm, P, T.....	2 (1)
(22) Am, cefalosporinas, C, Cd, E, Gm, Ox, P, T.....	2 (1)
(23) Am, cefalosporinas, Cd, E, Gm, Ox, P, T.....	2 (1)
(24) Aug, Am, cefalosporinas, Cd, Im, Ox, P.....	2 (1)
(25) Am, cefalosporinas, C, Cd, E, Gm, Ox, P, Sx, T, T/S.....	2 (1)
(26) Am, cefalosporinas, C, E, Gm, Ox, P, Rif, T.....	2 (1)
(27) Aug, Am, cefalosporinas, Cd, Gm, Im, Ox, P, Rif.....	2 (1)
(28) Aug, Am, cefalosporinas, Cd, Gm, Im, Ox, P, Sx.....	2 (1)
(29) Resistentes a todos los antimicrobianos.....	2 (1)
(30) Aug, Am, cefalosporinas, Cd, E, Gm, Im, Ox, P, Sx, T, T/S.....	2 (1)
(31) Aug, Am, cefalosporinas, Gm, Im, Ox, P, Sx, Te, T, T/S.....	2 (1)

(32) Aug, Am, cefalosporinas, C, E, Ox, P, Te, T.....	2 (1)
(33) Am, P, T.....	2 (1)
(34) Am, cefalosporinas, C, Cd, E, Gm, Ox, P.....	2 (1)
(35) Aug, Am, cefalosporinas, Cd, E, Gm, Im, Ox, P.....	2 (1)
Otros patrones.....	63 (31.2)

4.2.8.- Estudio del factor de virulencia "slime".

Las dos pruebas utilizadas para la detección del "slime" dieron diferentes resultados. Utilizando el test de adherencia propuesto por Christensen y sus colaboradores (1982), el 74.3% de las cepas resultaron ser productoras de "slime", mientras que con el método de aglutinación en porta con concavalina A (Ludwicka y cols., 1984b) sólo el 42.1% de las cepas reaccionaron con la concavalina A al 1%. Ahora bien, el número de cepas positivas aumenta cuando se emplea la concavalina A a una concentración mayor de la descrita originalmente, elevando la proporción a un 57.9% (tabla 37).

TABLA 37.- Frecuencia de cepas productoras de "slime".

Técnica	Número de cepas positivas (%)				Nº cepas negativas (%)
	3+	2+	1+	Total	
Test de adherencia	46 (22.8)	59 (29.2)	45 (22.3)	150	52 (25.7)
Reactividad con Concavalina A	Pura		17 (8.4)	117	85 (42.1)
	1 %		24 (11.9)	85	117 (57.9)

Observando los resultados obtenidos mediante las dos técnicas, vemos que con el test de adherencia en tubo obtenemos un número más elevado de cepas positivas para la producción de "slime" que en el caso de la aglutinación específica en porta con la concavalina A. Además no existe concordancia en los resultados negativos, puesto que no todas las 52 cepas "slime" negativas con safranina están incluidas en las 117 también "slime" negativas que se obtienen al realizar la aglutinación con la mencionada lectina.

4.2.9.- Estudio comparativo de los diferentes marcadores epidemiológicos utilizados

Si establecemos una escala de categorías de los marcadores epidemiológicos utilizados, considerando la fagotipia como el principal marcador, seguido de la fagotipia inversa, plasmidotipia, antibiotipia y producción de "slime", podemos separar los aislados de los pacientes en diferentes apartados. Así tendríamos:

1º) Aislados caracterizados por la fagotipia directa tras el tratamiento térmico.

El número de cepas tipificadas al aplicar ambos juegos de fagos al 1000 RTD sobre las cepas crecidas en baño a 48°C durante fue de 113 (55.9%).

Los aislados caracterizados por esta fagotipia pueden ser divididos en iguales o diferentes, si el patrón fágico obtenido es el mismo o distinto (tabla 38, A y B).

TABLA 38.- Aislados caracterizados por fagotipia directa.

(A) Iguales por fagotipia directa

<u>Paciente</u>	<u>Origen</u>	<u>Especie</u>	<u>Patrón de fagotipia</u>	
3	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	V:155, 456, B1, R6, A9C, 90502, 90509
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	V:155, 456, B1, R6, A9C, 90502, 90509
4	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	G:27, 48, 90502
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	G:27, 48, 90502
5	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	A:27
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	A:27
6	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	N:37
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	N:37
7	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	M:27, 82, 456, 459, 471A, B1
	d	catéter	<i>S. epidermidis</i>	M:27, 82, 456, 459, 471A, B1
8	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	D:15,27,48,82,155,275,275A,456,459, 471A,A6C,B1,A9C+ autóctonos
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	"
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	"
11	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	A:27
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	A:27
12	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	E:27,37,82,275,456,459,471A,A6C,A9C,90502
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	E:27,37,82,275,456,459,471A,A6C,A9C,90502
13	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	U:27, 82, 456, 471A, B1, 90502
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	U:27, 82, 456, 471A, B1, 90502
18	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	F:27,456,459,471A,A6C,R6, 90338, 90502, 43783
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	F:27,456,459,471A,A6C,R6, 90338, 90502, 43783
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	F:27,456,459,471A,A6C,R6, 90338, 90502, 43783
	d	catéter	<i>S. epidermidis</i>	F:27,456,459,471A,A6C,R6, 90338, 90502, 43783
19	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	T:27, 456, 459, 471A, A6C, 90502
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	T:27, 456, 459, 471A, A6C, 90502

61	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	B:37, 71, RG
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	B:37, 71, RG
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	B:37, 71, RG
62	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	C:90502
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	C:90502
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	C:90502
63	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	L:27, 48, 456, 471A, A6C, 90502
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	L:27, 48, 456, 471A, A6C, 90502
70	a	catéter	<i>S. hominis</i>	B:37, 71, RG
	b	catéter	<i>S. hominis</i>	B:37, 71, RG
78	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	A:27
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	A:27

Los cuatro aislados del paciente 7 son *S. epidermidis*. Los resultados de fagotipia indican que los aislados "c" y "d" son iguales entre sí y diferentes al "a" y "b" aunque de estos por no ser tipificables no podemos decir que sean iguales.

(B) Diferentes por fagotipia directa

<u>Paciente</u>	<u>Origen</u>	<u>Especie</u>	<u>Patrón de fagotipia</u>	
20	a	cateter	<i>S. epidermidis</i>	I:27, 456, A6C, B 1
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	I:27, 456, A6C, B 1
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	I:27, 456, A6C, B 1
	d	catéter	<i>S. epidermidis</i>	27, RG
	e	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	f	cateter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	g	catéter	<i>S. epidermidis</i>	P:27, 82
21	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	P:27, 82
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	28, 28A, 90352, 43763, 43764, 43765
22	a	cateter	<i>S. epidermidis</i>	B:37, 71, RG
	b	cateter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
23	a	cateter	<i>S. epidermidis</i>	B:37, 71, RG
	b	cateter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable

25	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	patrón largo de 13 reacciones
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
26	a	catéter	<i>S. hominis</i>	C:90502
	b	catéter	<i>S. hominis</i>	No tipificable
27	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	27, 82, 275A, 471A
29	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	Q:456
30	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	J:27, 456, 459, A6C
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
31	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	471A, A6C, A9C, 90338
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	Patrón largo de 15 reacciones
	d	catéter	<i>S. epidermidis</i>	K:90338
32	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	J:27, 456, 459, A6C
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
33	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	48
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	82, 456, 471A, 90509
35	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	155, R6, 90502, 43764
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	J:27, 456, 459, A6C
36	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	A:27
	c	sangre	<i>S. epidermidis</i>	A:27
37	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	157A
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	c	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	d	sangre	<i>S. epidermidis</i>	M:27, 82, 456, 459, 471A, B1
38	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	G:27, 48, 90502
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	456, 456, A6C, 90502
39	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	L.C.R.	<i>S. epidermidis</i>	G:27, 48, 90502
40	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	27, 37, R6, 90502

41	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	27, 28A, 71, RG, 90502
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
42	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	N:37
	d	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
43	a	catéter	<i>S. haemolyticus</i>	A6C
	b	catéter	<i>S. haemolyticus</i>	No tipificable
44	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	82, 155, 456, B1
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
45	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	Patrón largo de 10 reacciones
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	K:90338
46	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	D:15,27,48,82,155,275,275A,456,459,471A, A6C,B1,A9C + autóctonos
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	Patrón largo de 16 reacciones
47	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	27, 28, 90338
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	K:90338
48	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	A:27
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
49	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	D:15,27,48,82,155,275,275A,456,459,471A, A6C,B1,A9C + autóctonos
50	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	S:90338, 43785
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	89954
54	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	c	sangre	<i>S. epidermidis</i>	89904
55	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	15, 90352, 90502
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	Q:456
56	a	sangre	<i>S. capitis</i>	27, 37, 71, 275A, 90319
	b	sangre	<i>S. capitis</i>	27, 37, 48, 82, 459, B1
58	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	E:27,37,82,275,456,459,471A,A6C,A9C,90502
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable

59	a	?	<i>S. epidermidis</i>	Patrón largo de 17 reacciones
	b	?	<i>S. epidermidis</i>	Patrón largo de 21 reacciones
60	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	O:27, 90352
	c	sangre	<i>S. epidermidis</i>	O:27, 90352
	d	sangre	<i>S. epidermidis</i>	O:27, 90352

Mediante esta fagotipia hemos podido establecer la similitud entre las cepas de cada uno de los pacientes. Así conseguimos caracterizar 153 aislados, pertenecientes a 57 pacientes, iguales o distintos dentro de un mismo enfermo.

2º) Aislados que no se tipifican por la fagotipia anterior y que son caracterizados por la fagotipia inversa.

Sobre las 49 cepas de 21 pacientes no tipificadas por la fagotipia tras el tratamiento térmico, se hizo la fagotipia inversa. Con este marcador conseguimos caracterizar 22 aislados pertenecientes a 10 enfermos: 8 aislados de 4 pacientes eran iguales dentro de un mismo enfermo y 14 de 6 pacientes eran distintos.

Los aislados caracterizados por esta fagotipia pueden también ser divididos en iguales o diferentes atendiendo al patrón obtenido (tabla 39, A y B).

TABLA 39.-Aislados caracterizados por fagotipia inversa.

(A) Iguales por fagotipia inversa.

<u>Paciente</u>	<u>Origen</u>	<u>Especie</u>	<u>Patrón de fagotipia inversa</u>	
10	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	V:459
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	V:459
14	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	IV:71
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	IV:71
15	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	IV:71
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	IV:71
16	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	VIII:71, W57, 18042
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	VIII:71, W57, 18042

(B) Diferentes por fagotipia inversa.

<u>Paciente</u>	<u>Origen</u>	<u>Especie</u>	<u>Patrón de fagotipia inversa</u>	
57	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	I:W57
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	c	sangre	<i>S. epidermidis</i>	II:W57, 18042
65	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	I:W57
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	XIII:2009, 1030, W57, 18042
67	a	piel	<i>S. epidermidis</i>	IX:48
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
68	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	IV:71
69	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	IV:71
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	II:W57, 18042

3º) Aislados no tipificables por ambas fagotipias y caracterizadas por el perfil plasmídico.

Las dos fagotipias anteriores nos han permitido establecer diferencias y similitudes en 175 cepas (86.6%) pertenecientes a 67 pacientes. De los 27 aislados restantes, tras ser sometidos al análisis plasmídico, se caracterizaron 23 cepas de 9 enfermos.

Lo mismo que en los casos anteriores, los aislados pueden ser divididos en iguales y diferentes por este marcador (tabla 40, A y B).

TABLA 40.- Aislados caracterizados por el perfil plasmídico.

(A) Iguales por el perfil plasmídico.

<u>Paciente</u>	<u>Origen</u>	<u>Especie</u>	<u>Patrón plasmídico</u>	
1	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	Patrón C
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	Patrón C
17	a	sangre	<i>S. haemolyticus</i>	Patrón y
	b	sangre	<i>S. haemolyticus</i>	Patrón y
	c	sangre	<i>S. haemolyticus</i>	Patrón y
	d	sangre	<i>S. haemolyticus</i>	Patrón y
	e	sangre	<i>S. haemolyticus</i>	Patrón y

(B) Diferentes por el perfil plasmídico

<u>Paciente</u>	<u>Origen</u>	<u>Especie</u>	<u>Patrón plasmídico</u>	
71	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	Patrón corto de 2 plásmidos
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	Patrón corto de 1 plásmido
73	a	catéter	<i>S. haemolyticus</i>	Patrón corto de 2 plásmidos
	b	catéter	<i>S. haemolyticus</i>	■
74	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	■
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	Patrón Q
75	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	Patrón intermedio de 4 plásmidos
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	Patrón intermedio de 3 plásmidos
77	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	■
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	Patrón p

49) Aislados no tipificables por las dos fagotipias ni por la plasmidotipia (pues carecen de plásmidos) y caracterizados por el antibiograma y por la producción de "slime".

Los cuatro aislados que quedan sin caracterizar pertenecientes a dos enfermos han podido serlo por el antibiograma obtenido y por los resultados de la producción de "slime" ((tabla 41).

TABLA 41.- Aislados caracterizados por el antibiograma y por el "slime".

<u>Paciente</u>	<u>Origen</u>	<u>Especie</u>	<u>Antibiograma</u>	<u>"Slime"</u>	
2	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	1: S a todos los antibióticos	1+
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	1: S a todos los antibióticos	1+
9	a	sangre	<i>S. hominis</i>	Patrón 30	2+
	b	sangre	<i>S. hominis</i>	Patrón 30	2+

La antibiotipia y la producción de "slime" como marcadores epidemiológicos nos sirven para confirmar la igualdad o desigualdad de las cepas establecida por los otros marcadores anteriormente empleados.

5º) Aislados caracterizados por los marcadores anteriormente empleados en los que había más de una especie implicada.

Se han podido diferenciar mediante la biotipia los aislados pertenecientes a 10 enfermos (tabla 42, A,B y C).

TABLA 42.- Aislados caracterizados por biotipia.

(A) Diferentes por fagotipia del calor.

<u>Paciente</u>	<u>Origen</u>	<u>Especie</u>	<u>Patrón de fagotipia</u>
66	a	catéter	<i>S. haemolyticus</i> E:27,37,82,275,456,459,471A,A6C,A9C,90502
	b	sangre	<i>S. haemolyticus</i> E:27,37,82,275,456,459,471A,A6C,A9C,90502
	c	sangre	<i>S. epidermidis</i> F:27,456,459,471A,A6C,RG, 90338, 90502, 43783
24	a	catéter	<i>S. epidermidis</i> 27,155,275,456,471A,A6C,RG,89954
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i> 27, 456, A6C, RG
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i> 27,48,71,90319,90338,90340,90341,90502,90509
	d	catéter	<i>S. hominis</i> 43785
28	a	catéter	<i>S. hominis</i> No tipificable
	b	catéter	<i>S. hominis</i> 15
	c	catéter	<i>S. epidermidis</i> C:90502
	d	catéter	<i>S. epidermidis</i> C:90502
	e	catéter	<i>S. epidermidis</i> C:90502
34	a	cateter	<i>S. epidermidis</i> R:89904, 89954
	b	cateter	<i>S. epidermidis</i> R:89904, 89954
	c	catéter	<i>S. hominis</i> L:27, 48, 456, 471A, A6C, 90502

51	a	catéter	<i>S. hominis</i>	S:90338, 43785
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	c	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	d	catéter	<i>S. haemolyticus</i>	A:27
52	a	sangre	<i>S. epidermidis</i>	27, A6C
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	No tipificable
	c	sangre	<i>S. simulans</i>	No tipificable
53	a	sangre	<i>S. hominis</i>	No tipificable
	b	sangre	<i>S. hominis</i>	No tipificable
	c	sangre	<i>S. epidermidis</i>	H:27, 89904, 90502
	d	sangre	<i>S. epidermidis</i>	H:27, 89904, 90502
	e	catéter	<i>S. epidermidis</i>	H:27, 89904, 90502
	f	sangre	<i>S. epidermidis</i>	H:27, 89904, 90502

(B) No tipificables por fagotipia del calor y diferenciadas por la fagotipia inversa.

