

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**APLICACION DE MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS  
EN LA EVALUACION MICROBIOLÓGICA DE  
AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus sp.*  
COAGULASA NEGATIVOS EN HEMOCULTIVOS**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> Teresa Boquete Blanco**

**Madrid, 1996**

*A la memoria de mi hermano José Agustín*

*A mi hijo José Agustín*

*A mi hermano David*

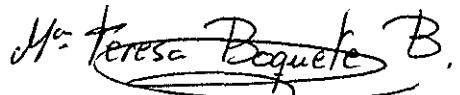
*A mis padres*

Esta tesis ha sido realizada en el Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III por M<sup>a</sup> Teresa Boquete Blanco, bajo la dirección del Dr. Juan Antonio Sáez Nieto, Jefe del referido Servicio y ha tenido como ponente a la Dra. Josefina Rodríguez de Lecea, Profesora Titular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

El Director de la Tesis



Dr. Juan Antonio Sáez Nieto



Fdo. M<sup>a</sup> Teresa Boquete Blanco

## AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la colaboración de numerosas personas y a todas ellas quiero expresar mi agradecimiento.

De una forma muy especial al Dr. Juan Antonio Sáez Nieto, que fue la persona que me abrió las puertas del mundo de la microbiología y gracias a su inestimable apoyo y estímulo consiguió animarme a realizar este trabajo.

A la Dra. Rodríguez de Lecea, por haber accedido a ser la ponente de esta tesis.

Al Dr. Oscar del Valle y a la Dra. Planes, microbiólogos hospitalarios que me proporcionaron la materia prima con la que fue posible que esta tesis se llevara a cabo.

Al Central Public Health Laboratory, y en particular al Dr. Pitt porque gracias a ellos aprendí la metodología de la electroforesis en campo pulsado.

A la Dra. Ana Vindel, por todos los consejos y ayuda incondicional que me ha ofrecido a lo largo de todos estos años.

A mis compañeras Pilar Trincado, Eloisa Gomez y Luisa Azañedo por ofrecerme todo su apoyo y ayuda en los momentos que más lo necesitaba.

#### IV

A la Dra. Pilar Aparicio, por ser una fuente inestimable de consejos y por aportarme la visión clínica necesaria para abordar la problemática planteada en esta tesis.

A mi amiga Paloma Rius por revisar la expresión literaria de esta tesis, pero especialmente porque siempre he podido contar con ella.

A mi amiga Dolores Vicioso, porque cuando las fuerzas ya me habían abandonado estuvo conmigo para echarme una mano.

A todos mis compañeros del Servicio de Bacteriología y en particular a aquellos que de una manera u otra siempre estuvieron disponibles cuando los necesité: Laura de la Fuente, Sonsoles Berrón, Julio Vázquez, Elena Martín, Pedro Anda, Manuela de la Fuente, Miguel Angel Usera, Aurora Echeita , Carmen Pelaz y Asunción Fenoll.

A mis padres y hermano porque, sin lugar a duda, junto con mi hijo fueron los que más soportaron mis momentos de irascibilidad y mal humor cuando el trabajo no se desarrollaba según yo esperaba.

Y muy especialmente a mi hijo por todas las horas que no pude estar junto a él.

## ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 REVISIÓN HISTÓRICA DEL GÉNERO STAPHYLOCOCCUS .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS ESTAFILOCOCOS</b>	
<b>COAGULASA NEGATIVOS (ECN) .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1 DESCUBRIMIENTO DEL POTENCIAL PATÓGENO DE LOS ECN .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.2 ECN ASOCIADOS A INFECCIONES HUMANAS .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 IMPLICACIÓN DE LOS ECN EN LA INFECCIÓN NOSOCOMIAL .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.1 CRITERIOS UTILIZADOS PARA DETERMINAR EL AGENTE</b>	
<b>ETIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN NOSOCOMIAL .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIONES NOSOCOMIALES .....</b>	<b>16</b>
a) Prevalencia de las infecciones nosomiales .....	16
b) Distribución de los distintos tipos de infecciones	
nosocomiales .....	18
c) Distribución de los principales microorganismos	
patógenos implicados en la infección nosocomial .....	23
<b>1.4 UTILIDAD EPIDEMIOLÓGICA Y CLÍNICA DE LOS MÉTODOS</b>	
<b>DE TIPIFICACIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.1 CRITERIOS PARA EVALUAR UN SISTEMA DE TIPADO .....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.2 CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN .....</b>	<b>26</b>
a) Técnicas fenotípicas .....	27
a.1) Identificación .....	27
a.2) Biotipia .....	30
a.3) Antibiotipia .....	30
a.4) Serotipia .....	31
a.5) Fagotipia .....	31
a.6) Análisis electroforético de proteínas .....	32
b) Técnicas genotípicas .....	33
b.1) Plasmidotipia .....	33
b.2) Análisis molecular de plásmidos .....	34
b.3) Análisis del polimorfismo de los	
fragmentos de restricción .....	34

	b.4) Southern blot de la huella genética DEL ADN cromosómico .....	35
	b.5) Ribotipia .....	36
	b.6) Electroforesis en campo pulsado .....	37
	b.7) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>AISLADOS</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1.1</b>	<b>PROCEDENCIA DE LOS AISLADOS</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1.2</b>	<b>ASPECTOS CLÍNICOS</b> .....	<b>43</b>
a)	Pacientes .....	43
b)	Casos y episodios .....	44
c)	Valoración clínica de los distintos casos .....	44
<b>3.1.3</b>	<b>CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b>IDENTIFICACIÓN</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2.1</b>	<b>ESTUDIO MORFOLÓGICO Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTO</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2.2</b>	<b>ACTIVIDAD COAGULASA</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2.3</b>	<b>NUCLEASA TERMOESTABLE</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2.4</b>	<b>ACTIVIDAD HEMOLÍTICA</b> .....	<b>57</b>
<b>3.2.5</b>	<b>ACTIVIDAD DESOXIRIBONUCLEASA (DNAsa)</b> .....	<b>57</b>
<b>3.2.6</b>	<b>ACTIVIDAD UREASA</b> .....	<b>57</b>
<b>3.2.7</b>	<b>ACTIVIDAD DECARBOXILASA</b> .....	<b>58</b>
<b>3.2.8</b>	<b>ACTIVIDAD FOSFATASA</b> .....	<b>58</b>
<b>3.2.9</b>	<b>PRODUCCIÓN DE ACETILMETILCARBINOL (ACETOINA)</b> .....	<b>59</b>
<b>3.2.10</b>	<b>REDUCCIÓN DE NITRATOS</b> .....	<b>59</b>
<b>3.2.11</b>	<b>FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO</b> .....	<b>60</b>
<b>3.2.12</b>	<b>SUSCEPTIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA</b> .....	<b>61</b>
<b>3.2.13</b>	<b>PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DEL GLICEROL AERÓBICAMENTE EN PRESENCIA DE ERITROMICINA</b> .....	<b>61</b>
<b>3.3</b>	<b>FAGOTIPIA</b>	
<b>3.3.1</b>	<b>PROPAGACIÓN DEL JUEGO DE FAGOS DE "DEAN Y WILLIAMS" Y DEL JUEGO OBTENIDO EN EL C.N.M.V.I.S.</b> .....	<b>62</b>
a)	Determinación del RTD .....	62
b)	Propagación en medio semisólido .....	63
c)	Espectro lítico .....	63