Paciente Origen Especie Patrón de fagotipia inversa

64	a	catéter	<i>S. haemolyticus</i>	No tipificable
	b	catéter	<i>S. epidermidis</i>	VI:2009, W57
	c	catéter	<i>S. haemolyticus</i>	No tipificable

(C) No tipificables por ambas fagotipias y diferentes por el perfil plasmídico.

Paciente Origen Especie Patrón plasmídico

72	a	catéter	<i>S. epidermidis</i>	■
	b	catéter	<i>S. hominis</i>	Patrón h
	c	catéter	<i>S. hominis</i>	■
	d	catéter	<i>S. epidermidis</i>	■
76	a	sangre	<i>S. haemolyticus</i>	Patrón corto de 2 plásmidos
	b	sangre	<i>S. epidermidis</i>	Patrón intermedio de 3 plásmidos

En la tabla 42 (A,B,C) podemos resaltar la presencia de aislados pertenecientes a un mismo enfermo que podrían ser los responsables de una infección al coincidir en ellos los resultados obtenidos en los cinco marcadores epidemiológicos del estudio. Esto ocurre en los pacientes 66 (a y b), 28 (c, d y e), 34 (a y b) y 64 (a y b) donde las cepas señaladas al ser iguales según los marcadores empleados, podrían ser causa de infección.

En el resto de los pacientes, los aislados son distintos por uno u otro marcador. Así, las cepas "b" y "c" del enfermo 51 difieren por los antibiogramas obtenidos y por los resultados de la producción de "slime". Lo mismo sucede con los aislados "a" y "d" del paciente 72.

Los cinco marcadores epidemiológicos utilizados en conjunto nos permiten averiguar si dos o más aislados pertenecientes a un mismo paciente son o no son iguales y afirmar si están produciendo una infección o, por el contrario, si son simples contaminantes. Veamos algunos casos particulares (tabla 43).

TABLA 43.- Caracterización por todos los marcadores (ejemplos).

Paciente	Origen	Especie	Fagotipia	F inversa	Plasmidotipia	Antibiopatia	"Slime"
35 a	sangre	<i>S. epider.</i>	p. inter.(4)	I	p. indeter.(5)	35	-
b	sangre	<i>S. epider.</i>	J	NT	ñ	p. corto	-
69 a	sangre	<i>S. epider.</i>	NT	IV	p. inter.(3)	14	2+
b	sangre	<i>S. epider.</i>	NT	II	c	15	-
11 a	sangre	<i>S. epider.</i>	A	III	s	31	2+
b	sangre	<i>S. epider.</i>	A	III	s	31	2+
18 a	sangre	<i>S. epider.</i>	F	II	x	9	3+
b	catéter	<i>S. epider.</i>	F	II	x	9	3+
c	catéter	<i>S. epider.</i>	F	II	x (- 2.1 Kb)	9 (S a T)	3+
d	catéter	<i>S. epider.</i>	F	I	x	9	3+

19	a	sangre	<i>S. epider.</i>	T	VIII	p+1 (25Kb)	4 (R a l m)	3+
	b	sangre	<i>S. epider.</i>	T	VIII	p	4	3+
78	a	sangre	<i>S. epider.</i>	A	III	r	p. largo	3+
	b	sangre	<i>S. epider.</i>	A	III	r	p. largo	-
7	a	catéter	<i>S. epider.</i>	NT	I	m	4	1+
	b	catéter	<i>S. epider.</i>	NT	I	m	4	1+
	c	catéter	<i>S. epider.</i>	M	I	A	2	3+
	d	catéter	<i>S. epider.</i>	M	I	A	2	3+

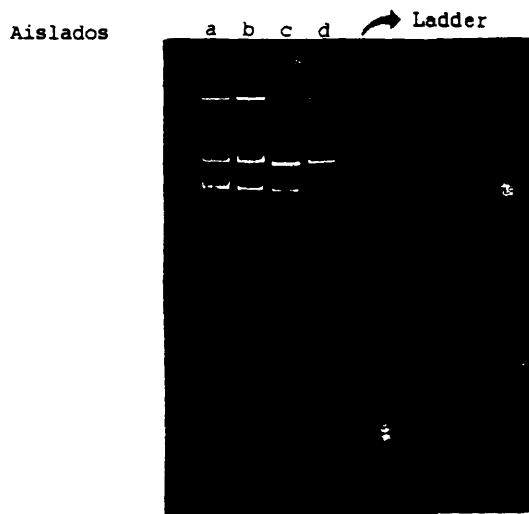
El perfil plasmídico del DNA de los cultivos procedentes del paciente 35 es diferente, como era de esperar, dadas las diferencias en la susceptibilidad a los antibióticos y en la fagotipia.

Si bien los cultivos 69a y 69b tienen el mismo biotipo y no son fagotipificables, la fagotipia inversa y sus perfiles plasmídicos son diferentes. Esto nos indica una desigualdad que concuerda con sus diferencias en la susceptibilidad hacia varios antibióticos y en la producción de "slime".

En el paciente 11, todos los marcadores probados concuerdan en sus resultados, por lo que puede afirmarse que son idénticos.

Los cuatro aislados del paciente 18 también se puede decir que son iguales. La ausencia de un plásmido de bajo peso molecular en el aislado 18c y una diferencia de sensibilidad al trimetoprim no son significativas (figura 14). En el paciente 19 se observa una situación similar.

Figura 14.- Perfil plasmídico del paciente 18.



En el paciente 78, el perfil plasmídico es idéntico en los dos aislados. La susceptibilidad de dichos aislados a los 32 fagos prueba su identidad. También lo hace la biotipia (los dos aislados fueron identificados como *S. epidermidis*) y la producción de "slime". Estos parámetros son significativos a pesar de sus diferencias en la susceptibilidad a los antibióticos. Basándonos sólo en las diferencias fenotípicas hacia los antibióticos, diríamos que estos dos cultivos son cepas diferentes.

En el paciente 7 hay dos grupos de cepas diferentes: por una parte se encuentran los aislados 7a y 7b, iguales entre sí, y por otra, las cepas 7c y 7d, también idénticas entre sí y diferentes a las primeras por todos los parámetros estudiados. En este caso no podemos saber cuál es la cepa que está produciendo infección y cual es la contaminante.

Por último, podemos resumir los resultados obtenidos en el estudio de las 202 cepas epidemiológicamente relacionadas desglosándolos desde tres puntos de vista. En primer lugar, el número de cepas tipificadas por cada uno de los marcadores aplicados; en segundo lugar, el número de cepas tipificadas al utilizar de forma consecutiva y encadenada los cinco marcadores epidemiológicos; finalmente, el número de cepas caracterizadas (tipificadas o no tipificadas) atendiendo a los resultados obtenidos dentro de cada paciente. Pasamos a desarrollar estos puntos de forma pormenorizada.

1) Proporción de cepas tipificadas cuando aplicamos los marcadores de forma independiente (tabla 44).

TABLA 44.- Proporción de las 202 cepas tipificadas por los distintos marcadores utilizados.

<u>Marcador epidemiológico</u>	<u>Nº cepas tipificadas (%)</u>
Fagotipia de 48°C.....	113 (55.9)
Fagotipia inversa.....	82 (40.6)
Plasmidotipia.....	160 (79.2)
Antibiotipia.....	202 (100)
Producción de "slime".....	117 (57.9)

2) Proporción de las 202 cepas tipificadas al utilizar de forma consecutiva y escalonada los cinco marcadores epidemiológicos (tabla 45).

TABLA 45.- Proporción de las 202 cepas tipificadas al aplicar los distintos marcadores de forma escalonada.

<u>Marcador epidemiológico</u>	<u>Nº cepas tipificadas / Total</u>	<u>% del total</u>	<u>% acumulado</u>
Fagotipia de 48°C.....	113/202 55.9	
Fagotipia inversa.....	33/89 16.3 72.2
Plasmidotipia.....	37/56 18.3 90.5
Antibiotipia			
+			
Producción "slime".....	19/19 9.4 100

Con la fagotipia tras el tratamiento térmico logramos caracterizar un 55.9% de las cepas, proporción que aumenta hasta el 72.2% cuando aplicamos la fagotipia inversa. Por medio de la plasmidotipia conseguimos que la proporción de tipabilidad sea de un 90.5% y de un 100% después de estudiar el antibiotipio y la producción de "slime".

3) Proporción de cepas en las que se han podido establecer igualdades y diferencias independientemente del resultado de la tipificación (tabla 46).

TABLA 46.- Proporción de aislados en los que se han podido establecer diferencias y similitudes.

<u>Marcador epidemiológico</u>	<u>Nº cepas *</u> <u>caracterizadas</u>	<u>Nº de</u> <u>pacientes</u>	<u>% del total</u>	<u>% acumulado</u>
Fagotipia de 48°C	153/202	57	75.7	
Fagotipia inversa	22/49	10	10.9	86.6
Plasmidotipia	23/27	9	11.4	98
Antibiotipia				
+				
Producción "slime"	4/4	2	2	100

* Este número se refiere a cepas pertenecientes a distintos enfermos independientemente de los resultados de tipificación.

La utilización de los cinco marcadores epidemiológicos de forma consecutiva nos permite establecer igualdades y diferencias entre los aislados. Así, cuando aplicamos la fagotipia tras el tratamiento térmico, conseguimos que 153 aislados (75.7%) pertenecientes a 57 enfermos sean caracterizados (iguales o distintos). Con la fagotipia inversa, caracterizamos 22 de los 49 aislados restantes. Mediante la plasmidotipia, logramos establecer semejanzas en el 11.4% de las cepas no caracterizadas por los marcadores anteriores, con lo que el porcentaje de cepas en las que se ha podido establecer diferencias y similitudes aumenta hasta un 98%. El 100% se consigue mediante el estudio de las resistencias a los antimicrobianos y la producción de "slime".

Como se puede observar en la siguiente tabla (tabla 47) hemos podido deducir la similitud de 58 cepas pertenecientes a 24

pacientes por medio de un marcador u otro, mientras que 144 aislados de 54 pacientes son diferentes entre sí. Adviertase que se trata de cepas iguales o distintas dentro de un mismo enfermo, no de cepas iguales o distintas entre un paciente y otro.

TABLA 47.- Número de cepas iguales y diferentes por los cinco marcadores epidemiológicos utilizados.

Marcador	AISLADOS					
	Igual			Diferente		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Fagotipia de 480C	39	(16)	19.3	114	(41)	56.4
Fagotipia inversa	8	(4)	4	14	(6)	6.9
Plasmidotipia	7	(2)	3.5	16	(7)	7.9
Antibiotipia + slime	4	(2)	2	0	(0)	0
TOTAL	58	(24)	28.8	144	(54)	71.2

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

5.1.- ESTUDIOS MULTICÉNTRICOS

5.1.1- AÑO 1986:

a) Fagotipia de *S. epidermidis*.

a.1.- Juego de fagos de "Dean and Williams".

La fagotipia de los estafilococos coagulasa negativos no está recogida en un juego de fagos admitido internacionalmente, aunque algunos Centros de Referencia de *S. aureus* ofrece este marcador. En la actualidad, los juegos de fagos usados o recomendados para los estafilococos coagulasa negativos son algunos de los fagos descritos por Verhoef (1972) y Dean (1973) o bien los fagos utilizados por Pulverer y sus colaboradores (1975, 1976).

El juego de fagos de Verhoef y Dean, también llamado de "Dean and Williams", tiene una baja proporción de tipabilidad: un 30% para cepas no seleccionadas de estafilococos coagulasa negativos y entre el 45 y el 50% para cepas de *S. epidermidis*. Este porcentaje aumenta a un 75% si las cepas son sometidas a un tratamiento térmico (Richardson y Marples, 1987). Una característica de este juego de fagos es la elevada frecuencia con la que se obtienen patrones de fagotipia largos, es decir, lisis de algunas cepas por seis o más fagos.

El juego de fagos de Pulverer es activo frente a cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*. La tipabilidad de estos fagos es buena: cerca del 72% de las cepas se tipifican al RTD, pero, debido al limitado número de patrones que se consiguen la discriminación no es satisfactoria (De Saxe y cols., 1981).

La fagotipia que se ha realizado en nuestro laboratorio con el juego de fagos de "Dean and Williams" muestra unos resultados acordes con los obtenidos por Richardson y Marples (1987). El

número de cepas tipificadas cuando aplicamos la fagotipia del calor es de 62.5%.

De Saxe y Notley (1978), utilizando el juego de fagos de "Dean and Williams" al 100 RTD, consiguieron un 57.6% de tipabilidad sobre cepas aisladas en Inglaterra. Con este mismo juego, pero utilizado al 1000 RTD, conseguimos que se tipificaran un 19.6% de las cepas españolas, aunque cuando aplicamos la fagotipia del calor la proporción de cepas tipificadas aumentó considerablemente (62.5%). Teniendo en cuenta el primer dato de fagotipia, podemos apreciar la marcada diferencia de este juego de fagos en cuanto a su efectividad para lisar cepas de diferentes regiones geográficas. De acuerdo con Schmidt y Jeffries (1975), debido a peculiaridades del sistema o del organismo (asociadas a menudo con localizaciones geográficas particulares), los sistemas de tipificación por fagotipia no son generalmente intercambiables. La estandarización de estos sistemas es más una excepción que la regla. La baja proporción de tipabilidad obtenida en Estados Unidos con los fagos de "Dean and Williams" (Talbot y Parisi, 1976; Blouse y cols., 1975) y las diferencias en las frecuencias de tipabilidad con cultivos de diferentes ciudades de Europa con los fagos de Pulverer apoyan esta conclusión.

a.2.- Juego de fagos autóctono.

Con el juego de fagos autóctono hemos obtenido un porcentaje de tipabilidad del 24.4% al hacer la fagotipia al 1000 RTD y del 36.3% cuando sometemos las cepas a un tratamiento térmico. Al comparar esta proporción de cepas tipificables con la obtenida con el juego de "Dean and Williams", notamos que no existe una marcada diferencia en la fagotipia al 1000 RTD, diferencia que sí se encuentra en la fagotipia del calor: hay una mayor proporción de cepas tipificadas con los fagos de "Dean and Williams". Esto, en principio, está en contra de la tesis formulada por Schmidt y Jeffries (1975), previamente expuesta. Parece que las cepas

españolas de este estudio son susceptibles de ser lisadas por los fagos de "Dean and Williams".

a.3.- Juego de fagos combinado.

El juego combinado es el más efectivo para aumentar la frecuencia de cepas tipificadas de *S. epidermidis*. La proporción de tipabilidad que hemos obtenido al aplicar los fagos al 1000 RTD y cuando hemos hecho la fagotipia tras el tratamiento térmico de las cepas, ha sido más elevada que con los dos anteriores juegos de fagos (70.2%). Las cepas se caracterizaban bien por los fagos de los dos juegos a la vez, bien por fagos de uno u otro juego independientemente.

Parece ser, pues, que una combinación de ambos o incluso la utilización de los dos juegos de fagos a la vez para caracterizar las cepas sería la solución idónea para aumentar el número de cepas tipificadas.

b) Técnicas de fagotipia.

En nuestro estudio, la técnica que ha caracterizado el mayor número de cepas ha sido la realizada con los fagos al 1000 RTD tras el tratamiento térmico, lo que es similar a otra experiencia con *S. aureus* (Vindel y cols., 1987). Se cree que esto es debido a la destrucción o rotura de las endonucleasas de restricción (endonucleasa y metilasa) lo que facilita la adsorción de los fagos (Lacey y cols., 1984). Lorian y sus colaboradores (1985), no obstante, consideran que el crecimiento a alta temperatura deprime la formación de la cápsula afectando a la susceptibilidad hacia los fagos. Sin embargo, Sompolinsky y sus colaboradores (1985) describieron cepas capsuladas tipificables y no tipificables lo que iría en desacuerdo con lo anteriormente expuesto, a no ser que las cepas capsuladas se tipifiquen debido a la existencia de poblaciones heterogéneas.



c) Patrones de fagotipia.

Tras dividir los patrones fágicos en cortos, intermedios y largos, de acuerdo con el criterio de Richardson y Marples (1987), hemos encontrado una gran proporción de patrones cortos en el juego de fagos de "Dean and Williams" (37.5%) a pesar de que la norma general es la obtención de patrones de fagotipia largos.

La gran cantidad de patrones encontrados nos permite afirmar que el poder discriminatorio del juego de fagos de "Dean and Williams" es alto (se encontraron 38 patrones diferentes), igual que sucede con el juego autóctono (32 patrones encontrados). Con éste último juego las frecuencias de patrones largos y cortos obtenidas fueron muy parecidas: 13.7% y 14.3% respectivamente.

En cuanto al juego de fagos combinado, los patrones cortos fueron los más frecuentes (31.5%) y se obtuvieron 66 patrones fágicos diferentes.

Generalizando, podemos decir que los patrones cortos de una o dos reacciones son los más frecuentes en los tres tipos de juegos y que la gran variabilidad de patrones obtenidos indican un alto poder discriminatorio. Sin embargo, sería más deseable una gran frecuencia de tipabilidad y un menor poder discriminatorio para poder agrupar las cepas que estén epidemiológicamente relacionadas.

En cualquier caso, si tenemos en cuenta la regla de "las dos fuertes diferencias" propuesta por el subcomité de fagotipia de *Staphylococcus* (Blair y Williams, 1961), según la cual dos cultivos son diferentes por fagotipia sólo si uno es lisado fuertemente por dos fagos que no producen lisis sobre el otro en cualquier grado, el número de patrones fágicos obtenidos se podría disminuir con lo que la discriminación conseguida sería menor y la posibilidad de establecer relaciones epidemiológicas entre aislados aumentaría.

d) Potencia de los fagos (frecuencia de reacción)

Dentro del juego de fagos de "Dean and Williams", el fago que mostraba una mayor frecuencia de reacción con las diferentes cepas fue el 37, seguido del 456, con una reactividad del 30.9% y del 28% respectivamente. El fago 43785 es el más potente (26.2%) de los fagos del juego autóctono seguido por el 43763 de nuestro juego (22%).

La razón por la que un fago tiene una mayor potencia que otro no es bien conocida. Probablemente sea debido a características de las cepas cambiantes: por una disposición especial del sitio receptor del bacteriófago en la cepa, bien por la naturaleza química del mismo o por alteraciones en el contenido lipídico de la pared celular, la adsorción de los fagos difiera de una cepa a otra y consiguientemente se obtenga una frecuencia de reacción cuyo valor varía de un fago a otro.

5.1.2.- AÑO 1990:

En este segundo estudio multicéntrico la fagotipia se realizó sobre las 188 cepas de estafilococos coagulasa negativos recibidas en nuestro laboratorio. La técnica empleada fue la fagotipia tras el tratamiento térmico y se aplicaron ambos juegos de fagos (32 fagos), esperando de esta forma que el número de cepas caracterizadas aumentara con respecto al anterior estudio.

El número total de cepas tipificadas fue bajo (25.1%) en contra de lo que se esperaba. No existe ninguna razón para explicar este hecho. Lacey y sus colaboradores (1984) interpretan la pérdida de tipabilidad de las cepas por tres tipos de mecanismos:

- fallos en la adsorción del fago a la pared
- actuación de las endonucleasas de restricción de la cepa
- inmunidad lisogénica.

Parece ser que los fallos en la adsorción del fago no se producen normalmente "in vivo", lo cual permite, en nuestro caso

desestimar este mecanismo. Las endonucleasas de restricción parecen eliminarse por tratamiento térmico (como hemos podido comprobar, este tratamiento resultó totalmente eficaz en el anterior estudio). En cualquier caso, no podemos saber si es la inmunidad lisogénica o una incompleta destrucción de las endonucleasas de restricción la explicación posible a la alta frecuencia de cepas no tipificables de estafilococos coagulasa negativos que hemos encontrado. Es posible que la baja proporción de tipabilidad de las cepas de este segundo estudio multicéntrico se deba a la adquisición de varios plásmidos de resistencia, los cuales, del mismo modo que los profagos, pueden prevenir la lisis por los fagos (Rosdahl y cols., 1990). Lógicamente las cepas que circulan en el ambiente hospitalario no siempre son las mismas, lo que puede influir en los resultados finales de tipificación.

Si, en este caso, el estudio hubiera consistido en la localización de una fuente de infección o un brote nosocomial, tendríamos que haber intentado una ampliación del juego de fagos (inducción de nuevos fagos) o bien la aplicación de otros marcadores alternativos.

a) Patrones de fagotipia.

Considerando como un único juego de fagos los 32 empleados (20 del juego de "Dean and Williams" y 12 autóctonos) y dividiendo, como en el estudio anterior, los patrones en cortos intermedios y largos, se consiguió una mayor proporción de patrones cortos (12.8%). En cuanto a la gran variabilidad de patrones encontrados (32 patrones diferentes), como en los casos anteriores, indica un alto poder discriminatorio que se vería disminuido si tuviéramos en cuenta la regla de "las dos fuertes diferencias" previamente mencionada.

b) Potencia de los fagos.

El fago que tiene una mayor frecuencia de reacción sobre las cepas es el fago autóctono 90509 (12.3%), seguido del 471A y el 456 con un 10.4% y un 9.9% de actividad respectivamente.

Si comparamos estos resultados con los del primer estudio multicéntrico, observamos que existe coincidencia en cuanto al fago 456, pues su proporción de tipabilidad es alta en los dos casos. Sin embargo el fago 37, que en el primer estudio tiene una alta potencia (30.9%), en este último la posee baja (2.8%). Lo mismo ocurre con los fagos 43763 y 43785, cuya potencia es baja comparada con la obtenida en el año 1985. El fago 90509, sin embargo, no tiene esas diferencias tan acentuadas en cuanto a la frecuencia de reacción en el primer y segundo estudio: 18.4% de reactividad frente a un 12.3%. Esto quizás sea debido, como anteriormente se ha mencionado, a las características especiales de la pared celular de las cepas o del sitio receptor del bacteriófago.

5.1.3.- COMPARACIÓN DE AMBOS ESTUDIOS MULTICÉNTRICOS

Cuando comparamos los resultados obtenidos por los dos estudios multicéntricos, apreciamos que la especie predominantemente aislada, tanto en un estudio como en otro, es *S. epidermidis*. Por otro lado, *S. capitis*, *S. warneri* y *S. simulans* mantienen sus frecuencias de aislamiento, mientras que *S. hominis* y *S. xylosus* suben en el segundo estudio multicéntrico y *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* bajan. Esto puede ser debido a la preponderancia de *S. epidermidis* en la piel y a que posee ciertos factores de virulencia ausentes en otros estafilococos coagulasa negativos.

En cuanto al origen de los aislados, en ambos estudios multicéntricos, predominan los de sangre y los aislados de orina ocupan un puesto destacado.

Las cepas de estafilococos coagulasa negativos del primer estudio multicéntrico proceden principalmente del servicio de medicina interna (14.6%) y las del estudio de 1990 de la unidad de cuidados intensivos (12.8%).

Por último hemos intentado ver si se mantienen algunos patrones de fagotipia en determinadas unidades médicas o zonas geográficas. En este sentido, no hemos encontrado relación alguna entre la distribución por fagotipos de las especies de estafilococos coagulasa negativos y el origen de la muestra o el servicio médico.

5.2.- ESTUDIO SOBRE CEPAS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS EPIDEMIOLÓGICAMENTE RELACIONADAS.

a) Fagotipia.

El número de cepas tipificadas al aplicar ambos juegos de fagos al 1000 RTD sobre las 202 cepas de estafilococos coagulasa negativos crecidas en baño a 48°C durante cuatro horas fue de 113 (55.94%). Esta cantidad se asemeja más a los resultados obtenidos en el estudio sobre las cepas del año 1986 con el juego combinado (70.2%).

La utilización de este marcador para establecer igualdades y diferencias entre aislados pertenecientes a distintos enfermos, independientemente de que hayan sido tipificados, o no, nos ha permitido caracterizar a 153 aislados (75.7%) de 57 pacientes.

En cuanto al número de patrones hallados, son muy numerosos y pocas cepas coinciden en un mismo patrón. Se han conseguido 53 patrones diferentes, cantidad parecida a la que obtuvimos en el primer estudio cuando aplicamos la fagotipia del calor con el juego de fagos combinado al 1000 RTD (66 patrones).

Por otra parte, los patrones cortos también tienen, en este caso, una alta frecuencia de aparición (21.3%), igual que sucedía con los tres juegos de fagos en el primer estudio multicéntrico y

con el juego de 32 fagos utilizado en el segundo estudio multicéntrico.

Los fagos más potentes, es decir, los que poseen una frecuencia de reactividad sobre las cepas más alta en este estudio, son los siguientes: 27 (35.1%), 90502 (24.7%) y 456 (22.3%). El resto ofrece valores inferiores al 20%. Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos en los anteriores estudios, observamos que el fago 456 aparece en todos como un fago cuya reactividad sobre las cepas es alta. Sin embargo, no existe concordancia en los resultados obtenidos con otros fagos. La explicación de este hecho ya se ha comentado anteriormente.

Debemos destacar que el juego de fagos autóctono nos tipifica a más de la mitad de las 113 cepas caracterizadas, actuando solos o en combinación con los juegos de fagos de "Dean and Williams". Por ello creemos que se trata de un buen juego que podría ser de utilidad en posteriores estudios.

Por último, no se ha encontrado ninguna segregación de diferentes patrones de fagotipia entre las especies de estafilococos coagulasa negativos.

b) Fagotipia inversa.

La fagotipia inversa resulta adecuada como método alternativo de tipificación. Esta fagotipia nos confirma que dos aislados que tienen el mismo patrón fágico por la fagotipia directa de 48°C son iguales, si se obtiene idéntico patrón mediante la fagotipia inversa. Si dos cepas no tipificadas por la fagotipia del calor tienen el mismo patrón fágico mediante la fagotipia inversa, casi con toda seguridad serán iguales entre sí. Para poder afirmar esto, son necesarios otros marcadores epidemiológicos que lo ratifiquen.

Mediante la fagotipia inversa se consiguió tipificar un 40.6% de las 202 cepas del estudio epidemiológico. Esto supuso un aumento del número de cepas tipificadas desde un 55.9%, proporción obtenida por la fagotipia tras el tratamiento térmico de las

cepas, hasta un 72.2%. Un 16.3% de las cepas que no fueron tipificables por la fagotipia directa se han podido tipificar con la fagotipia inversa.

Se establecieron 13 patrones fágicos que nos permitieron establecer similitudes y diferencias entre los aislados de un mismo paciente.

Por otra parte, cuando utilizamos de forma consecutiva los marcadores y aplicamos la fagotipia inversa sobre las cepas no caracterizadas por la fagotipia del calor, logramos establecer similitudes en cuatro pacientes con dos aislados cada uno (4%) y diferencias en seis pacientes (6.9%). Todo ello sumado a lo obtenido por la fagotipia tras el tratamiento térmico (75.7%), hace que la proporción de cepas entre las que se ha podido establecer igualdades y diferencias aumente hasta un 86.6%.

Marples y sus colaboradores (1978) opinan que, puesto que la mayoría de las cepas de estafilococos coagulasa negativos son lisogénicas, es posible suplementar la fagotipia directa por la inversa. Según ellos, aunque la fagotipia directa puede ser útil, la tipabilidad no es muy buena, sobre todo en el caso de cepas multirresistentes. La fagotipia inversa puede ser de gran valor para discriminar entre cepas muy similares, como se demostró en un estudio en el que la cepa epidémica podía ser fácilmente distinguida de las cepas de la flora normal mediante la fagotipia inversa.

Son pocos los patrones que nosotros conseguimos y el único valor que tienen es el de establecer posibles similitudes y diferencias entre los aislados de un mismo paciente.

c) Análisis plasmídico.

El análisis plasmídico actualmente es realizado en gran número de laboratorios de microbiología, pues proporciona un método rápido para caracterizar aislados bacterianos. Nuestros resultados muestran, como en otros estudios (Valentine y cols.,

1988) que la mayoría de los aislados contienen plásmidos (79.2%) cuyo tamaño oscila entre 1 y 30 kilobases.

La proporción de cepas tipificadas al aplicar la fagotipia de 48°C junto a la fagotipia inversa era del 72.2%. Por medio de la plasmidotipia conseguimos que esta proporción aumentara hasta un 90.5%.

Cuando aplicamos la plasmidotipia después de las dos fagotipias (la del calor y la inversa), para establecer relaciones de similitud entre las cepas, conseguimos caracterizar (como iguales o diferentes) el 98% de los aislados.

La gran variedad de perfiles plasmídicos hallados (76 patrones diferentes) nos permite establecer comparaciones de estos perfiles, de diferentes aislados, de un mismo o de diferentes pacientes, en situaciones endémicas o epidémicas, para poder definir la epidemiología de las infecciones producidas por los estafilococos coagulasa negativos. A pesar de todas estas ventajas, el uso del perfil plasmídico para determinar si dos cultivos son idénticos no está exento de deficiencias:

- la tendencia de las cepas a perder fácilmente plásmidos de resistencia a antibióticos (Mickelsen y cols., 1985; Parisi y Hecht, 1980) y plásmidos crípticos (Mickelsen y cols., 1985; Parisi, 1986),

- factores técnicos tales como variaciones en los métodos de extracción de los plásmidos, que pueden convertir una forma molecular de un plásmido en otra (Archer y cols., 1984),

- y las condiciones de electroforesis (Hawkey, 1987).