3.3.2	TÉCNICA DE FAGOTIPIA .....	67
	a) Realización .....	67
	b) Lectura de resultados .....	67
	c) Interpretación de los resultados .....	68
	d) Controles .....	68
3.4	TÉCNICA DE FAGOTIPIA INVERSA .....	70
3.5	TÉCNICA DE FISK .....	70
3.6	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS .....	71
3.6.1	AGENTES ANTIMICROBIANOS PROBADOS .....	71
3.6.2	MEDIO, INOCULACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) .....	72
3.6.3	CONTROLES .....	72
3.6.4	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....	73
3.7	PLASMIDOTIPIA .....	74
3.7.1	PREPARACIÓN DE LOS LISADOS .....	74
3.7.2	ELECTROFORESIS DEL ADN PLASMÍDICO .....	75
3.7.3	CONTROLES .....	75
3.8	ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO .....	76
3.8.1	OBTENCIÓN DEL ADN .....	76
3.8.2	DIGESTIÓN DEL ADN .....	77
3.8.3	ELECTROFORESIS .....	77
3.8.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS .....	78
	<u>APÉNDICE: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS</u> .....	79
4	RESULTADOS .....	94
4.1	VALORACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS DE LOS CASOS ESTUDIADOS .....	95
4.1.1	SELECCIÓN DE LOS AISLADOS .....	95
4.1.2	ORIGEN DE LOS AISLADOS .....	95
4.1.3	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES .....	95
4.1.4	VALORACIÓN CLÍNICA DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS POR ECN .....	96
4.1.5	DISTRIBUCIÓN POR ÁREAS DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS ESTUDIADOS .....	96
4.2	IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS .....	97
4.3	ANÁLISIS DE LOS AISLADOS MEDIANTE FAGOTIPIA .....	99
4.3.1	PROPORCIÓN DE TIPABILIDAD .....	99
4.3.2	PATRONES OBTENIDOS POR FAGOTIPIA CON EL JUEGO DE FAGOS COMBINADO .....	100

4.3.3	FRECUENCIAS DE PATRONES DE FAGOTIPIA	102
4.3.4	FRECUENCIAS DE REACCIÓN DE LOS FAGOS	102
4.4	ANÁLISIS DE LOS AISLADOS MEDIANTE FAGOTIPIA INVERSA	104
4.4.1	PROPORCIÓN DE TIPABILIDAD	104
4.4.2	PATRONES DE FAGOTIPIA INVERSA	104
4.4.3	FRECUENCIA DE PATRONES DE FAGOTIPIA INVERSA	106
4.5	UTILIZACIÓN DE UN JUEGO DE FAGOS ADICIONALES PARA LA TIPIFICACIÓN DE LOS ECN	107
4.5.1	PROPORCIÓN DE TIPABILIDAD	107
4.5.2	PATRONES DE FAGOTIPIA OBTENIDOS CON EL JUEGO DE FAGOS ADICIONALES	107
4.6	ANÁLISIS DE LOS AISLADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE FISK	108
4.6.1	PROPORCIÓN DE TIPABILIDAD	108
4.6.2	PATRONES DE FAGOTIPIA OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE FISK	108
4.7	EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE FAGOTIPIA EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS	109
4.8	SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	110
4.9	CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE MARCADORES FENOTÍPICOS	115
4.10	ANÁLISIS PLASMÍDICO	116
4.10.1	NÚMERO DE PLÁSMIDOS PRESENTES EN LOS AISLADOS	116
4.10.2	TAMAÑO DE LOS PLÁSMIDOS	117
4.10.3	PERFILES PLASMÍDICOS	119
4.11	ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO	121
4.11.1	DETERMINACIÓN DE LA ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN ÓPTIMA	121
4.11.2	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ELECTROFORESIS	121
4.11.3	PERFILES DE RESTRICCIÓN OBTENIDOS POR ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)	123
4.12	VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS CASOS	130
4.12.1	CRITERIOS SEGUIDOS EN EL LABORATORIO PARA DETERMINAR CUANDO DOS CEPAS SON IGUALES	131
4.12.2	DESCRIPCIÓN DE LAS DISTINTAS SITUACIONES ENCONTRADAS AL VALORAR LOS CASOS DESDE UN PUNTO DE VISTA MICROBIOLÓGICO	142
4.12.3	PORCENTAJE DE CASOS EN LOS QUE CON LA APLICACIÓN SUCESIVA DE LOS MARCAORES EPIDEMIOLÓGICOS SE HAN PODIDO ESTABLECER SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE AISLADOS DE UN MISMO PACIENTE	144

4.13	COMPARACIÓN ENTRE LA VALORACIÓN CLÍNICA Y LA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA .....	145
5	DISCUSIÓN .....	148
5.1	VALORACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS DE LOS CASOS ESTUDIADOS ....	150
5.2	VALORACIÓN DE LOS MARCADORES FENOTÍPICOS EN EL ANÁLISIS DE LOS AISLADOS DE ECN .....	151
5.2.1	ANÁLISIS DE LOS AISLADOS POR FAGOTIPIA .....	151
5.2.2	ANÁLISIS DE LOS AISLADOS POR FAGOTIPIA INVERSA .....	155
5.2.3	ANÁLISIS DE LOS AISLADOS POR FAGOTIPIA CON EL JUEGO DE FAGOS ADICIONALES .....	156
5.2.4	ANÁLISIS DE LOS AISLADOS POR LA TÉCNICA DE FISK .....	156
5.2.5	ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS A LOS ANTIMICROBIANOS .....	157
5.3	VALORACIÓN DE LOS MARCADORES FENOTÍPICOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS .....	160
5.4	VALORACIÓN DE LOS MARCADORES GENOTÍPICOS EN EL ANÁLISIS DE LOS AISLADOS DE ECN .....	161
5.4.1	ANÁLISIS DE LOS AISLADOS MEDIANTE PLASMIDOTIPIA .....	161
5.4.2	ANÁLISIS DEL ADN DE LOS AISLADOS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO .....	165
5.5	VALORACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS EN BASE A LOS DATOS MICROBIOLÓGICOS Y CLÍNICOS .....	168
5.5.1	VALORACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS EN BASE A LOS DATOS MICROBIOLÓGICOS .....	168
5.5.2	COMPARACIÓN ENTRE LA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA Y CLÍNICA DE LAS BACTERIEMIAS RELACIONADAS CON ECN .....	174
5.6	ESQUEMA JERARQUIZADO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS ECN ....	175
6	CONCLUSIONES .....	178
7	BIBLIOGRAFÍA .....	182

## ÍNDICE DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
1. HISTORIA EVOLUTIVA DEL GÉNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> .....	7
2. ECN Y SU FRECUENCIA DE APARICIÓN EN CLÍNICA .....	12
3. DISTRIBUCIÓN DE LAS INFECCIONES SEGÚN LOS SERVICIOS .....	22
4. DESCRIPCIÓN Y VALORACIÓN CLÍNICA DE LOS CASOS .....	45
5. ESPECTRO LÍTICO DE LOS FAGOS DEL JUEGO DE "DEAN Y WILLIAMS" .....	65
6. ESPECTRO LÍTICO DE LOS FAGOS AUTÓCTONOS .....	66
7. PATRONES DE FAGOTIPIA DE LAS CEPAS CONTROL .....	69
8. ANTIBIÓTICOS Y RANGOS DE CONCENTRACIONES ( $\mu$ /ml) .....	71
9. VALORES ESTANDAR DE CMI ( $\mu$ /ml) (NNCLS, 1993) .....	73
10. PATRONES DE FAGOTIPIA CON EL JUEGO DE FAGOS COMBINADOS .....	101
11. FRECUENCIAS DE PATRONES DE FAGOTIPIA .....	102
12. PATRONES DE FAGOTIPIA INVERSA .....	105
13. FRECUENCIA DE PATRONES DE FAGOTIPIA INVERSA .....	106
14. PATRONES DE FAGOTIPIA CON EL JUEGO DE FAGOS ADICIONALES .....	108
15. PATRONES OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE FISK .....	109
16. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ECN .....	111
17. PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS .....	112
18. PROPORCIÓN DE AISLADOS EN RELACIÓN AL NÚMERO DE PLÁSMIDOS .....	116
19. PORCENTAJE DE PLÁSMIDOS SEGÚN SU TAMAÑO .....	117
20. Nº DE AISLADOS EN LOS DISTINTOS PERFILES PLASMÍDICOS .....	119
21. COEFICIENTE DE SIMILITUD DE SORENSEN .....	128
22. VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS CASOS .....	133
23. CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS ESTABLECIENDO SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE AISLADOS DE UN MISMO ENFERMO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS .....	145
24. VALORACIÓN DE LOS MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS EN EL ESTUDIO DE LOS ECN .....	176