Por otra parte, la capacidad de distinguir entre dos aislados decrece directamente con el número de bandas presente, así como con las pequeñas diferencias en el tamaño molecular entre dos bandas (Archer y cols., 1984; Parisi, 1985).

También, la transferencia conjugativa de plásmidos dentro de una misma especie o entre especies distintas puede conducir a diferencias en los patrones plasmídicos en células derivadas de un mismo clon (Archer y cols., 1985; Schaberg y Zervos, 1986; Tennent y cols., 1984).

Mickelsen y sus colaboradores (1985) observaron que cepas de *S. epidermidis* epidemiológicamente relacionadas completamente idénticas por criterios fenotípicos y genotípicos tenían diferentes perfiles plasmídicos, aunque todas ellas conservaban algunos plásmidos de idéntico peso molecular, que les permitía reconocer la relación de los aislados de un mismo o de diferentes pacientes.

Hartstein y sus colaboradores (1991) estudiando los perfiles plasmídicos en *S. epidermidis*, concluyen que este método es fácilmente reproducible.

Por otra parte, Parisi y sus colaboradores (1986) encontraron menores diferencias en los patrones plasmídicos entre aislados de *S. epidermidis*. Sugieren que, aunque el análisis de patrones plasmídicos es un marcador epidemiológico de gran valor, una combinación de métodos (específicamente, plasmidotipia y fagotipia) puede proporcionar unos datos epidemiológicamente más útiles.

Los resultados obtenidos nos revelan que existe una importante concordancia entre los perfiles plasmídicos hallados y los perfiles conseguidos por los diferentes marcadores.

d) Antibiogramas: sensibilidad a los distintos antibióticos probados.

Las pruebas para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos que se llevaron a cabo en nuestro laboratorio nos proporcionaron unos resultados que estaban de acuerdo con los obtenidos por el laboratorio de Antibióticos del Servicio de Microbiología del Hospital "Ramón y Cajal" sobre las cepas de estafilococos coagulasa negativos del primer estudio multicéntrico. En dicho estudio se utilizaron 21 agentes antimicrobianos. Las pruebas de sensibilidad se realizaron sobre todos los aislados y el método de referencia utilizado para la determinación de la C.M.I. de cada antibiótico fue el de dilución

en agar según las recomendaciones del NCCLS. Como patrón de sensibilidad a los antibióticos también siguieron los criterios del NCCLS.

De los doce antibióticos que resultaron comunes, sólo se encontraron algunas discrepancias en la oxacilina, clindamicina y gentamicina.

Hemos podido establecer 98 patrones diferentes, de los cuales 35 se repiten al menos dos veces entre los 202 aislados. El número tan elevado de patrones, constituye uno de los más importantes problemas en la tipificación de los estafilococos coagulasa negativos (Hamilton-Miller y Iliffe, 1985; Smith, y cols., 1982).

Otras desventajas de este método son:

- variaciones en el antibiotipo como consecuencia de variaciones analíticas en los métodos empleados para probar su susceptibilidad

- la expresión de resistencia a antibióticos en algunas cepas de estafilococos coagulasa negativos puede ser inestable (Mickelsen y cols., 1985)

Por otra parte, en un análisis estadístico de algunos sistemas de tipificación para los estafilococos coagulasa negativos, Christensen y sus colaboradores, en 1983, asignaban una probabilidad de 0.303 a 0.897 para los antibiogramas, indicando que este método por sí solo no podría categorizar dos cepas de estafilococos coagulasa negativos como idénticas o diferentes.

La proporción de tipabilidad conseguida al aplicar la antibiotipia después de las dos fagotipias y la plasmidotipia es del 100% (antes de aplicar este marcador sólo se alcanzaba el 90.5%). El porcentaje de cepas en las que se han podido establecer relaciones de semejanza independientemente de los resultados de tipabilidad, aumenta desde un 98%, conseguido después de aplicar la fagotipia del calor, la fagotipia inversa y la plasmidotipia, hasta un 100%, después de estudiar el antibiotipo y la producción de "slime".

En nuestro caso, la relación de dichos patrones con los resultados obtenidos por los otros marcadores nos proporciona

datos convincentes a la hora de establecer similitudes entre aislados de un mismo enfermo.

e) Estudio del factor de virulencia "slime".

La producción de "slime" es considerada por la mayoría de los autores como un mecanismo patogénico de las infecciones del material de plástico ocasionadas por los estafilococos coagulasa negativos. Peters y sus colaboradores (1981), en un modelo experimental de infección por catéteres, pudieron ver por medio del microscopio electrónico de barrido que los estafilococos coagulasa negativos eran capaces de adherirse y crecer sobre la superficie del polímero recubiertas de una matriz amorfa. No está claro si esta matriz estaba formada sólo por el "slime" o si están involucradas también otras sustancias del huésped.

Algunos estudios han tratado de investigar los mecanismos por los cuales los estafilococos se adhieren a superficies de polímeros (Marrie y cols., 1982; Peters y cols., 1984). Los resultados muestran que la adherencia de las células de estafilococos a estas superficies es más bien un proceso complejo que depende de varias propiedades de la superficie de la bacteria (hidrofobicidad/hidrofilicidad y carga neta) y del polímero, aunque "in vivo" habría que considerar también los productos del huésped.

La estructura química del "slime" es todavía desconocida. Ludwicka y sus colaboradores (1984b) establecieron algunas características físico-químicas: no es una verdadera cápsula sino que está unida débilmente a la superficie celular, no está asociada a células solas y es soluble en agua. Es un complejo glicoproteico formado por cuatro fracciones que contienen azúcares y proteínas. Los azúcares presentes son glucosa, glucosamina, manosa, galactosa y ácido glucurónico. Estos tres últimos no están presentes ni en el peptidoglicano ni en el ácido teicoico de la pared celular de *S. epidermidis* y, por lo tanto, podemos decir que estos monosacáridos pertenecen al "slime".

Los estafilococos que contienen "slime" reaccionan con lectinas específicas para la manosa en un test de aglutinación en porta, por lo que tal reactividad puede considerarse como un marcador de detección de "slime".

Otra técnica empleada para su detección es la descrita por Christensen y sus colaboradores (1982): test del tubo o tinción con safranina.

Hemos valorado dichas técnicas. Mediante la prueba propuesta por Christensen (1982) obtenemos más resultados positivos, lo que nos conduce a pensar que este método sólo nos demuestra realmente la capacidad de los microorganismos para adherirse a determinadas superficies como el poliestireno o cristal y no su capacidad para producir "slime". Es incluso probable que algún o algunos componentes superficiales de estas bacterias sean los responsables de la propiedad de adherirse a la superficie del polímero. Por ello creemos que la reactividad con lectinas específicas para la manosa es, por el momento, el único marcador fiable para la detección de "slime".

Debemos reseñar que existe una controversia en cuanto a la producción de "slime" y su papel patogénico. Mientras que Christensen y sus colaboradores (1983) demostraron que cuando la producción de "slime" se usa en combinación con antibiogramas y el API Staph-Ident tiene un alto poder discriminatorio entre cepas de *S. epidermidis* para distinguir verdaderos patógenos de simples contaminantes, otros investigadores no han encontrado diferencias significativas en la producción de "slime" por cepas infecciosas y no infecciosas (Diaz-Mitoma y cols., 1987). Las razones que explican las diferencias entre estos estudios no están claras. Quizá las diferencias en los métodos usados para la detección de la producción de "slime" "in vitro" puedan haber influido sobre los resultados obtenidos en los ensayos y así afectar a la relevancia de la producción de "slime" en las distintas investigaciones.

Por último, en nuestro estudio no hemos encontrado ninguna relación entre el origen del microorganismo, la especie y la

producción de "slime", aunque, como marcador epidemiológico, podemos decir que los resultados obtenidos mediante la reacción con la concavalina A concuerdan con los resultados de los otros marcadores epidemiológicos.

Por otra parte, hemos observado que todas las 58 cepas pertenecientes a 24 enfermos en los que todos los marcadores eran coincidentes, y la presencia de una infección producida por un estafilococo coagulasa negativo es muy probable, eran productoras de "slime". Esto puede apoyar la hipótesis de que la producción de "slime" es un factor de virulencia de los estafilococos coagulasa negativos.

f) Estudio comparativo de los diferentes marcadores epidemiológicos utilizados.

f.1.- Proporción de tipabilidad y resistencia a antibióticos.

La baja proporción de tipabilidad entre cepas multirresistentes obtenida (tabla 48) está de acuerdo con el estudio realizado por Richardson y Marples (1987) en Inglaterra en el que la tipabilidad entre cepas resistentes a menos de tres antibióticos fue aproximadamente del 67%, pero sólo de un 30% entre cepas resistentes a más antibióticos.

TABLA 48.- Proporción de tipabilidad y resistencia.

<u>Patrón de resistencia</u>	<u>Nº cepas tipificables/</u>	<u>Nº total cepas</u>	<u>(%) tipabilidad</u>
Sensible a todo	13/20		(65)
Resistente a < 3 antibióticos	15/23		(65.2)
Resistente a ≥ 3 antibióticos	84/157		(41.6)
Resistente a todo	1/2		(50)
Resistente a oxacilina	55/123		(44.7)

Quizá la baja proporción de tipabilidad entre cepas mutirresistentes se deba a la adquisición de las cepas de varios plásmidos de resistencia, los cuales, del mismo modo que los profagos, pueden prevenir la lisis por los fagos (Rosdahl y cols., 1990).

f.2.- Producción de "slime" y acción antimicrobiana.

Es un hecho ya comprobado que las cepas de *S. epidermidis* productoras de "slime" se adhieren mejor a los catéteres intravasculares que las no productoras de "slime" (Kristinsson, 1989). Davenport y sus colaboradores (1986) encontraron una asociación significativa entre la capacidad de un aislado para producir "slime" y su tendencia a causar infecciones en pacientes con mecanismos protéticos. Encontraron que dichas infecciones, por otra parte, eran más difíciles de erradicar cuando el microorganismo implicado era productor de "slime" y, que por lo tanto, se requería terapia de antibióticos junto a la eliminación de mecanismos protéticos para curar.

Farber y sus colaboradores (1990) demostraron que los antibióticos glicopeptídicos vancomicina y teicoplanina eran ineficaces para erradicar infecciones por cuerpos extraños debidas

a cepas de estafilococos coagulasa negativos productoras de "slime"

Gristina y sus colaboradores (1989) observaron que las bacterias de estafilococos coagulasa negativos adheridas a biomateriales tienen una mayor resistencia a los antibióticos que las que tienen las mismas cepas en suspensión. Comprobaron que la resistencia era independiente de la producción de "slime" y fue relacionada con la superficie del biomaterial colonizado que de alguna manera afectaba a la fisiología bacteriana y, por lo tanto, a su respuesta hacia los antibióticos.

Nosotros hemos encontrado que el 70% de las cepas que son sensibles para todos los antibióticos probados (patrón 1) no produce "slime", lo que apoyaría la hipótesis de Kristinsson (1989) y de Davenport y sus colaboradores (1986).

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

Las infecciones hospitalarias causadas por los estafilococos coagulasa negativos suponen un problema sanitario importante como se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios.

El análisis comparativo de los dos estudios multicéntricos realizados para conocer la prevalencia de los estafilococos coagulasa negativos en España nos lleva a extraer las siguientes conclusiones:

1ª) En consonancia con lo que ocurre en otros países, *S. epidermidis* (dentro de los estafilococos coagulasa negativos), es la especie implicada en procesos patológicos que con mayor frecuencia se aísla en los hospitales españoles.

2ª) Los estudios multicéntricos indican que los aislados de sangre son los más numerosos.

3ª) La localización de los aislados por servicios médicos no coincide en los dos estudios multicéntricos. En el primero, los estafilococos coagulasa negativos se aislaron principalmente del servicio de medicina interna (14.6%), seguido de U.C.I. y cirugía (ambos con un 9.3%), mientras que en el estudio multicéntrico de 1990 las cepas fueron aisladas de zonas de alto riesgo (12.8%) y del servicio de neonatología (10.1%).

4ª) Los distintos resultados de patrones obtenidos mediante la fagotipia en ambos estudios nos indica la presencia de unas cepas de estafilococos coagulasa negativos fluctuantes. Como se ha podido comprobar las cepas que circulan en ambos estudios multicéntricos son diferentes.

Los resultados presentados en este trabajo nos permiten enumerar las siguientes conclusiones referidas a los diferentes marcadores epidemiológicos:

1*) La fagotipia, aunque es sin duda un buen marcador epidemiológico para *S. aureus*, en los estafilococos coagulasa negativos la elevada frecuencia de cepas no tipificables hizo necesaria la introducción de una nueva variante de fagotipia: fagotipia al 1000 RTD tras un tratamiento térmico. Esta variante nos ha permitido la caracterización de un mayor número de cepas.

La utilización de los dos juegos de fagos (20 fagos del juego de "Dean and Williams" y 12 autóctonos) aumenta considerablemente la proporción de tipabilidad. En nuestro caso, la actividad de los fagos del juego de "Dean and Williams" no parece mostrar limitaciones geográficas, las cuales han de ser consideradas (según diversos autores) en la organización de un juego de fagos internacional.

El juego de fagos autóctono nos tipifica a más de la mitad de las 113 cepas tipificadas en este estudio, actuando solo o en combinación con los juegos de fagos de "Dean and Williams". Por ello creemos que se trata de un buen juego que podría ser de utilidad en posteriores estudios.

2*) La fagotipia inversa es un buen método alternativo de tipificación. Mediante esta fagotipia conseguimos elevar la proporción de cepas tipificadas desde un 55.9% hasta un 72.2%. Puede ser de gran valor para establecer discriminaciones entre cepas muy similares.

3*) La plasmidotipia es un método útil para caracterizar aislados bacterianos. La mayoría de las cepas (79.2%) contenían plásmidos, lo que nos ha permitido establecer una comparación de perfiles plasmídicos de diferentes aislados, de un mismo o de distintos pacientes, en situaciones endémicas o epidémicas, para poder definir la epidemiología de las infecciones producidas por los estafilococos coagulasa negativos.

4*) El perfil de susceptibilidad antimicrobiana es un marcador epidemiológico ampliamente utilizado para establecer ciertas correspondencias entre aislados de estafilococos coagulasa negativos en combinación con otros marcadores. Como marcador en solitario, presenta el inconveniente de proporcionar gran cantidad de patrones, que en nuestro caso casi ronda el centenar. Sin embargo, utilizado en combinación con la fagotipia, fagotipia inversa y plasmidotipia, nos permite confirmar las similitudes entre aislados de un mismo paciente, por lo que su alta variabilidad queda compensada.

5*) Los resultados de la producción de "slime" nos permiten establecer una correspondencia entre dicha producción y la presencia de infección. Por otra parte, en cuanto a la valoración de los métodos usados para su detección, la reactividad con concavalina A es mucho más específica que la tinción con safranina o test del tubo.