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1. ESTUDIOS HOSPITALARIOS DE PREVALENCIA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES . .	18
2. DISTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL EN LOS AÑOS 1990-1992 . . . . .	19
3. EVOLUCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE INFECCIONES NOSOCOMIALES NNIS 1980-1992 . . . . .	20
4. DISTRIBUCIÓN DE LOS PRINCIPALES PATÓGENOS IMPLICADOS EN LAS INFECCIONES NOSOCOMIALES (INFORMES EPINE Y NNIS) . . . . .	24
5. DISTRIBUCIÓN POR ÁREAS DE ASISTENCIA DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS EN LOS QUE SE AISLARON ECN . . . . .	97
6. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS ESPECIES DE ECN AISLADAS EN LOS HEMOCULTIVOS ESTUDIADOS . . . . .	98
7. PROPORCIÓN DE AISLADOS CARACTERIZADOS POR FAGOTIPIA AL APLICAR LOS DISTINTOS JUEGOS DE FAGOS . . . . .	100
8. FRECUENCIA DE REACCIÓN DE LOS FAGOS DEL JUEGO COMBINADO . . . . .	103
9. PROPORCIÓN DE AISLADOS CARACTERIZADOS POR FAGOTIPIA INVERSA . . . . .	106
10. CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS MEDIANTE LAS DISTINTAS TÉCNICAS DE FAGOTIPIA . . . . .	110
11. CASOS CARACTERIZADOS CON MARCADORES FENOTÍPICOS . . . . .	115
12. PERFILES PLASMÍDICOS DE ECN AISLADOS DE HEMOCULTIVOS DE DIFERENTES PACIENTES . . . . .	118
13. ESQUEMA DE LOS PERFILES PLASMÍDICOS . . . . .	120
14. PERFILES OBTENIDOS POR CAMPO PULSADO PARA SELECCIONAS LA ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN . . . . .	122
15. ESQUEMA DE LOS PERFILES OBTENIDOS POR PFGE . . . . .	124
16. DENDOGRAMA DE LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS . . . . .	127
17. PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE CEPAS DE ECN PERTENECIENTES A DISTINTOS CASOS . . . . .	129

**1.-INTRODUCCIÓN**

### 1.1.- REVISIÓN HISTÓRICA DEL GÉNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Han transcurrido más de 100 años desde que por primera vez fueron observados cocos en heridas y en pus procedente de abscesos humanos. Pero hasta 1880, fecha en la que Alexander Ogston publica sus datos donde mostraba la existencia de numerosas infecciones piogénicas causadas por cocos, no se empieza a utilizar el término *Staphylococcus*, nombre derivado de las palabras griegas *staphyle* y *coccus* cuyo significado etimológico es, respectivamente, racimo de uvas y grano.

Rosenbach en 1884, fue probablemente la primera persona que creció el estafilococo en un cultivo puro y que estudio sus características en el laboratorio. Observó que los aislados formaban dos tipos de colonias, únicamente diferenciables por el color: naranjas y blancas. Propuso el nombre de *Staphylococcus pyogenes aureus* para la primera y *Staphylococcus pyogenes albus* para la segunda.

Winslow y Winslow, en 1908, clasificaron los estafilococos cuyas colonias eran naranjas dentro del género *Aureococcus* y los de colonias blancas dentro del género *Albococcus*, describiendo al *Albococcus epidermidis*. Posteriormente en 1920, Winslow y colaboradores incluyeron *Staphylococcus* en la familia *Micrococcaceae*.

Hucker en 1948, al realizar la revisión de la sexta edición del Manual de Bergey concluyó que los estafilococos y micrococos no eran distintos, dio prioridad al nombre genérico de *Micrococcus* e incluyó a los estafilococos dentro de éste género, a pesar de que el manual había reconocido al género *Staphylococcus* en todas sus ediciones anteriores, desde la primera a la quinta (1939). En este mismo año, Abd-El-Malek y Gibson (1948) llamaron al grupo de estafilococos y micrococos "complejo *Staphylococcus-Micrococcus*", considerando a los estafilococos como patógenos y a los micrococos como saprofitos.

En 1955, Evans y cols. propusieron separar estos organismos basándose en la necesidad de oxígeno para su crecimiento. Situaron las especies que eran aerobias facultativas en el género *Staphylococcus* y las aerobias estrictas en el género *Micrococcus*. Esta clasificación fue aceptada por Breed y cols. en la séptima edición del Manual de Bergey (1957) siendo posteriormente confirmada por Baird-Parker (1963, 1965).

En la séptima edición del Manual de Bergey (1957) se reconocían dos especies de estafilococos: *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo y con capacidad de fermentar el manitol) y *Staphylococcus epidermidis* (negativo a ambas pruebas). El uso de la taxonomía numérica en 1959 indicó que los estafilococos coagulasa positivos constituían un grupo homogéneo, mientras que los estafilococos coagulasa negativos no lo eran (Hill, 1959).

Baird-Parker (1963), fue el primero en reconocer tipos específicos dentro del grupo heterogéneo de los estafilococos coagulasa negativos. Dividió a los estafilococos en seis subgrupos basándose en pruebas fisiológicas y bioquímicas; así, el subgrupo I contenía la especie *S. aureus*: coagulasa y fosfatasa positivas que generalmente producían ácido a partir de manitol aeróbica y anaeróticamente; los subgrupos II hasta VI contenían una única especie: *S. epidermidis*, que se diferenciaba en la producción de fosfatasa y acetoina, así como en la capacidad de producir ácido aeróticamente a partir de la lactosa, maltosa y manitol. En 1965, Baird-Parker definió a los subgrupo del II hasta el VI como biotipos del 1 al 5, e indicó que la mayoría de estos biotipos merecerían tener el rango de especies.

Los criterios que hasta 1965 habían sido utilizados para distinguir los miembros del género *Staphylococcus* de los del género *Micrococcus* (capacidad de crecimiento anaeróbico y fermentación de la glucosa en un medio peptonado con extracto de levadura) fueron ampliamente criticados por autores como Klesius y Schuardt (1968), Auletta y Kennedy (1966), Mortensen y Kocur (1967) y Gibson (1967), quienes argumentaban la existencia de cocos Gram y catalasa positivos con débil crecimiento

anaeróbico y fermentación lenta de la glucosa. Aún a pesar de sus críticas estos autores estaban de acuerdo en la separación de ambos géneros; así, mientras Klesius y Schuardt (1968) argumentaban dicha separación basándose en la distinta susceptibilidad a la lisostafina, Auletta y Kennedy (1966) y Mortensen y Kocur (1967) la apoyaban en base al distinto contenido en guanina y citosina del ADN de la especies pertenecientes a ambos géneros.

En la octava edición del Manual de Bergey, *Micrococcus saprophyticus* fue transferido al género *Staphylococcus*. En esta misma edición, basándose en la producción de acetofina, actividad fosfatasa y producción anaeróbica de ácido a partir de la lactosa, maltosa y manitol, se reconocen tres especies de *Staphylococcus*: *S. aureus*, *S. epidermidis*, biotipos 1-4, y *S. saprophyticus*, biotipos 1-4.

Una vez separados ambos géneros (por el contenido de guanina-citosina de su ADN, la composición de la pared celular, la susceptibilidad a la lisostafina, el 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. De este modo, Schleifer y Kloos (1975a) y Kloos y Schleifer (1975a) publicaron sus estudios taxonómicos de las cepas estafilocócicas aisladas de piel humana, describiendo en base a sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, siete nuevas especies de coagulasa negativos llamadas: *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 basado en una selección de diversos caracteres bioquímicos.

Una nueva especie, *S. sciuri*, fue descrita por Kloos y cols (1976), la cual contiene dos subespecies *sciuri* y *lentus*.

*Micrococcus hyicus* fue aislado por Sompolinsky (1953) de

exudados de piel en cerdos y fue transferido al género *Staphylococcus* por Baird-Parker en 1963. Devriese y cols. (1978) subdividieron la especie *S. hyicus* en dos subespecies: *hyicus* y *chromogenes*, aunque ésta última fue considerada posteriormente como una nueva especie (Hájek y cols., 1986).

Hájek (1976), describe la especie *S. intermedius* aislada de nariz de palomas, visones, caballos y focas.

En las décadas de los años 80 y los 90 es donde tiene lugar la descripción de una gran cantidad de nuevas especies de estafilococos coagulasa negativos. Así Skerman y cols., en 1980, determinan la existencia de trece especies dentro del género *Staphylococcus*.

El sistema de clasificación propuesto por Kloos y Schleifer (1975b) para estafilococos de origen humano fue aplicado más tarde a aislados de origen animal. De este modo se identificaron las siguientes especies: *S. gallinarum* y *S. caprae* (Devriese y cols., 1983), *S. lentus* (Schleifer y cols., 1983), *S. carnosus* (Schleifer y Fischer, 1982), *S. caseolyticus* (Schleifer y cols., 1982).

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

En 1985, De la Fuente y cols. describen la subespecie *S. aureus* subsp. *anaerobius*. Tres años más tarde se descubren tres nuevas especies: *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 aislada de gatos (Igimi y cols., 1989). *S. capitis* subsp. *ureolyticus*, aislada de piel humana ha sido descrita en 1991 por Bannerman y Kloos.

*S. muscae*, *S. piscifermentans*, *S. vitulus*, *S. pasteurii* y *S. pulvereri*

---

son cinco nuevas especies descritas recientemente que todavía no están recogidas en la última edición del Manual de Bergey.

*S. muscae* aislada de moscas, cuyo huésped natural son los mamíferos domésticos, fue descrita por Hájek y cols. en 1992.

*S. piscifermentans* aislada de pescado fermentado (Tanasupawat y cols., 1992). *S. pasteurii* descrita en 1993 por Chesneau y sus colaboradores, es fenotípicamente muy similar a *S. warneri*, siendo los perfiles obtenidos por ribotipia los que permiten diferenciar ambas especies. Otra especie descrita ese mismo año es *S. vitulus* (Webster y cols., 1993). La última reseña de una nueva especie de ECN la encontramos en 1995, año en el que Zakrzewska y colaboradores describen la especie *S. pulvereri* aislada tanto en hombre como en animales.

En la actualidad, el género *Staphylococcus* comprende treinta y tres especies diferentes. En la Tabla 1 se resume la historia evolutiva del género *Staphylococcus*.

TABLA 1: HISTORIA EVOLUTIVA DEL GÉNERO *STAPHYLOCOCCUS*

1974 *	1980 **	1986 ***	1996 ****
<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. xylosum</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. xylosum</i>	<i>S. kloosii</i>
			<i>S. lentus</i>
			<i>S. lugdunensis</i>
			<i>S. muscae</i>
			<i>S. pasteurii</i>
			<i>S. pulvereri</i>
			<i>S. piecifementans</i>
			<i>S. saccharolyticus</i>
			<i>S. saprophyticus</i>
			<i>S. schleiferi</i>
			<i>S. sciuri</i>
			<i>S. simulans</i>
			<i>S. vitulus</i>
			<i>S. warneri</i>
			<i>S. xylosum</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.- SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS (ECN)**

Los ECN son unos de los principales microorganismos causantes de infección nosocomial. Aunque se encuentran entre las especies más frecuentemente aisladas en los laboratorios de microbiología clínica (Patrick, 1990), (Pfaller, 1988), el hecho de que sean organismos ubicuos y que constituyan el principal componente de la microflora normal de la piel, mucosas y glándulas de mamíferos y pájaros; ha dado lugar a que hayan sido considerados como saprofitos y durante años se discutiera acerca de su significación clínica. Aún actualmente uno de los problemas de cara al laboratorio es distinguir si los aislados de ECN son cepas con significación clínica, es decir, cepas productoras de infección, o simplemente cepas contaminantes (Kleeman y cols., 1993).

### **1.2.1.- DESCUBRIMIENTO DEL POTENCIAL PATÓGENO DE LOS ECN**

Revisando la bibliografía vemos como con el paso de los años los ECN se han ido reconociendo progresivamente como importantes agentes etiológicos de una gran variedad de situaciones clínicas. Así, en 1958 Smith y cols. descubrieron el potencial patógeno de los ECN al analizar datos procedentes de pacientes con septicemia. Dos años más tarde Brandt y Swahn, (1960) sugieren que más del 1% de todos los casos de endocarditis podían ser debidos a ECN. Posteriormente, Pereira (1962) publicó que un cierto grupo de ECN, actualmente llamado *S. saprophyticus*, causaba infecciones en el tracto urinario (ITUs).

En 1965, Wilson y Stuart encontraron que en el 4,4% de los casos de infecciones en heridas, los ECN eran los únicos microorganismos aislados. Ese mismo año Gallagher y cols., y cuatro años más tarde Mabeck (1969) informaron acerca de infecciones del tracto urinario

causadas por ECN.

Pulverer y Pillich (1967) notificaron la existencia de 128 casos de endocarditis que pensaron que estaban causadas por ECN; años más tarde, Pulverer en el "Fifth International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections" (1985) manifestó su frustración con la comunidad médica al hablar acerca de todas las trabas que les habían puesto los editores cuando publicaron el artículo anteriormente citado. En 1971, Holt informó sobre la colonización de derivaciones ventriculoatriales por ECN, colonización que frecuentemente iba seguida por una septicemia.

En 1985 Pulverer hace una revisión bibliográfica de 2276 pacientes con derivaciones ventriculoatriales o peritoneales, de los cuales el 8% sufrieron infecciones, siendo más de la mitad de estas infecciones causadas por ECN.

De modo que, anteriormente a los años 70, tanto clínicos como microbiólogos generalmente consideraban a los ECN como contaminantes y únicamente *S. aureus* fue considerado como patógeno dentro de las especies estafilocócicas, y es en las últimas dos décadas cuando se han realizado considerables progresos tanto en la clasificación de los estafilococos como en el desarrollo de métodos de tipado; progresos que han permitido a la comunidad médica estar más al corriente acerca de la gran variabilidad de especies clínicas de ECN y aumentar la credibilidad de que estos organismos son agentes etiológicos de una variedad de enfermedades.

### 1.2.2.- ECN ASOCIADOS A INFECCIONES HUMANAS

Los ECN actualmente son considerados como microorganismos patógenos oportunistas que se aíslan frecuentemente en cuatro tipos de pacientes: un primer tipo lo constituirían aquellos pacientes con rotura de la barrera natural de la piel, como son los sujetos sometidos a cirugía, con lesiones traumatológicas, o aquellos que presentan patología dermatológica

(eccemas, psoriasis). Un segundo tipo estaría constituido por pacientes con dispositivos implantados como catéteres, prótesis, derivaciones, etc.. El tercer grupo lo formarían pacientes inmunocomprometidos y/o con enfermedad de base. Y el último grupo sería el de los neonatos.

De todas las especies de ECN, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* son las que aparecen con mayor frecuencia en los aislamientos clínicos, mientras que el resto de las especies raramente se encuentran en infecciones humanas. (Tabla 2).