Como marcador epidemiológico, ayuda a confirmar la similitud entre cepas que tienen el mismo resultado por todos los marcadores epidemiológicos utilizados previamente.

6*) Como conclusión final, podemos decir que *S. epidermidis* es el estafilococo coagulasa negativo más frecuentemente aislado de infecciones. Es también el estafilococo más prevalente y persistente de la piel. Algunos de los métodos de tipificación aquí presentados proporcionan datos más concluyentes que otros. Por ello el uso de una combinación de marcadores es el método idóneo para poder conocer el origen, reservorio y modos de transmisión de este patógeno nosocomial.

Hemos encontrado que la sucesión de los cinco marcadores empleados (fagotipia, fagotipia inversa, plasmidotipia, antibiotipia y producción de "slime") es una combinación adecuada para poder afirmar con grandes probabilidades de acierto, si dos o

más aislados de un mismo enfermo son iguales o diferentes y, por lo tanto, si son productores de infección o simples contaminantes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

AASEN, J. y OEDING, P. (1971). "Antigenic studies on *Staphylococcus epidermidis*", A.P.M.I.S., Sect. B, 79: 827-834.

ABD-EL-MALEK, Y. y GIBSON, T. (1948). "Studies in the bacteriology of milk. II. The staphylococci and micrococci of milk", J. Dairy Res., 15: 249-260.

ABER, R.C. y MACKEL, D.C. (1981). "Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms", en Richard E. Dixon (ed.), Nosocomial Infections, Yorke Medical Books, pp. 161-167.

ADES, A.E., GARRET, A.J., COWELL, J., CHIN, K.S. y PECKHAM, C.S. (1988). "Computer matching of oligonucleotide patterns of electrophoretic gels: an application to the epidemiology of cytomegalovirus", Epidemiol. Infec., 100: 467-479.

AKATOV, A.K. y KHATENEVER, M.L. (1976). "Identification and biological typing of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated in hospitals", en J. Jeljaszewicz (ed.), Staphylococci an Staphylococcal Diseases, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 119-124.

ALDRIDGE, K.E., STRATTON, C.W., PATTERSON, L.S., EVANS, M.E. y HODGES, R.L. (1983). "Comparison of the Staph-Ident System with a conventional method for species identification of urine and blood isolates of coagulase-negative staphylococci", J. Clin. Microbiol., 17: 516-520.

ALMEIDA, R.J., JORGENSEN, J.H. y JOHNSON, J.E. (1983). "Evaluation of the Auto Microbic System gram-negative identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci", J. Clin. Microbiol., 18: 438-439.

ANDERSON, J.C. y CRAVEN, N. (1984). "Recruitment of neutrophils by an encapsulated coagulase-negative strain of *Staphylococcus simulans* in the mammary gland of the mouse", J. Leukoc. Biol., 36: 633-645.

ANDERSON, R.L. y ENGLE, F.B., Jr. (1978). "Typing methods for *Proteus rettgeri*: Comparison of biotype, antibiograms, serotype, and bacteriocin production", J. Clin. Microbiol., 8: 715-724.

ARCHER, G.L., DIETRICK, D.R. y JOHNSTON, J.L. (1985). "Molecular epidemiology of transmissible gentamicin resistance among coagulase-negative staphylococci in a cardiac surgery unit", J. Infect. Dis., 155: 243-251.

ARCHER, G.L., KARCHMER, A.W., VISHNIAVSKY, N. y JOHNSTON, J.L. (1984). "Plasmid-pattern analysis for the differentiation of infecting from noninfecting *Staphylococcus epidermidis*", J. Infect. Dis., 149: 913-920.

ARCHER, G.L. y TENEBBAUM, M.J. (1980). "Antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis* in patients undergoing cardiac surgery", Antimicrob. Agents Chemother., 17: 269-272.

ARCHER, G.L., VISHNIAVSKY, N. y STIVER, H.G. (1982). "Plasmid pattern analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with prosthetic valve endocarditis", Infect. Immun., 35: 627-632.

ARVIDSON, S.O. (1984). "Extracellular enzymes from *Staphylococcus aureus*", en C.S.F. Easmon y C. Adlam (eds.), Staphylococci and Staphylococcal Infections, vol. 2, Academic Press, Nueva York, pp. 745-808.

ATKINSON, B.A. y LORIAN, V. (1984). "Antimicrobial agent susceptibility patterns of bacteria in hospitals from 1971 to 1982", J. Clin. Microbiol., 20: 791-796.

AULETTA, A.E. y KENNEDY, E.R. (1966). "Deoxyribonucleic acid base composition of some members of the Micrococcaceae", J. Bacteriol., 92: 28-34.

AYALA, F.J. (1976). Molecular evolution, Sinaver Associates, Sunderland, Mass.

AYLIFFE, G.A. (1978). "The application of typing methods to nosocomial infections", en T. Bergan and J.R. Norris (eds.), Methods in Microbiology, Academic Press, Nueva York, pp. 39-60.

BADDOUR, L.M., CHRISTENSEN, C.D., HESTER, M.G. y BISNO, A.L. (1984). "Production of experimental endocarditis by coagulase-negative staphylococci. Variability in species virulence", J. Infect. Dis., 150: 721-726.

BAIRD-PARKER, A.C. (1963). "A classification of micrococci and staphylococci based on phyiological and biochemical tests", J. Gen. Microbiol., 30: 409-427.

BAIRD-PARKER, A.C. (1965). "The classification of staphylococci and micrococci from world-wide sources", J. Gen. Microbiol., 38: 363-387.

BAIRD-PARKER, A.C. (1974). "Micrococcaceae", en Bergey's manual of determinative bacteriology, 8ª ed., R.E. Buchanan y N.E. Gibbons (eds.), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 478-490.

BANNERMAN, T.L. y KLOOS, W.E. (1991). "Staphylococcus capitis subsp. ureolyticus subsp. nov. from human skin", Int. J. Syst. Bacteriol., 41: 144-147.

BAQUERO, F. y MARTÍNEZ, J.L. (1989). "Aplicación de las sondas de ADN en microbiología clínica", Enferm. Infecc. Microbiol. Clín., 7: 122-125.

BARRITT, M.M. (1936). "The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol", J. Pathol. Bacteriol., 42: 441.

BARRY, A.L., LACHICA, R.V.F. y ATCHINSON, F.W. (1973). "Identification of Staphylococcus aureus by simultaneous use of the tube coagulase and thermonuclease tests", Appl. Microbiol., 25: 496-497.

BARTLETT, R.C., BENNETT, J.V., WEINSTEIN, R.A. y MALLISON, G.F. (1979). "El laboratorio de microbiología: su papel en la vigilancia, investigación y control", en J.V. Bennett y P.S. Brachman (eds.), Infecciones Hospitalarias, Little, Brown and Co. Inc., Boston, pp. 213-238.

BAUERNFEIND, A., PETERMULLER, C. y SCHNEIDER, R. (1981). "Bacteriocins as tools in analysis of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infections", J. Clin. Microbiol., 14: 15-19.

BAYSTON, R. y PENNY, S.R. (1972). "Excessive production of mucoid substance in staphylococcus SIIA: a possible factor in colonization of Holter shunts", Dev. Med. Child. Neurol., 14: 25-28, supl. 27.

BENTLEY, D.W., HAHN, J.J. y LEPPER, M.H. (1970). "Transmission of chloramphenicol-resistant *Staphylococcus epidermidis*:

epidemiologic and laboratory studies", J. Infect. Dis., 122: 365-375.

BENTLEY, D.W., HAQUE, R., MURPHY, R.A. y LEPPER, M.H. (1968). "Biotyping an epidemiological tool for coagulase-negative staphylococci", Antimicrob. Agents Chemother., pp. 54-59.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1ª ed., 1923; 2ª ed., 1925; 3ª ed., 1930; 4ª ed., 1934; 5ª ed., 1939; 6ª ed., 1948; 7ª ed., 1957; 8ª ed., 1974.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (1986), vol. 2, P.H.A. Sneath (ed.), The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H., HARRY, V., JASKOT, D. y HAMMERBERG, O. (1990a). "Typing of coagulase-negative staphylococci by southern hybridation of chromosomal DNA fingerprints using a ribosomal RNA probe", Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 9: 588-594.

BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H., JASKOT, D. y HAMMERBERG, O. (1990b). "A method for DNA restriction endonuclease fingerprinting of coagulase-negative staphylococci", Journal of Microbiological Methods, 12: 41-49.

BILLROTH, T. (1874). Untersuchungen über die Vegetationsformen von Coccobacteria septica, Reimer, Berlin.

BIRNBOIM, H.C. y DOLY, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", Nucleic Acids Res., 7: 1513-1523.

BLAIR, J.E. y WILLIAMS, R.E.O. (1961). "Phage typing of staphylococci", Bull. W.H.O., 24: 771-784.

BLOUSE, L.E., KOLONEL, L.N., WATKINS, C.A. y ATHERTON, J.M. (1975). "Efficacy of phage-typing epidemiologically related *Staphylococcus epidermidis* strains", J. Clin. Microbiol., 2: 318-321.

BLOUSE, L.E., LATHROP, G.D., KOLONEL, L.N. y BROCKETT, R.M. (1978). "Epidemiological features and phage types associated with nosocomial infections caused by *Staphylococcus epidermidis* ", Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg., I Abt. Orig. A, 241: 119-135

BOILEAU, C.R., D'HAUTEVILLE, H.M. y SANSONETTI, P.J. (1984). "DNA hybridization technique to detect *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli* ", J. Clin. Microbiol., 20: 959-961.

BRACHMAN, P.S. (1979). "Epidemiología de las infecciones nosocomiales", en J.V. Bennett y P.S. Brachman (eds.), Infecciones Hospitalarias, Little, Brown and Co. Inc., Boston, pp. 29-50.

BRUN, Y., FOREY, F., FLEURETTE, J. y GONTHER, B. (1971). "Pouvoir pathogène des staphylocoques négatifs", Proc. Soc. Française de Microbiologie.

BRUNNER, H., GEMMELL, C.G., HUSER, H. y FEHRENBACH, F.J. (1981). "Chemical and biological properties of *Staphylococcus aureus* lipase", en Staphylococci and Staphylococcal Infections, J. Jeljaszewicz (ed.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 329-333.

BUCHANAN, R.E. (1911). Veterinary Bacteriology, W.B. Saunders, Filadelfia.

BUKHARI, A.I., SHAPIRO, J.A. y ADHYA, S. (1977). DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes, Cold Spring Harbor, Nueva York.

BURNIE, J.P., LEE, W., MATTHEWS, R.C. y BAYSTON, R. (1988). "Immunoblot fingerprinting of coagulase negative staphylococci", J. Clin. Pathol., 41: 103-107.

BURNIE, J.P., LEE, W., MATTHEWS, R.C., PELL, M., ROBERTS, J. y MARPLES, R. (1987). "How many MRSA's are there?" J. Med. Microbiol., (abstract 228), January issue.

BUYSER, M.L., MORVAN, A., GRIMONT, F. y SOLH, N.E. (1989). "Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns", J. Gen. Microbiol., 135: 989-999.

CASEWELL, M.N. (1972). "Experience in the use of commercial antisera for the capsular typing of klebsiella species", J. Clin. Pathol., 25: 734.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL, (1977). "National nosocomial infections study. United States 1975-1976", M.M.W.R., 26: 377-383.

CLINK, J. y PENNINGTON, T.H. (1987). "Staphylococcal whole-cell polypeptide analysis: evaluation as a taxonomic and typing tool", J. Med. Microbiol., 23: 41-44.

COHEN, J.O. (1972). "Serotyping of Staphylococci", en J.O. Cohen (ed.), The Staphylococci, Wiley Interscience, Nueva York, pp. 419-430.

COHEN, M.L., GRAVES, L.M., HAYES, P.S., GIBSON, R.J., RASHEED, J.K. y FEELEY, J.C. (1983). "Toxic shock syndrome: modification and comparison of methods for detecting marker proteins in *Staphylococcus aureus*", J. Clin. Microbiol., 18: 372-375.

COLLEN, S., HOVELIUS, B., WIESCANDER, A. y MÄRDH, P.A. (1979). "Surface properties of *Staphylococcus saprophyticus* and

Staphylococcus epidermidis as studied by adherence tests and two polymer, aqueous phase systems", A.P.M.I.S., Sect. B, 87: 321-328.

COLMAR, I. y HORAUD, T. (1987). "Enterococcus faecalis hemolysin-bacteriocin plasmids belong to the same incompatibility group", Appl. Environ. Microbiol., 53: 567-570.

CONROY, J.V., BALTCH, A.L., SMITH, R.P., HAMMER, M.C. y GRIFFIN, P.E. (1983). "Bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* : use of a combined typing system in an eight-year study", J. Infect. dis., 148: 603.

COOKSEY, Z.C., MAYER, L.W. (1987). "Identification of antibacterial resistance mechanisms", The Antimicrobial Newsletter, 4: 57-67.

CRICHTON, P.B. y OLD, D.C. (1980). "Differentiation of strains of *Escherichia coli*: Multiple typing approach", J. Clin. Microbiol., 11: 635-640.

CHRISTENSEN, G.D., PARISI, J.T., BISNO, A.L., SIMPSON, W.A. y BEACHEY, E.H. (1983). "Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci", J. Clin. Microbiol., 18: 258-269.

CHRISTENSEN, G.D., SIMPSON, W.A., BISNO, A.L. y BEACHEY, E.H. (1982). "Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces", Infect. Immun., 37: 318-326.

DATTA, N., HUGHES, V.M., NUGENT, M.E. y RICHARDS, H. (1979). "Plasmids and transposons and their stability and mutability in bacteria isolated during an outbreak of hospital infection", Plasmids, 2: 182-196.

DAVENPORT, D.S., MASSANARI, R.M., PFALLER, M.A., BALE, M.J., STREED, S.A. y HIERHOLZER, W.J. (1986). "Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci", J. Infect. Dis., 153: 332-339.

DAVISON, A.L. y BADDLLEY, J. (1963). "The distribution of teichoic acids in staphylococci", J. Gen. Microbiol., 32: 271-276.

DE LA FUENTE, R., SUAREZ, G. y SCHLEIFER, K.H. (1985). "Staphylococcus aureus subsp. anaerobius subsp. nov., the causal of abscess disease of sheep", Int. J. Syst. Bacteriol., 35: 99-102.

DE SAXE, M.J., CREES-MORRIS, J.A., MARPLES, R.R. y RICHARDSON, J.F. (1981). "Evaluation of current phage-typing systems for coagulase-negative staphylococci", en J. Jeljaszewicz (ed.), Staphylococci and Staphylococcal Infections, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp.197-204.

DE SAXE, M.J., y NOTLEY, C.M. (1978). "Experiences with the Typing of Coagulase-negative Staphylococci and Micrococci", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. Orig. A, 241: 46-59.

DEAN, B.A., WILLIAMS, R.E.O., HALL, F. y CORSE, J. (1973). "Phage typing of coagulase-negative staphylococci and micrococci", J. Hyg., 71: 261-270.

DEVRIESE, L.A., HÁJEK, V., OEDING, P., MEYER, S.A. y SCHLEIFER, K.H. (1978). "Staphylococcus hyicus (Sompolinsky 1953) comb. nov. and Staphylococcus hyicus subsp. chromogenes subsp. nov.", Int. J. Syst. Bacteriol., 28: 482-490.