*S. epidermidis* es el principal agente causal de sepsis nosocomial en neonatología y oncología (Baumgart y cols., 1983). Es el responsable del 74% al 92% de las bacteriemias adquiridas en hospitales causadas por los ECN (Martín y cols., 1989). Las infecciones cardiovasculares debidas a *S. epidermidis* son frecuentes después de procedimientos tales como cirugía valvular, cirugía cardiovascular y cardiotorax (Archer y Tenenbaum, 1980). También es el principal patógeno en infecciones de pacientes con derivaciones de líquido cefalorraquídeo, produciendo frecuentemente bacteriemias en estos pacientes. Es el microorganismo más comúnmente aislado de infecciones secundarias a la implantación de una gran variedad de prótesis ortopédicas (Clarke, 1979). Raramente causa osteomielitis, aunque se han publicado algunos casos (Paley, 1986). Es el principal agente causal de peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria continua (Kraus y Spector, 1983). Y es aislado comúnmente en infecciones del tracto urinario tales como cistitis, uretritis y pielonefritis.

*S. saprophyticus*, ha sido identificado como una de las causas más frecuentes de ITUs en mujeres jóvenes sexualmente activas. Produce prostatitis en hombres (Akatov y cols., 1981). Ha sido aislado en heridas infectadas y se ha asociado con casos de septicemia, (Fleurette y cols., 1987).

*S. haemolyticus*, es la tercera especie de ECN. más frecuentemente aislada en infecciones clínicas, ha sido implicada en endocarditis, bacteriemias, peritonitis, infecciones del tracto urinario y heridas ( Fleurette

y cols.,1987), (Leighton y Little, 1986), (Martín y cols.,1989).

*S. hominis* es una de las especies del género *Staphylococcus* que encontramos mayoritariamente sobre la piel y puede estar asociado con una variedad de infecciones tales como septicemias, conjuntivitis, infecciones del tracto urinario y heridas (Kloos y Schleifer, 1986) e infecciones debidas a catéteres peritoneales.

*S. lugdunensis* y *S. schleiferi* son dos especies recientemente descritas que parecen ser significantes patógenos oportunistas, ambas especies son poco comunes en la flora normal de la piel y cuando aparecen están normalmente presentes en poblaciones muy pequeñas. *S. lugdunensis* ha sido implicado en infecciones serias tales como endocarditis, septicemias, abscesos cerebrales, infecciones profundas de tejidos, infecciones peritoneales e infecciones asociadas con el uso de catéteres. *S. schleiferi* es menos frecuente que *S. lugdunensis*, y ha sido aislado de empiema cerebral, infecciones de herida, etc.( Freney y cols.,1988).

Otras especies tales como *S. warneri*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. saccharolyticus*, *S. capitis* y *S. xylosus*, aparecen con baja incidencia en una variedad de infecciones humanas. Encontramos ITUs debidas a *S. warneri* y *S. cohnii*; infecciones producidas por catéteres peritoneales debidas a *S. warneri* y *S. capitis*; bacteriemias por *S. simulans*, *S. schleiferi* y *S. haemolyticus*; osteomielitis y endocarditis por *S. warneri*; infecciones de heridas por *S. intermedius*. (Rupp y Gordon, 1994).

TABLA 2: ECN Y SU FRECUENCIA DE APARICIÓN EN CLÍNICA

Especies estafilocócicas	Frecuencia de aparición clínica
<i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i>	Patógenos comunes
<i>S. capitis, S. cohnii, S. haemolyticus</i> <i>S. hominis, S. lugdunensis,</i> <i>S. saccharolyticus, S. schleiferi,</i> <i>S. simulans, S. warneri, S. xylosus.</i>	Patógenos poco frecuentes
<i>S. arlettae, S. auricularis, S. caprae</i> <i>S. carnosus, S. caseolyticus,</i> <i>S. chromogenes, S. delphini,</i> <i>S. felis, S. gallinarum, S. kloosii,</i> <i>S. lentus, S. muscae, S. pasteuri,</i> <i>S. piscifermentans, S. sciuri,</i> <i>S. equorum, S. vitulus, S. hyicus,</i> <i>S. intermedius, S. pulvereri.</i>	Patógenos raros o no determinada su patogenicidad.

### **1.3.- IMPLICACIÓN DE LOS ECN EN LA INFECCIÓN NOSOCOMIAL**

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.

Los pacientes hospitalizados son más susceptibles a adquirir estas infecciones debido a la existencia de factores de riesgo como son: el presentar una grave enfermedad de base, el haber estado expuesto a procedimientos diagnósticos o terapéuticos invasivos y el haber sido tratados con inmunosupresores. Así, microorganismos que no son habitualmente patógenos, como es el caso de los ECN, son capaces de causar infecciones en este tipo de enfermos convirtiéndose en importantes patógenos nosocomiales.

Los problemas originados por las infecciones nosocomiales no sólo afectan a los pacientes sino que también repercuten sobre la comunidad y el Estado, ya que la mortalidad y morbilidad causadas por las infecciones hospitalarias generan grandes costes. (Dixon, 1987).

#### **1.3.1- CRITERIOS UTILIZADOS PARA DETERMINAR EL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN NOSOCOMIAL**

La guía publicada por el CDC (Horan y cols., 1992) para definir las infecciones nosocomiales contienen criterios clínicos y de laboratorio para las principales infecciones y localizaciones específicas. La mayoría de las principales infecciones pueden ser establecidas mediante la aplicación de criterios clínicos y los resultados de laboratorio aportan una evidencia adicional en la determinación de la existencia de infección.

Los criterios clínicos que generalmente utilizan los médicos para definir las infecciones del torrente circulatorio se basan en múltiples factores, incluyendo la historia, el examen físico, el cuadro clínico y el

curso de la evolución que presenta el paciente. Entre las variables clínicas que se consideran como signo de infección podemos señalar: fiebre, escalofríos, hipotensión, apnea, bradicardia, acidosis, etc. (Weinstein, 1983).

En el caso de las bacteriemias producidas por ECN, los criterios utilizados en el laboratorio para determinar la significación clínica de los mismos están fundamentalmente basados en dos parámetros, por un lado la intensidad de la bacteriemia que se determina analizando el número de unidades formadoras de colonia por mililitro de sangre inoculada (UFC/ml), de modo que un alto número de UFC/ml se interpretaría como indicio de infección. (Bryan, 1989), siendo éste un parámetro que adquiere especial importancia en el caso de los niños recién nacidos a los que sólo se les realiza una extracción. Y por otro lado la obtención de repetidos cultivos positivos de la misma cepa de ECN, obtenidos separadamente dentro de un período de 24 horas, en intervalos superiores a una hora. Aunque el número de muestras que se deben obtener de un mismo paciente dependerá del propio enfermo, así en los pacientes que han recibido previamente tratamiento antimicrobiano generalmente se necesita tomar mayor número de muestras para aislar el agente etiológico, mientras que en neonatos de bajo peso solamente se suele tomar una muestra y en este caso los neonatólogos ponen mayor confianza en el criterio clínico. Tradicionalmente se ha considerado "al crecimiento en más de una botella" o "al crecimiento en más de un juego de botellas" como evidencia de cultivo positivo; aunque tiene una mayor relevancia clínica el obtener crecimiento en más de un juego de botellas ya que cada juego representa una muestra distinta (Bryan, 1989). Young y cols., en 1977, proponen "la regla de tres", según la cual casi todos los casos de bacteriemia serán reconocidos después de la incubación de tres cultivos sanguíneos de un mismo enfermo durante tres días, de este modo se detectarán no sólo las bacteriemias continuas sino también las intermitentes y transitorias, y al mismo tiempo se facilitará la valoración de microorganismos que pueden ser considerados contaminantes

como es el caso de los ECN. El volumen de sangre a cultivar generalmente aceptado es de 10 ml por extracción para el caso de adultos, aunque algunos autores recomiendan de 20 a 30 ml, y de 1 a 5 ml en recién nacidos (Planes, 1990).

Para evitar falsos positivos es esencial que la muestra de sangre de los cultivos sea tomada asépticamente, siendo además preferible recolectar la sangre de más de un lugar del cuerpo, por el hecho de que un contaminante puede ser introducido accidentalmente (Kloos y Bannerman, 1994). Además hay que ser extremadamente cuidadoso a la hora de la manipulación de la muestra en el laboratorio.