DEVRIESE, L.A., POUTREL, B., KILPPER-BÄLZ, R. y SCHLEIFER, K.H. (1983). "Staphylococcus gallinarum and Staphylococcus caprae, two new Staphylococcus species from animals", Int. J. Syst. Bacteriol., 33: 480-486.

DÍAZ-MITOMA, F., HARDING, G.K.M., HOBAN, D.J., ROBERTS, R.S. y LOW, D.E. (1987). "Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci", J. Infect. Dis., 156: 555-560.

DIXON, R.E. (1987). "Costs of nosocomial infections and benefits of infection control programs", en Prevention and Control of Nosocomial Infections, R.P. Wenzel (ed.), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 19-25.

DORNBUSCH, K., NORD, C.E., OLSSON, B. y WADSTRÖM, T. (1976). "Some properties of coagulase-negative deoxyribonuclease producing strains of staphylococci from human infections", Med. Microbiol. Immunol., 162: 143-152.

DOWSETT, E.G., PETTS, D.N., BAKER, S.L., DE SAXE, M.J., COE, A.E., NAIDOO, J. y NOBLE, W.C. (1984). "Analysis of an outbreak of staphylococcal scalded skin syndrome: strategies for typing 'non-typable' strains", J. Hosp. Infect., 5: 391-397.

EDITORIAL, (1981). "How much infection and the cost?", J. Hosp. Infect., 2: 104.

EDWARDS, P.R. y EWING, W.H. (1972). Identification of Enterobacteriaceae, Burgess Publishing, Minneapolis.

EICKOFF, T. (1981). "International symposium on control of nosocomial infections: synthesis and summary", Rev. Infect. Dis., 3: 798-803.

ELEK, S.D., DAVIES, J.R. y MILES, R. (1973). "Resistotyping of *Shigella sonnei*", J. Med. Microbiol., 6: 329-345.

ELEK, S.D. y HIGNEY, L. (1970). "Resistogram typing: A new epidemiological tool. Application to *Escherichia coli*", J. Med. Microbiol., 3: 103-110.

ELEK, S.D. y MARYSON, C. (1974). "Resistotyping of *Staphylococcus aureus*", J. Med. Microbiol., 7: 237-249.

EVANS, J.B., BRADFORD, W.L., Jr. y NIVEN, C.F. (1955). "Comments concerning the taxonomy of the genera *Micrococcus* and *Staphylococcus*", Inter. Bull. Bacteriol. Nomen. Tax., 5: 61-66.

EVANS, J.B. y KLOOS, W.E. (1972). "Use of shake cultures in a semi-solid thioglycolate medium for differentiating staphylococci from micrococci", Appl. Microbiol., 23: 326-331.

FARBER, B.F., KAPLAN, M.H. y CLOGSTON, A.G. (1990). "*Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics", J. Infect. Dis., 161: 37-40.

FARMER, J.J. III, WEINSTEIN, R.A., ZIERDT, C.H. y BROKOPP, C.D. (1982). "Hospital outbreaks caused by *Pseudomonas aeruginosa*: Importance of serogroup 0:11", J. Clin. Microbiol., 16: 266-270.

FAVERO, M.S. (1978). "Sources of Hospital-Associated Microorganisms", en W.J. Fahlberg y D. Gröschel (eds.), Ocurrence, Diagnosis and Sources of Hospital-Associated Infections, Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 95-125.

FLÜGGE, C. (1890). Microorganisms with special reference to the etiology of the infectious diseases, New Sydenham Society, Londres.

FLUORNOY, D.J. y PRICE, S.B. (1982). "Coagulase-negative staphylococci: contaminant or pathogen", Lab. Med., 13: 235-237.

FRASCH, C.E., ZOLLINGER, W.D. y POOLMAN, J.T. (1985). "Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes", Rev. Infect. Dis., 7: 504-509.

FRENEY, J., BRUN, Y., BES, M., MEUGNIER, H., GRIMONT, F., GRIMONT, P.A.D., NERVI, C. y FLEURETTE, J. (1988). "*Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens", Int. J. Syst. Bacteriol., 38: 168-172.

FUCHS, P.C. (1979). "Mechanisms and conditions of nosocomial infections", en Epidemiology of Hospital-Associated Infections, American Society of Clinical Pathologists, Chicago, pp. 13-18.

GABELISH, C., STEFFE, R., HARBOUR, C., STUBBS, E., VICKERY, A. y BEARD-PEGLER, M. (1990). "Specificity of monoclonal antibodies produced to coagulase-negative staphylococci", en 2nd International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Ascent Ltd., Atenas, p. 259.

GARGALLO-VIOLA, D. (1989). "Enzyme polymorphism, prodigiosin production, and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of *Serratia marcescens*", J. Clin. Microbiol., 27: 860-868.

GARGALLO-VIOLA, D. (1987). Estructura genética de las poblaciones de *Serratia marcescens*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.

GARNER, J.S. y FAVERO, M.S. (1986). "CDC guideline for hand-washing and hospital environmental control, 1985", Infect. Control Hosp. Epidemiol., 7: 231-242.

GARNER, J.S., JARVIS, W.R., EMORI, T.G., HORAN, T.C. y HUGHES, J.M. (1988). "CDC definitions for nosocomial infections, 1988", Am. J. Infect. Control, 16: 128-140.

GEMMELL, C.G. y ROBERTS, C.E. (1973). "Toxins and enzymes of coagulase-negative staphylococci isolated from human infections", J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 18: 261-266.

GEMMELL, C.G. y SCHUMACHER-PERDREAU, F. (1986). "Extracellular toxins and enzymes elaborated by coagulase-negative staphylococci", en P.A. Mårdh y K.H. Schleifer (eds.), Coagulase-Negative Staphylococci, Almquist and Wiksell International, Estocolmo, pp. 109-121.

GERSHMAN, M. (1977). "Single phage-typing set for differentiating salmonellae", J. Clin. Microbiol., 5: 302-314.

GIBSON, T. (1967). "The status of the genus *Micrococcus*", Int. J. Syst. Bacteriol., 17: 231-233.

GIGER, O., CHARILAOU, C.C. y CUNDY, K.R. (1984). "Comparison of the API Staph-Ident and DMS Staph-Trac systems with conventional methods used for the identification of coagulase-negative staphylococci", J. Clin. Microbiol., 19: 68-72.

GOLDMANN, D.A. (1980). "Laboratory procedures for infection control", en E.H. Lennette, A. Balows, W.J., Jr. Hausler y J.P. Truant (eds.), Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 939-951.

GOLDMANN, D.A. y MACONE, A.B. (1980). "A microbiologic approach to the investigation of bacterial nosocomial infection outbreaks", Infect. Control Hosp. Epidemiol., 1: 391.

GRIMONT, F. y GRIMONT, P.A.D. (1986). "Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools", Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 137B: 165-175.

GRINSTED, J. y BENNETT, P.M.(eds.)(1988). Methods in Microbiology, Academic Press, Nueva York, pp. 1-10.

GRISTINA, A.G., JENNINGS, R.A., NAYLOR, P.T., MYRVIK, Q.N. y WEBB, L.X. (1989). "Comparative in vitro antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negative staphylococci", Antimicrob. Agents Chemother., 33: 813-816.

GROTHUES, D., BAUTSCH, W., TÜMLER, B. (1990). "Separation of large DNA molecules by field inversion gel electrophoresis", en P.J. Greenaway (ed.), Advances in Gene Technology, vol. 1, JAI Press, Londres.

HAHN, G. y NYBERG, I. (1976). "Identification of streptococcal groups A,B,C, and G by slide co-agglutination of antibody-sensitized protein A-containing staphylococci", J. Clin. Microbiol., 4: 99-101.

HÁJEK, V. (1976). "*Staphylococcus intermedius* a new species isolated from animals", Int. J. Syst. Bacteriol., 26: 401-408.

HÁJEK, V., DEVRIESE, L.A., MORDARSKI, M., GOODFELLOW, M., PULVERER, G. y VARALDO, D.E. (1986). "Elevation of *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* (Devriese et al., 1978) to species status: *Staphylococcus chromogenes* (Devriese et al., 1978) comb. nov.", Syst. Appl. Microbiol., 8: 169-173.

HALEY, R.W. (1986). "Incidence and nature of endemic and epidemic nosocomial infections", en J.V. Bennett, P.S. Brachman (eds.), Hospital Infections, Little, Brown and Co. Inc., Boston, pp. 359-374.

HALEY, R.W., ABER, R.C. y BENNETT, J.V. (1986). "Surveillance of nosocomial infections", en J.V. Bennett, P.S.Brachman (eds.), Hospital Infections, Little, Brown and Co.Inc., Boston, pp. 51-72.

HALEY, R.W., CULVER, D.H., WHITE, J.W., MORGAN, W.M. y EMORI, T.G. (1985a). "The nation wide nosocomial infection rate: A new need for vital statistics", Am. J. Epidemiol., 121: 159-167.

HALEY, R.W., CULVER, V.P., HOOTON, T.M. (1985b). "The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in U.S. hospitals", Am. J. Epidemiol., 121: 182-205.

HALEY, R.W., HOOTON, T.M., CULVER, D.H., QUADE, D., SCHATMAN, R.H., SCHABERG, D.R., SHAH, B.V. y SHATZ, G.D. (1981). "Nosocomial infections in U.S. hospitals, 1975-1976. Estimated frequency by selected characteristics of patients", en R.E.Dixon (ed.), Nosocomial Infections, Yorke Medical Books, pp. 45-57.

HAMILTON-MILLER, J.M.T. y ILIFFE, A. (1985). "Antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci", J. Med. Microbiol., 19: 217-226.

HARSTEIN, A.I., NORTHLAND, V.H. y RASHAD, A.L. (1991). "Reproducibility of *Staphylococcus epidermidis* Plasmid Profiles", Diag. Microbiol. Infect. Dis., 14: 275-280.

HAWKEY, P.M. (1987). "Molecular methods for the investigation of bacterial cross-infection", J. Hosp. Infect., 9: 211-218.

HÉBERT, G.A. y HANCOCK, G.A. (1985). "Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci", J. Clin. Microbiol., 22: 409-415.

HECZKO, P.B., JELJASZEWICZ, J. y PULVERER, G. (1974). "Classification of Micrococcaceae isolated from clinical sources", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Bvg., I Abt. Orig. A, 229: 171-177.

HECZKO, P.B., PULVERER, G., KASPROWICZ, A. y KLEIN, A. (1977). "Evaluation of a new bacteriophage set for typing of *Staphylococcus epidermidis*", J. Clin. Microbiol., 5: 573-577.

HETTIARATCHY, I.G.T., COOKE, E.M. y SHOOTER, R.A. (1973). "Colicine production as an epidemiologic marker of *Escherichia coli*", J. Med. Microbiol., 6: 1-11.

HICKMAN, F.W. y FARMER, J.J., III (1976). "Differentiation of *Proteus mirabilis* by bacteriophage typing and the Dienes reaction", J. Clin. Microbiol., 3: 350-358.

HILL, L.R. (1959). "The Adansonian classification of the staphylococci", J. Gen. Microbiol., 20: 277-283.

HILL, W.E., WENTZ, B.A., PAYNE, W.L., JAGOW, J.A. y ZON, G. (1986). "DNA colony hybridation method using synthetic oligonucleotides to detect enterotoxigenic *Escherichia coli*: collaborative study", J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69: 531-536.

HOGT, A.H., DANKERT de VRIES, J.A. y FEIJEN, J. (1983). "Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials", J. Gen. Microbiol., 129: 2959-2968.

HOLMES, O.W. (1936). "On the contagiousness of puerperal fever", Medical Classics, 1: 211.

HOLT, R. (1969). "The classification of staphylococci from colonized ventriculo-atrial shunts", J. Clin. Pathol., 22: 475-482.

HORAN, T., CULVER, D., JARVIS, W., EMORI, G., BANERJEE, S., MARTONE, W. y THORNSBERRY, C. (1988). "Pathogenesis causing nosocomial infections. Preliminary data from the National Nosocomial Infections Surveillance System", The Antimicrobial Newsletter, 5: 65-67.

HORAN, T.C., WHILE, J.W., JARVIS, W.R., EMORI, T.G., CULVER, D.H., MUNN, V.P., THORNSBERRY, C., OLSON, D.R. y HUGHES, J.M. (1986). "Nosocomial Infection Surveillance, 1984", M.M.W.R., 35 (Nº 1SS): 17-29.

HOVELIUS, B., THELIN, I. y MÄRDH, P.A. (1979). "Staphylococcus saprophyticus in the aetiology of non-gonococcal urethritis", British Journal of Venereal Disease, 55: 369-374.

HUCKER, G.J. (1924a). "Studies on the Coccaceae. II. A study of the general characters of the micrococci", N.Y. State Agr. Expt. Sta. Tech. Bull., Nº 100.

HUCKER, G.J. (1924b). "Studies on the Coccaceae. IV. The classification of the genus *Micrococcus*", N.Y. State Agr. Expt. Sta. Tech. Bull., Nº 102.

HUCKER, G.J. (1928). "Studies on the Coccaceae. IX. Further studies on the classification of the micrococci", N.Y. State Agr. Expt. Sta. Tech. Bull., Nº 135.

HUCKER, G.J. (1948). "Genus I *Micrococcus*", en R.S. Breed, E.G.D. Murray y A.D. Hitchens (eds.), Bergey's Manual of Determinative

Bacteriology, 6ª ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 235-246.

HUETER, C. (1872). "Zur aetiologie und Therapie der metastasirenden Pyämie", Deut. Z. Clir., 1: 91-125.

HUGHES, J.M., CULVER, D.H., WHITE, J.W., JARVIS, W.R., MORGAN, W.M., MUNN, V.P., MOSSER, J.L. y EMORY, T.G. (1983). "Nosocomial infection surveillance, 1980-1982", M.M.W.R., 32 (Nº 4SS): 1-16.

HUSSAIN, Z., STOAKES, L., STEVENS, D.L., SCHIEVEN, B.C., LANNIGAN, R. y JONES, C. (1986). "Comparison of the Microscan System with the API Staph-Ident System for species identification of coagulase-negative staphylococci", J. Clin. Microbiol., 23: 126-128.

IGIMI, S., KAWAMURA, S., TAKAHASHI, E. y MITOSUOKA, T. (1989). "Staphylococcus felis, a new species from clinical specimens from cats", Int. J. Syst. Bacteriol., 39: 373-377.

IGIMI, S., TAKAHASHI, E. y MITOSUOKA, T. (1990). "Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis", Int. J. Syst. Bacteriol., 40: 409-411.

JABES, D., NACHMAN, S. y TOMASZ, A. (1989). "Penicillin-binding protein families: evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci", J. Infect. Dis., 159: 16-25.

JACOBY, G.A. (1986). "Resistance Plasmids of Pseudomonas", en J.R. Sokatch (ed.), The Bacteria: A Treatise on Structure and Function, vol. X, Academic Press, Nueva York, pp. 265-293.

JEFFERSON, S. y PARISI, J.T. (1979). "Bacteriophage typing of coagulase-negative staphylococci", J. Clin. Microbiol., 10: 396-397.

JEFFRIES, L. (1969). " Menaquinones in the classification of Micrococcaceae with observations on the application of lysozyme and novobiocin sensitivity tests", Int. J. Syst. Bacteriol., 19: 183-187.

JEFFRIES, L., CAWTHORNE, M.A., HARRIS, M., COOK, B. y DIPLOCK, .T. (1968). "Menaquinone determination in the taxonomy of Micrococcaceae", J. Gen. Microbiol., 54: 365-380.

JELJASZEWICZ, J. (1960). "Studies on staphylococcal coagulases.VI. Appearance of various toxic and biochemical factors among coagulase-negative and coagulase-positive strains of staphylococci", Med. Dosw. Mikrobiol., 12: 33-41.

JEPSEN, O.B. y MORTENSEN, N. (1980). "Prevalence of nosocomial infection and infection control in Denmark", J. Hosp. Infect., 1: 237-244.

JOHN, J.F., GRAMLING, P.K. y O'DELL, N.M. (1978). "Species identification of coagulase-negative staphylococci from urinary tract isolates", J. Clin. Microbiol., 8: 435-437.

JONES, R.N., BARRY, A.L., GAVAN, T.L. y WASHINGTON, J.A. (1985). "Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures", en E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler y H.J. Shadomy (eds.), Manual of Clinical Microbiology, 4ª ed., American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 972-977.

KALLINGS, L.O., LINDBERG, A.A. y SJOBERG, L. (1968). "Phage typing of *Shigella sonnei*", Arch. Immunol. Ther. Exp., 16: 280.

IKATSATIYA, S., CAPRIOLI, T. y CHAMPOUX, S. (1978). "Bacteriophage typing scheme for *Salmonella infantis*", J. Clin. Microbiol., 10: 637-640.

KILPPER-BÄLZ, R. y SCHLEIFER, K.H. (1981). "Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* Foubert and Douglas to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) comb. nov.", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. Orig. C, 2: 324-331.

KIMURA, M. (1983). The neutral theory of molecular evolution, Cambridge University Press, Cambridge.

KIRCHHOFF, L.V. y SHEAGREN, J.N. (1985). "Epidemiology and clinical significance of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococcus", Infect. control Hosp. Epidemiol., 6: 479-486.

KLEBS, E. (1872). Beiträge zur pathologischen anatomie der Schusswunde. Vogel, Leipzig.

KLECK, J.L. y DONAHUE, J.H. (1968). "Production of thermostable haemolysin by cultures of *Staphylococcus epidermidis*", J. Infect. Dis., 181: 317-323.

KLESIOUS, P.H. y SCHUHARDT, V.T. (1968). "Use of lysostaphin in the isolation of highly polymerized deoxyribonucleic acid and in the taxonomy of aerobic Micrococcaceae", J. Bacteriol., 95: 739-743.

KLOOS, W.E. (1980). "Natural populations of the genus *Staphylococcus*", Annu. Rev. Microbiol., 34: 559-592.

KLOOS, W.E., MUSSELWHITE, M.S. y ZIMMERMAN, R.J. (1976a). "A comparison of the distribution of *Staphylococcus* species on human and animal skin", en J. Jeljaszewicz (ed.), Staphylococci and

Staphylococcal Diseases, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 967-973.

KLOOS, W.E. y SCHLEIFER, K.H. (1975a). "Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Description of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*", Int. J. Syst. Bacteriol., 25: 62-79.

KLOOS, W.E. y SCHLEIFER, K.H. (1975b). "Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species", J. Clin. Microbiol., 1: 82-88.

KLOOS, W.E., SCHLEIFER, K.H. y SMITH, R.F. (1976b). "Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies", Int. J. Syst. Bacteriol., 26: 22-37.

KLOOS, W.E. y SCHLEIFER, K.H. (1983). "*Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear", Int. J. Syst. Bacteriol., 33: 9-14.

KLOOS, W.E., TORNABENE, T.G. y SCHLEIFER, K.H. (1974). "Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species *Micrococcus lylae* and *Micrococcus Kriistinae*", Int. J. Syst. Bacteriol., 24: 79-101.

KLOOS, W.E. y WOLFSHOHL, I.F. (1982). "Identification of *Staphylococcus* species with API STAPH-IDENT System", J. Clin. Microbiol., 16: 509-516.

KOONTZ, F. y PFALLER, M. (1989). "Coagulase-Negative Staphylococci: Why and When to Do What", Clinical Microbiology Newsletter, 11: 125-128.

KRIKLER, S.J., PENNINGTON, T.H. y PETRIE, D. (1986). "Typing of strains of *Staphylococcus aureus* by western blot analysis of culture supernates", J. Med. Microbiol., 21: 169-171.

KRISTINSSON, K.G. (1989). "Adherence of staphylococci to intravascular catheters", J. Med. Microbiol., 28: 249-257.

KUUSELA, P. (1978). "Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*", Nature, 276: 718-720.

LACEY, R.W., KEYWORD, N. y LINCOLN, C. (1984). "Staphylococci in the U.K.: a review", J. Antimicrob. Chemother., 14: 19-25 (supl. D).

LEVONTIN, R.C. (1974). The genetic basis of evolutionary change, Columbia University Press, Nueva York.

LEVIN, M.H., WEINSTEIN, R.A., NATHAN, C., SELANDER, R.K., OCHMAN, H. y KABINS, S.A. (1984). "Association of infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* serotype 0:11 with intravenous abuse of pentazocine mixed with tripeleennamine", J. Clin. Microbiol., 20: 758-762.

LIDWELL, O.M. (1959). "Apparatus for phage-typing of *Staphylococcus aureus*", Mth. Bull. Minist. Hlth., 108: 195-204.

LINDBERG, R.B. y LATTA, R.L. (1974). "Phage typing of *Pseudomonas aeruginosa* : Clinical and epidemiologic considerations", J. Infect. Dis., 130: 33-42 (sup.).

LISTER, J. (1867). "On a new method of treating compound fractures, abscess and so forth. With observations on the conditions of suppuration", Lancet, i: 326, 357, 387.

LORIAN, V., ZAK, O., SUTER, J. y BREUCHER, C. (1985). "Staphylococci 'in vivo' and 'in vitro'", Diag. Microbiol. Infect. Dis., 3: 433-444.

LOSNEGARD, N. y OEDING, P. (1963). "Immunochemical studies on polysaccharides from *Staphylococcus epidermidis*. I. Isolation and chemical characterization", A.P.M.I.S., Sect.B, 58: 482-492.

LUDLAM, H.A., NOBLE, W.C., MARPLES, R.R., BAYSTON, R. y PHILLIPS, I. (1989b). "The epidemiology of peritonitis caused by coagulase-negative staphylococci in continuous ambulatory peritoneal dialysis", J. Med. Microbiol., 30: 167-174.

LUDLAM, H.A., NOBLE, W.C., MARPLES, R.R. y PHILLIPS, I. (1989a). "The evaluation of a typing scheme for coagulase-negative staphylococci suitable for epidemiological studies", J. Med. Microbiol., 30: 161-165.

LUDWICKA, A. JANSEN, B., WADSTRÖM, T. y PULVERER, G. (1984a). "Attachment of staphylococci to various synthetic polymer", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hvg., I Abt. Orig. A, 256: 479-489.

LUDWICKA, A., UHLENBRUCK, G., PETERS, G., SENG, P.N., GRAY, E.D., JELJASZEWICZ, J. y PULVERER, G. (1984b). "Investigation on extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hvg., I Abt. Orig. A, 258: 256-267.

LUND, E. y HENRIKSEN, J.L. (1978). "Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*", en T. Bergan y J.R. Norris (eds.), Methods in Microbiology, vol. 12, Academic Press, Nueva York, pp. 1-14.

LYON, B.R. y SKURRAY, R. (1987). "Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* : Genetic basic", Microbiol. Rev., 51: 88-1134.

MAGGS, A.F. y PENNINGTON, T.H. (1989). "Temporal study of staphylococcal species on the skin of human subjects in isolation and clonal analysis of *Staphylococcus capitis* by sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis", J. Clin. Microbiol., 27: 2627-2632.

MARPLES, R.R., HONE, R., NOTLEY, C.M., RICHARDSON, J.F., CREES-MORRIS, J.A. (1978). "Investigation of coagulase-negative staphylococci from infections in surgical patients", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. Orig. A, 241: 140-156.

MARRIE, T.J. y COSTERTON, J.W. (1984). "Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters", J. Clin. Microbiol., 19: 687-693.

MARRIE, T.J., NELLIGAN, J. y COSTERTON, J.W. (1982). " a scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead", Circulation 66, 1339-1341.

MARSIK, F.J. y PARISI, J.T. (1971). "Bacteriophage types and O antigen groups of *Escherichia coli* from urine", Appl. Microbiol., 22: 26.

MATTHEWS, R.C., LEE, W., BURNIE, J.P. y BAYSTON, R. (1987). "Fingerprinting *S. epidermidis* ", J. Med. Microbiol., (abstract), enero, p. 231.

MAYON-WHITE, R.T., DUCEL, G., KERESLIDZE, T. y TIKOMIROV, E. (1988). "An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection", J. Hosp. Infect., 11: 43-48 (sup. A).

Mc GOWAN, J.E. (1981). "Environmental factors in nosocomial infection. A selective focus", Rev. Infect. Dis., 3: 760-769.

Mc GOWAN, J.E., WEINSTEIN, R.A. y MALLISON, G.F. (1986). "The role of the laboratory in control of nosocomial infection" en J.V. Bennett y P.S. Brachman (eds.), Hospital Infections, Little, Brown and Co. Inc., Boston, pp. 113-135.

Mc HUGH, G.L., MOELLERING, R.C., HOPKINS, C.C. y SWARTZ, M.N. (1975). "Salmonella tiphimurium resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin", Lancet, 1: 235-239.

MEERS, P.D., AYLIFFE, G.A.J., EMMERSON, A.M., LEIGH, D.A., MAYON-WHITE, R.T., MACKINTOSH, C.A. y STRONGE, J.L. (1981). "Report on the National Survey of Infection in Hospitals, 1980", J. Hosp. Infect., 2: 1-53 (sup.).

MEITERT, T. y MEITERT, E. (1978). "Usefulness, applications and limitations of epidemiological typing methods to elucidate nosocomial infections and the spread of communicable diseases", en T. Bergan y J.R. Norris (eds.), Methods in Microbiology, Academic Press, Nueva York, pp. 1-38.

MICKELSEN, P.A., FLORDE, J.J., GORDON, K.P., HARGISS, C., Mc CLURE, J., SCHOENKNECHT, F.D., CONDIE, F., TENOVER, F.C. y TOMPKINS, L.S. (1985). "Instability of antibiotic resistance in a strain of *Staphylococcus epidermidis* isolated from an outbreak of prosthetic valve endocarditis", J. Infect. Dis., 152: 50-58.

MITCHELL, R.G. y BAIRD-PARKER, A.C. (1967). "Novobiocin resistance and the classification of staphylococci and micrococci", J. Appl. Bacteriol., 30: 251-254.



MORO, M.L., STAZI, M.A., MARASCA, G., GRECO, D. y ZAMPIERI, A. (1986). "National prevalence survey of hospital-acquired infections in Italy, 1983", J. Hosp. Infect., 8: 72-85.

MORRIS, G.K. y WELLS, J.G. (1974). "Colicin typing of *Shigella sonnei*", Appl. Microbiol., 27: 312-316.

MORSE, S.I. (1962). "Studies on the chemistry and immunochemistry of cell walls of *Staphylococcus aureus*", J. Exp. Med., 116: 229-245.

MORSE, S.I. (1963). "Isolation and properties of a group antigen of *Staphylococcus albus*", J. Exp. Med., 117: 19-26.

MORTENSEN, N. (1973). "Characterization of staphylococci and micrococci by carbohydrate break down tests", en J. Jeljaszewicz (ed.), Staphylococci and Staphylococcal Diseases, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 38-40.

MORTENSEN, N. y KOCUR, M. (1967). "Correlation of DNA base composition and acid formation from glucose of staphylococci and micrococci", A.P.M.I.S., Sect. B, 69: 445-457.

MURAKAMI, K., NOMURA, K., DOI, M. y YOSHIDA, T. (1987). "Production of low-affinity penicillin-binding protein by low- and high-resistance groups of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", Antimicrob. Agents Chemother., 31: 1307-1311.

MYERS, J.A., SANCHEZ, D., ELWELL, L.P. y FALKOW, S. (1976). "Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid", J. Bacteriol., 127: 1529-1537.

NCCLS, (1990). "1990 NCCLS Susceptibility Documents", The Antimicrobial Newsletter, 7: 25-32.

NOBLE, W.C. (1983). "The new hospital epidemiology", J. Hyg. Camb., 91: 1-15.

OCHMAN, H., WHITTAM, T.S., CAUGANT, D.A. y SELANDER, R.K. (1983). "Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*", J. Gen. Microbiol., 129: 2715-2726.

OGSTON, A. (1880). "Über Abscesse", Arch. Klin. Chir., 25: 588-600.

ONOKODI, J.K. y WALTERS, G. (1981). "Capsular typing of *Klebsiella* by coagglutination and agglutination", J. Clin. Microbiol., 13: 609-612.

PARISI, J.T. (1985). "Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*", Microbiol. Rev., 49: 126-139.

PARISI, J.T. (1986). "Epidemiologic markers in *Staphylococcus epidermidis*", en L.L. Leive (ed.), Microbiology, American society for Microbiology, Washington D.C., pp. 139-144.

PARISI, J.T. y HECHT, D.W. (1980). "Plasmid profiles in epidemiologic studies of infections by *Staphylococcus epidermidis*", J. Infect. Dis., 141: 637-643.

PARISI, J.T., LAMPSON, B.C., HOOVER, D.L. y KHAN, J.A. (1986). "Comparison of epidemiologic markers for *Staphylococcus epidermidis*", J. Clin. Microbiol., 24: 56-60.

PARKER, M.T. (1978). "Hospital-acquired infections: guidelines to laboratory methods", WHO Regional Publication, European Series nº 4.

PASSET, J. (1885). "Über Mikroorganismen der eiterigen Zellgewebsentzündung des Menschen", Fortschr. Med., 3: 33-43.

PASTEUR, L. (1880). "De l'extension de la théorie des germes à l'étiologie de quelques maladies communes", Compt. Rend., 90: 1033-1044.

PELZER, K.G., PULVERER, G., JELJASZEWICZ, J. y PILLICH, J. (1973). "Modification of Baird-Parker's classification system of *Staphylococcus albus*", Med. Microbiol. Immunol., 158: 249-257.

PENNER, J.L., y HENNESSY, J.N. (1979). "O-antigen grouping of *Morganella morgani* (*Proteus morganii*) by slide agglutination", J. Clin. Microbiol., 10: 8-13.

PEREIRA, A.T. (1962). "Coagulase-negative strains of *Staphylococcus* possessing antigen 51 as agents of urinary tract infection", J. Clin. Pathol., 15: 252-253.

PETERS, G., LOCCI, R. y PULVERER, G. (1982). "Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters", J. Infect. Dis., 146: 479-482.

PETERS, G., LOCCI, R. y PULVERER, G. (1981). "Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. Orig. B. 173: 293-299.