Así cuando de un mismo enfermo se obtienen una serie de distintos cultivos positivos y en todos ellos se aísla el mismo ECN, éste es considerado como patógeno, mientras que si después de un primer cultivo positivo los siguientes cultivos son negativos o positivos pero se aíslan microorganismos diferentes al ECN del cultivo inicial entonces se habla de contaminación.

Como vemos, establecer si un ECN es el agente causal de una infección determinada es un problema controvertido. De hecho, Koontz y Pfaller (1989) dan un doble significado a las siglas inglesas CNS (coagulase-negative staphylococci) leyéndolas como "controversy never stops" (la controversia nunca para). Para dar una solución a esta controversia es necesario que tres grupos distintos de profesionales trabajen juntos:

- El personal de enfermería obteniendo muestras de buena calidad.
- El microbiólogo identificando y caracterizando el microorganismo aislado en la muestra y dando una valoración desde el punto de vista del laboratorio.
- El clínico valorando conjuntamente la clínica del paciente con los resultados del microbiólogo.

### 1.3.2.- EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES NOSOCOMIALES

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

#### a.- Prevalencia de las infecciones nosocomiales

Definimos prevalencia de las infecciones nosocomiales como el número de infecciones por cada cien enfermos hospitalizados, expresado en porcentaje.

Los datos de prevalencia de las infecciones nosocomiales, que se obtienen de los principales estudios multihospitalarios sólo nos dan una idea a título informativo, puesto que dichos estudios no son comparables entre sí debido a las diferentes metodologías empleadas y las diferentes características de las poblaciones encuestadas.

En 1975 en Suecia la tasa de prevalencia se situaba en un 10,5% (Bernarder y cols., 1978). La misma tasa presenta Dinamarca en 1978, tasa que se incrementaba a un 12,1% en 1979, para bajar a un 7,3% en 1980 (Jepsen y Mortensen, 1980). En Noruega se informó una tasa de un 9% en 1979 (Hovig y cols., 1981) disminuyendo a un 6,3% en 1992 (Aavistsland y cols., 1992). En el Reino Unido se encontró un índice de prevalencia de 9,2% en un estudio realizado durante 1979-1980 en 43 hospitales de Inglaterra y Gales (Meers y cols, 1981). En Italia, en 1983, fue de un 6,8% (Moro y cols., 1986). En Bélgica, estudiando 8.723 pacientes de 106 hospitales en 1984, se encontró que un 10,3% de los enfermos habían desarrollado una o más infecciones hospitalarias (Mertens y cols., 1987). La antigua Checoslovaquia informó de un 6,1% (Sramová y cols., 1984). Ese mismo año en Australia la tasa fue de un 8,1%.

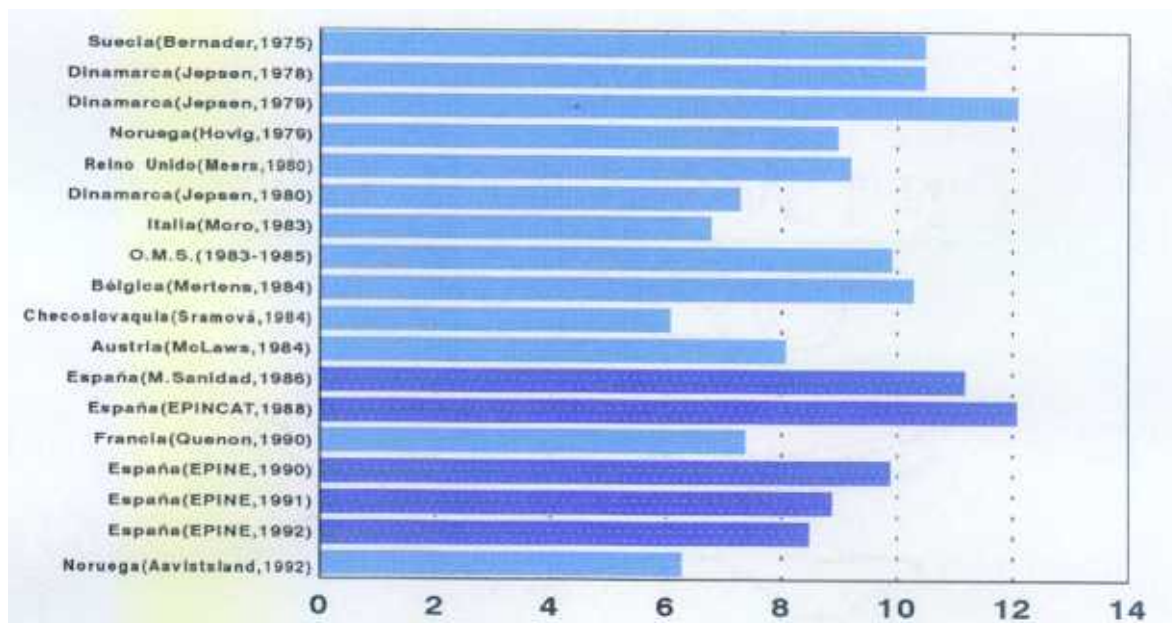
(McClaws y cols., 1988). Francia tenía un 7,4% en 1990. (Quenon y cols., 1992). En España encontramos diferentes estudios, el realizado por el Ministerio de Sanidad en 1986 publicó una tasa del 11,2%; EPINCAT en 1988, un 12,1%; y en los informes EPINE la prevalencia ha descendido desde un 9,9% en 1990 a 8,5% en 1992. La Organización Mundial de la Salud realizó un estudio internacional entre 1983 y 1985 en el que participaban 47 hospitales de 14 países (entre ellos España), en el cual se obtenía una tasa de prevalencia de 9,9% (Mayon-White y cols., 1988).

**Fig. 1.**

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

- Tamaño y tipo 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).
- Factores como la edad, sexo, tratamiento con inmunosupresores, etc. (Haley y cols., 1981; Centers of Disease Control, 1977).