PETERS, G., SABOROWSKI, F., LOCCI, R. y PULVERER, G. (1984). "Investigation on staphylococcal infection of intravenous endocardial pacemaker-electrodes", Am. Heart J., 108: 359-364.

PFALLER, M.A. y HERWALDT, L.A. (1988). "Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci", Clin. Microbiol. Rev., 1: 281-299.

PFALLER, M.A. y HOLLIS, R.J. (1989). "Use of plasmid profiles and restriction endonuclease analysis of plasmid DNA as epidemiologic and diagnostic tools in the clinical microbiology laboratory", Clinical Microbiology Newsletter, 11: 137-140.

PILLET, J. y ORTA, B. (1954). "Recherches sur la composition antigenique des staphylocoques non pathogenes. I. Mise en evidence d'agglutinogenes specifiques et d'un agglutinogene commun aux souches pathogenes et non pathogenes", Ann. Inst. Pasteur, 86: 752-758.

PITT, T.L. (1982). "State of the art: typing of *Serratia marcescens*", J. Hosp. Infect., 3: 9-14.

PLESIAT, P., ALKHOLOF, B. y MICHAL-BRIAND, Y. (1988). "Prevalence and profiles of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa*", Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 7: 261-264.

PRAT MARIN, A., ASENJO SEBASTIAN, M.A., CANELA SOLER, J., CANELA ARQUES, R., OROMI DURICH, J. y GONZALEZ FUSTE, F. (1988). "Estudio de incidencia de la infección nosocomial", Rev. San. Hig. Pub., 62: 1765-1773.

PULVERER, G. y PILLICH, J. (1971). "Pathogenic significance of coagulase-negative staphylococci", en M. Finland, W. Marget y K. Bartmann (eds.), Bacterial Infections, Springer-Verlag, Nueva York, pp. 91-96.

PULVERER, G., PILLICH, J. y HAKLOVA, M. (1976). "Phage-typing set for the species *Staphylococcus albus*", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. Orig. A, Suppl. 5: 153-157 (sup.).

PULLVERER, G., PILLICH, J. y KLEIN, A. (1975). "New bacteriophages of *Staphylococcus epidermidis*", J. Infect. Dis., 132: 524-531.

PULLVERER, G., PILLICH, J. y KRIVANKOVA, M. (1973). "Differentiation of coagulase-negative staphylococci by bacteriophage typing", en J. Jeljaszewicz (ed.), Staphylococci and Staphylococcal Infections, S. Karger, Basilea, pp. 503-508.

RAAHN, O. (1929). "Contributions to the classification of bacteria. IVV. Intermediate forms", Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. III, 78: 8-10.

REECKLINGHAUSEN, N.D. von. (1871). Citado en W. von Lingelsheim (1990). Ätiologie und Therapie der Staphylokokkeninfektionen, Urrban and Schwarzenberg, Berlin.

RENAUD, F., FRENEY, J., ETIENNE, J., BES, M., BRUN, Y., BARSOTTI, O.J., ANDRE, S., y FLEURETTE, J. (1988). "Restriction endonuclease analysis of *Staphylococcus epidermidis* DNA may be a useful epidemiological marker", J. Clin. Microbiol., 26: 1729-1734.

RENNIE, R.P., NORD, C.E., SJOBERG, L. y DUNCAN, I.B.R. (1978). "Comparison of bacteriophage typing, serotyping, and biotyping as aids in epidemiological surveillance of *Klebsiella* infections", J. Clin. Microbiol., 8: 638-642.

RICHARDSON, J.F. y MARPLES, R.R. (1987). "Phage typability of coagulase-negative staphylococci in relation to antibiotic resistance", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. Orig. A, Suppl. 16: 235-246.

FROSDAHL, V.T., GAHRN-HANSEN, B., MØLLER, J.K. y JØKELDGAARD, P. (1990). "Phage-typing of coagulase-negative staphylococci", A.P.M.I.S., 98: 299-304.

ROSENBACH, F.J. (1884). Mikroorganismen bei den Wundinfektionskrankheiten des Menschen, J.F. Bergmann, Wiesbaden.

ROUSSEAU, D., DAUBREZ, C., DELHALIE, E. y OSTERRIETH, P. (1990). "SDS-PAGE of outer-membrane proteins of *Serratia marcescens* as a means to identify clones among the biotypes (preliminary study)", en 2nd International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Ascent Ltd., Atenas, p. 195.

SCHABERG, D.R. y ZERVOS, M.J. (1986). "Plasmid analysis in the study of the epidemiology of nosocomial gram-positive cocci", Rev. Infect. Dis., 8: 705-712.

SCHLEIFER, K.H. y FISCHER, U. (1982). "Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*", Int. J. Syst. Bacteriol., 32: 153-156.

SCHLEIFER, K.H., GEYER, U., KILPPER-BÄLZ, R. y DEVRIESE, L.A. (1983). "Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus* (Kloos et al) to species status: *Staphylococcus lentus* (Kloos et al.) comb. nov.", Syst. Appl. Microbiol., 4: 382-387.

SCHLEIFER, K.H., KILPPER-BÄLZ, R. y DEVRIESE, L.A. (1984). "*Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov.: three new coagulase-negative staphylococci from animals", Syst. Appl. Microbiol., 5: 501-509.

SCHLEIFER, K.H., KILPPER-BÄLZ, R., FISCHER, U., FALLER, A.H. y ENDL, J. (1982). "Identification of '*Micrococcus candidus*' ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of '*Micrococcus caseolyticus*' ATCC 13548 and '*Micrococcus varians*' ATCC 29750 as members of a new species, *Staphylococcus caseolyticus*", Int. J. Syst. Bacteriol., 32: 15-20.

SCHLEIFER, K.H. y KLOOS, W.E. (1975a). "Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended description of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*", Int. J. Syst. Bacteriol., 25: 50-61.

SCHLEIFER, K.H. y KLOOS, W.E. (1975b). "A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci", J. Clin. Microbiol., 1: 337-338.

SCHLEIFER, K.H., MEYER, S.A. y RUPPRECHT, M. (1979). "Relatedness among coagulase-negative staphylococci: deoxyribonucleic acid reassociation and comparative studies", Arch. Microbiol., 122: 93-1001.

SCHMIDT, W.C. y JEFFRIES, C.D. (1975). "Bacteriophage typing of gram negative rod-shaped bacteria", CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 6: 201-246.

SCHUMACHER-PERDREAU, F., ROTERING, H. y PULVERER, G. (1983). "Cell wall analysis taxonomy of staphylococci", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. Orig. A, 256: 25-36.

SKAHAN, J.M. y PARISI, J.T. (1977). "Development of a bacteriophage-typing set for *Staphylococcus epidermidis*", J. Clin. Microbiol., 6: 16-18.

SKERMAN, V.B.D., Mc GOWAN, V. y SNEATH, P.H.A. (1980). "Approved lists of bacterial names", Int. J. Syst. Bacteriol., 30: 225-240.

SKULNICK, M. y cols. (1987). Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., abstr. nº c 103, p. 340.

SELANDER, R.K., CAUGANT, D.A., OCHMAN, H., MUSSER, J.M., GILMOUR, M.N. y WHITTAM, T.S. (1986). "Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics", Appl. Environ. Microbiol., 51: 873-884.

SEMMELWEIS, I.P. (1941). "The etiology, the concept and the prophylaxis of childbed fever", Medical Classics, 5: 350.

SENIOR, B.W. (1977). "Typing of *Proteus* strains by proticine production and sensitivity", J. Med. Microbiol., 10: 7-17.

SMITH, P.B. (1972). "Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*", en J.O. Cohen (ed.), The Staphylococci, Wiley Interscience, Nueva York, pp. 431-442.

SMITH, D.J., KAPLAN, R.L., LANDAU, W. y TRENHOLME, G.M. (1982). "Speciation and antibiotic susceptibility patterns of coagulase-negative staphylococci", Eur. J. Clin. Microbiol., 1: 228-232.

SOMERVILLE, P.C., NHLAPO, W.M. y ALBERTS, M. (1983). "Differentiation of *Salmonella typhi* using resistotyping", J. Appl. Bacteriol., 54: 171-176.

SOMPOLINSKY, D. (1953). "De l'impetigo contagiosa suis et du *Micrococcus hyicus* sp.", Schweiz. Arch. Tierheilk., 95: 302-309.

SOMPOLINSKY, D., SAMRA, S. KARAKAWA, W.W., VANN, W.F., SCHENEERSON, R. y MALEK, Z. (1985). "Encapsulation and capsular types in isolates of *S. aureus* from different sources and relationship to phage types", J. Clin. Microbiol., 22: 828-834.

SPEZIALE, P., HÖÖK, M. y WADSTRÖM, T. (1985). "Binding of type I collagen to staphylococci", en J. Jeljaszewicz (ed.), The Staphylococci Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 191-196.

STTRUELENS, M.J., DEPLANO, A., MAAS, A. y SERRUYS, E. (1990). "PPlasmid profile, biotype and antibiotic resistance markers for thhe study of an outbreak of coagulase-negative staphylococci", en 2nd International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers, Asciscent Ltd., Atenas, p. 79.

SWWANSTROM, M. y ADAMS, M.H. (1951). "Agar layer method for pproduction of high titer phage stocks", Proc. Soc. Exptl. Biol. Meed., 7: 372-375.

SWWITALSKI, L.M., RYDÉN, C., RUBIN, K., LJUNGH, Å., HÖÖK, M. y WADSTRÖM, T. (1983). "Binding of fibronectin to *Staphylococcus* strains", Infect. Immun., 42: 628-633.

TAKAUCHI, S., KOBAYASHI, Y., MOROZUMI, T. y MORI, Y. (1987). "FProtein A in *Staphylococcus hyicus* subsp *hyicus* isolates from pigs, chickens and cows", Nippon Juigaku Zasshi, 50: 153-157.

TALBOT, M. W. y PARISI, J.T. (1976). "Phage typing of *Staphylococcus epidermidis* ", J. Clin. Microbiol., 3: 519-523.

TENNENT, J.M., MAY, J.W. y SKURRAY, R.A. (1984). "Multiple antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* : plasmids in strains associated with nosocomial infection", Pathology, 16: 250-255.

TENOVER, F.C. (1985). "Plasmid fingerprinting: a tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections", Clin. Lab. Med., 5: 413-436.

THOMPSON, R.L. (1987). "Surveillance and reporting of nosocomial infections", en R.P. Wenzel (ed.), Prevention and Control of Nosocomial Infections, The Williams and Wilkins Co. Inc., Baltimore, pp. 70-82.

THOMSON-CARTER, F.M., CARTER, P.E. y PENNINGTON, T.H. (1989). "Differentiation of staphylococcal species and strains by ribosomal RNA gene restriction patterns", J. Gen. Microbiol., 135: 2093-2097.

THOMSON-CARTER, F.M. y PENNINGTON, T.H. (1989). "Characterization of coagulase-negative staphylococci by sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis and immunoblot analysis", J. Clin. Microbiol., 27: 2199-2203.

VALENTINE, C.R., YANDLE, S.H., MARSIK, F.J., EBRIGHT, J.R. y DAWSON, M.S. (1988). "Evaluation of the variety of plasmid profiles in *S. epidermidis* isolates from hospital patients and staff", Infect. Control Hosp. Epidemiol., 9: 441-446.

VAN BOVEN, C.P.A. (1976). "Phage typing of *Staphylococcus epidermidis*", en J. Jeljaszewicz (ed.), Staphylococcus and Staphylococcal Diseases, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 149-152.

VAN BOVEN, C.P.A., VERHOEF, J. y WINKLER, K.C. (1969). "Bacteriophage typing of coagulase-negative staphylococci", J. Microbiol. Serol., 35: 232.

VARALDO, P.E., KILPPER-BÄLZ, R., BIAVASCO, F., SATTI, G. y SCHLEIFER, K.H. (1988). "*Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins", Int. J. Syst. Bacteriol., 38: 436-439.

VERHOEF, J., VAN BOVEN, C.P.A. y WINKLER, K.C. (1971). "Characters of phages from coagulase-negative staphylococci", J. Med. Microbiol., 4: 413-424.

VERRHOEF, J., VAN BOVEN, C.P.A. y WINKLER, K.C. (1972). "Phage-typing of coagulase-negative staphylococci", J. Med. Microbiol., 5: 9-19.

VIKDEL, A., MARTÍN-BOURGON, C. y SÁEZ-NIETO, J.A. (1987). "Characterization of non-typable strains of *Staphylococcus aureus* from cases of hospital infection", Epidemiol. Infect., 99: 191-2000.

WAARDSTRÖM, T., KJELLGREN, M. y LJUNGH, Å (1976). "Extracellular proteins from different staphylococcal species. A preliminary study", Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg., I Abt. Orig. A, Suppl. 5: 623-633.

WAATANAKUNAKORN, C. y HAMBURGER, C.M. (1970). "*Staphylococcus epidermidis* endocarditis complicating a Starr-Edwards prothesis", Arch. Inter. Med., 126: 1014-1020.

WAATTS, J.L., OWENS, W.E. y NICKERSON, S.C. (1986). "Evaluation of the Minitex gram-positive set for identification of staphylococci isolated from the bovine mammary gland", J. Clin. Microbiol., 23: 8773-8775.

WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD (1985). "Nosocomial Infections", vol. 60, nº 37, pp. 281-283.

WEINSTEIN, R.A. y MALLISON, G.F. (1978). "The role of the microbiology laboratory in surveillance and control of nosocomial infections", Am. J. Clin. Pathol., 69: 130.

WENZEL, R.P., OSTERMAN, C.A., DONOWITZ, L.G., HOYT, J.W., SANDE, M.A.A., MARTONE, W.J., PEACOCK Jr, J.E., LEVINE, J.J. y MILLER Jr, G.B. (1981). "Identification of procedure-related nosocomial infections in high-risk patients", Rev. Infect. Dis., 3: 701-707.

WILKINSON, B.J. (1983). "Staphylococcal capsules and slime", en C.S.F. Easmon y C. Adlam (eds.), Staphylococci and Staphylococcal Infections, vol. 2, Academic Press, Nueva York, pp. 481-524.

WILLIAMS, R.E.O. y RIPPON, J.E. (1952). "Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*", J. Hyg. Camb., 50: 320-353.

WILLIAMS, W.W. (1983). "CDC guideline for infection control in hospital personnel", Infect. Control Hosp. Epidemiol., 4: 326-349.

WINSLOW, C-E.,A. Y ROGERS, A.F. (1906). "A statistical study of generic characters in the Coccaceae", J. Infect. Dis., 3: 485-546.

WINSLOW, C-E.,A., ROTHBERG, N. y PARSONS, E-I. (1920). "Notes on the classification of the white and orange staphylococci", J. Bacteriol., 5: 145-168.

WINSLOW, C-E.,A. y WINSLOW, A.R. (1908). The systematic relationships of the Coccaceae, John Wiley, Nueva York.

YOUNG, E.J. y MUSHER, D.M. (1978). "General principles for the clinical recognition of hospital-associated (nosocomial) infections", en W.J. Fahlberg y D. Gröschel (eds.), Occurrence diagnosis and sources of hospital-associated infections, Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 13-36.