**FIG. 1: ESTUDIOS HOSPITALARIOS DE PREVALENCIA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES**



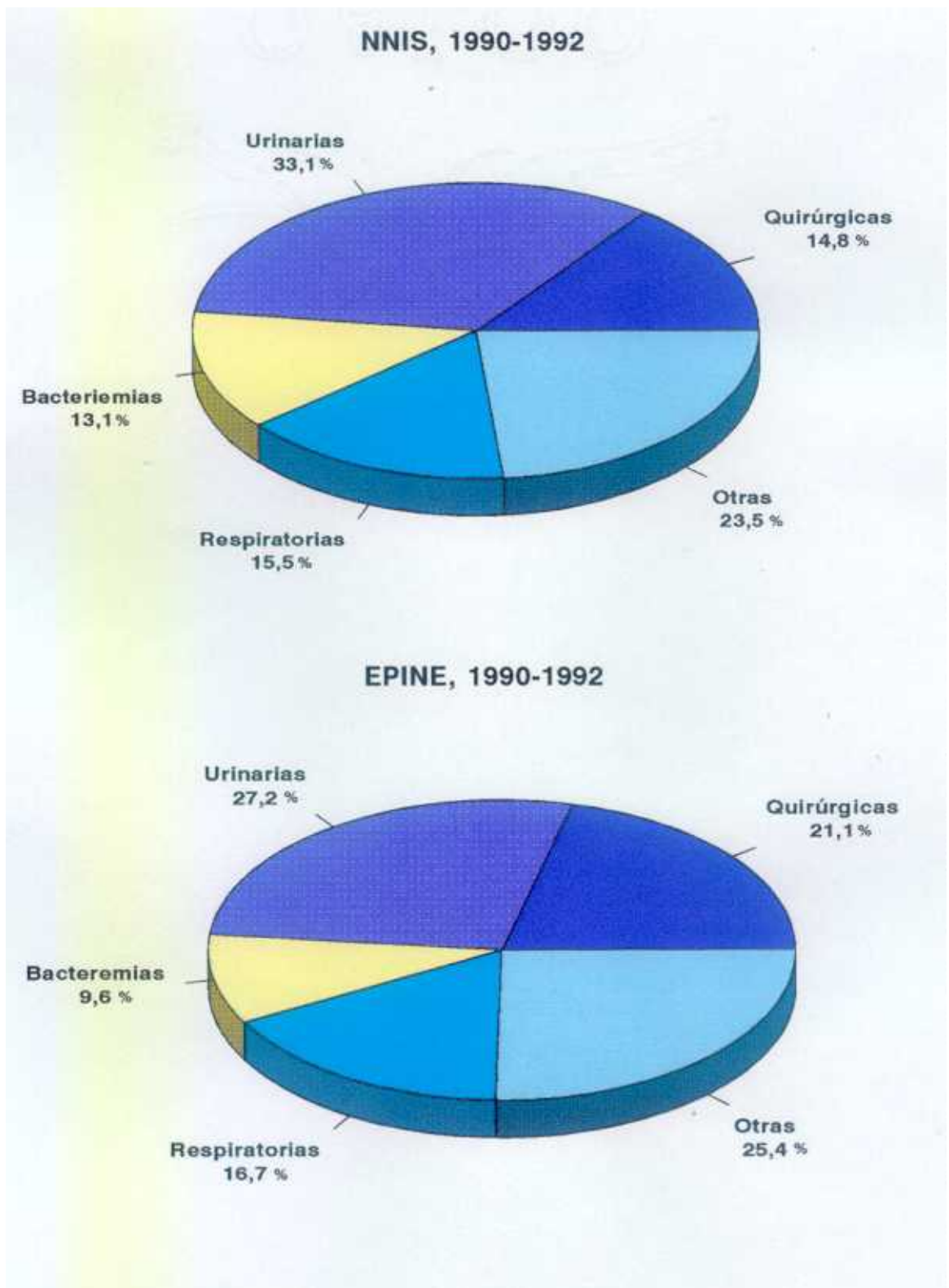
**Prevalencia de infecciones nosocomiales (Porcentaje)**

**b.- Distribución de los distintos tipos de infecciones nosocomiales**

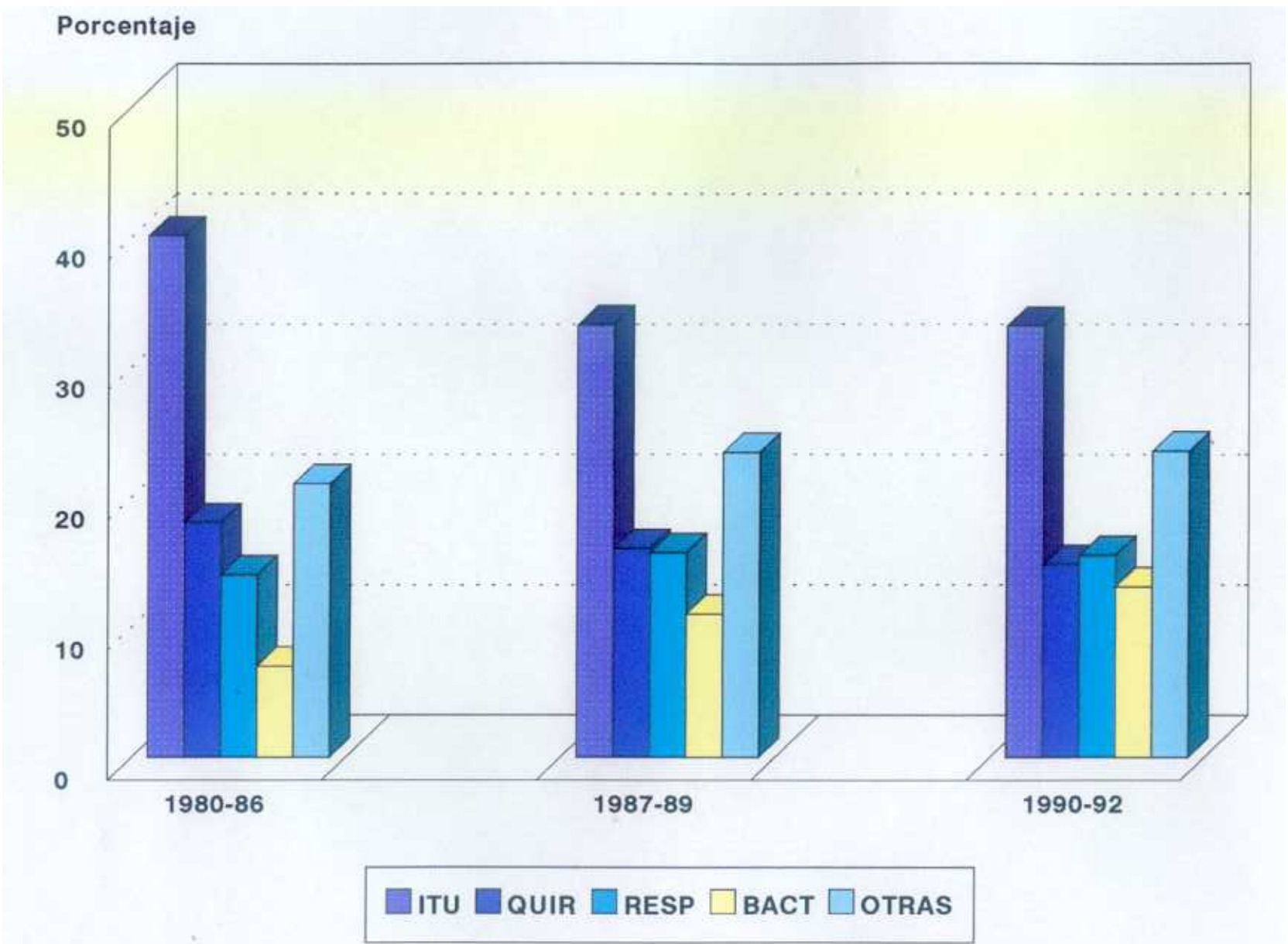
Según Emori y Gaynes (1993), los tipos más frecuentes de infección nosocomial son, por orden de importancia, infecciones urinarias (33.1%), del tracto respiratorio (15.5%), quirúrgicas (14.8%), bacteriemias (13.1%) y otras (23.5%). Mientras que según el estudio realizado en nuestro país (EPINE, 1992), las proporciones correspondientes a los distintos tipos de infección son: infecciones urinarias (27,2%), infecciones quirúrgicas (21,1%), respiratorias (16,7%), bacteriemias (9,6%) y otras infecciones (25,4%). Fig. 2.

Los cambios en la distribución de las infecciones nosocomiales en los distintos estudios realizados por el NNIS, pueden observarse en la Figura 3; observándose una disminución en el porcentaje de las infecciones urinarias y un aumento de las bacteriemias. (Emori y Gaynes, 1993).

**FIG 2: DISTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL EN LOS AÑOS 1990-1992**



**FIG 3: EVOLUCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE INFECCIONES NOSOCOMIALES. NNIS 1980-1992**



En la Tabla 3, se presenta la distribución de las principales localizaciones de las infecciones nosocomiales en las cinco grandes áreas de asistencia según los informes EPINE y NNIS, en los que se analizan datos de los años 1990-1992. Observándose una cierta equivalencia en los datos de ambos informes, predominando en medicina las infecciones urinarias, en atención intensiva las respiratorias, en pediatría las bacteriemias, ocupando un lugar importante las infecciones quirúrgicas y las urinarias en las áreas de cirugía y obstetricia. Esta diferente distribución en los distintos servicios pueden explicarse por variaciones en los procedimientos de alto riesgo. Por ejemplo, pacientes que han sufrido una operación quirúrgica, rara vez están en el servicio de medicina interna, por lo que el número de infecciones quirúrgicas en este servicio es pequeño. De manera similar, las infecciones del tracto urinario son infrecuentes en pediatría y neonatos debido a que estos servicios raramente utilizan catéteres, los cuales son el factor de mayor riesgo para este tipo de infección nosocomial. Estos hechos resaltan la importancia de agrupar pacientes con riesgo similar antes de intentar comparar la distribución o el rango de infección. (NNIS, 1991).

TABLA 3: DISTRIBUCIÓN DE LAS INFECCIONES SEGÚN LOS SERVICIOS

NNIS, 1990-1992					
SERVICIO	TIPO DE INFECCIÓN (%)				
	ITU <sub>1</sub>	RESP <sub>2</sub>	QUIR <sub>3</sub>	BACT <sub>4</sub>	OTRAS
CIRUGÍA	30.2	16.4	24.5	9.6	19.4
MEDICINA	42.1	17.0	2.3	14.8	23.8
NEONATOS	4.2	14.9	1.8	36.1	43.1
PEDIATRÍA	12.7	12.7	6.1	29.7	38.8
OBSTRETICIA	16.5	2.3	45.0	2.2	34.0
GINECOLOGÍA	39.7	6.5	37.2	3.9	12.7
TOTAL	33.1	15.5	14.9	13.1	23.4

EPINE, 1990-1992					
SERVICIO	TIPO DE INFECCIÓN (%)				
	ITU <sub>1</sub>	RESP <sub>2</sub>	QUIR <sub>3</sub>	BACT <sub>4</sub>	OTRAS
CIRUGÍA	22.1	9.4	40.0	5.9	22.7
MEDICINA	38.4	20.2	4.0	10.7	26.7
PEDIATRÍA	13.9	14.9	6.5	17.4	47.3
OBST. + GINE. <sub>5</sub>	45.7	1.7	26.2	4.9	21.5
ATEN.INT. <sub>6</sub>	13.8	41.3	11.8	16.9	16.2
OTROS	31.6	20.9	9.5	6.3	31.7
TOTALES	27.3	16.6	21.0	9.6	25.3

1.- Infección del tracto urinario 2.- Infección del tracto respiratorio.

3.- Infección quirúrgica. 4.- Bacteriemia. 5.- Obstetricia + Ginecología.

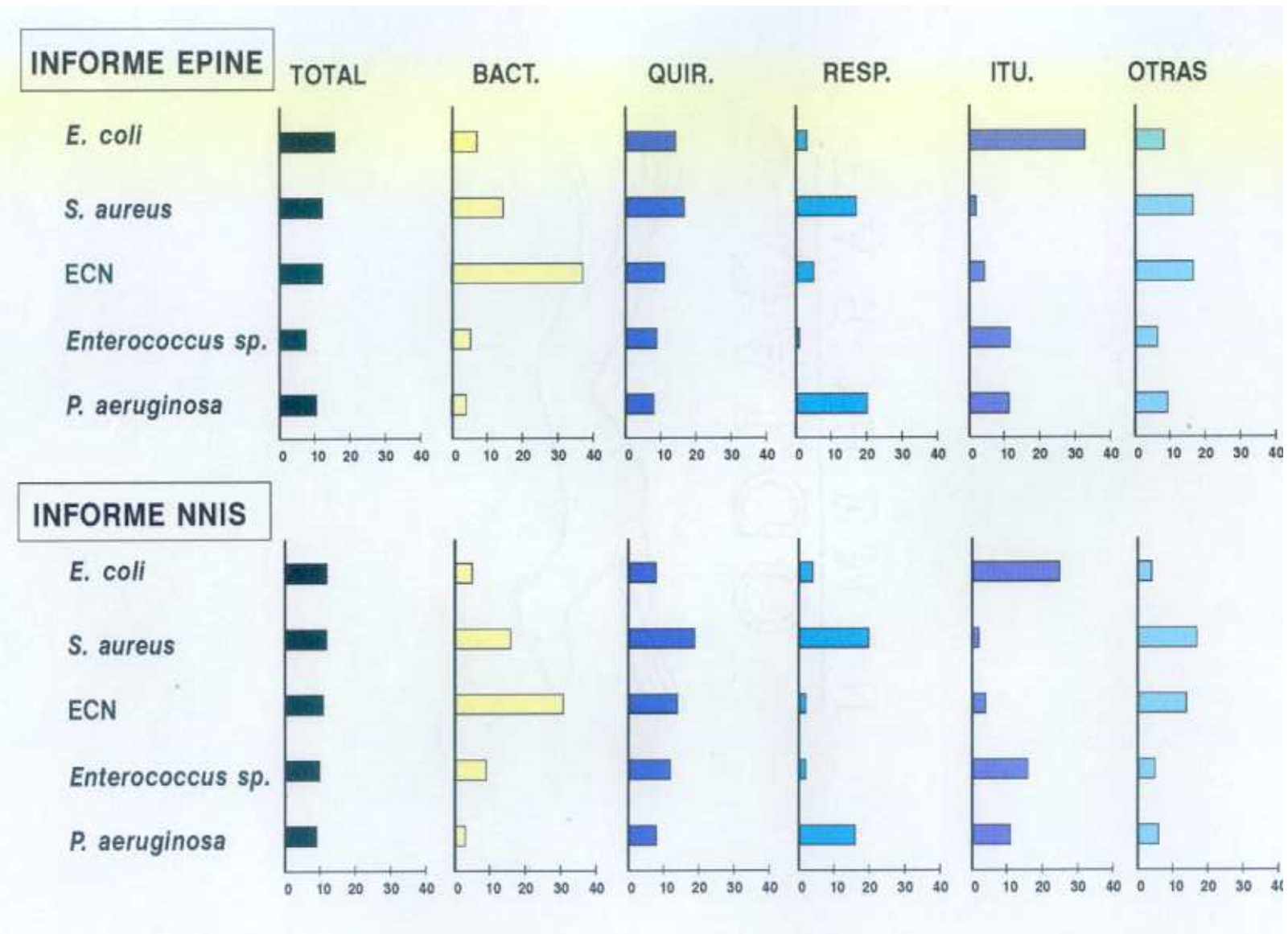
6.- Atención intensiva.

### c.- Distribución de los principales microorganismos patógenos implicados en la infección nosocomial

Según los datos publicados por el informe NNIS y el EPINE correspondientes a los años 1990-1992, los cinco microorganismos que producen un mayor número de infecciones nosocomiales nos encontramos con *E. coli*, *S. aureus*, ECN, *Enterococcus sp*, y *P. aeruginosa*. Analizando la información del NNIS observamos que *E. coli* y *S. aureus* serían los principales productores de infecciones nosocomiales siendo responsables cada uno de ellos del 12% de dichas infecciones, seguidos de ECN con un 11%, *Enterococcus sp* (10%) y *P. aeruginosa* (9%). Mientras que en la información del EPINE, *E. coli* sería el principal microorganismo responsable del 15,9% de este tipo de infecciones, seguido por *S. aureus* y ECN con un 12,4% cada uno de ellos, *Enterococcus sp* (7,7%) y *P. aeruginosa* (10,7%). Como vemos en ambos informes los ECN ocupan un relevante lugar dentro de la distribución de los patógenos nosocomiales.

Al estudiar dicha distribución según los distintos tipos de infecciones nosocomiales, en ambos estudios observamos que los ECN son los principales agentes etiológicos de las bacteriemias; *S. aureus* sería el principal responsable de las infecciones quirúrgicas; *E. coli*, seguido de *Enterococcus sp* juegan un papel importante en las infecciones del tracto urinario; así como *S. aureus* y *P. aeruginosa* en las respiratorias. Fig 4.

FIG 4: DISTRIBUCIÓN DE LOS PRINCIPALES PATÓGENOS IMPLICADOS EN LAS INFECCIONES NOSOCOMIALES (INFORMES EPINE Y NNIS)



#### **1.4.- UTILIDAD EPIDEMIOLÓGICA Y CLÍNICA DE LOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN**

Actualmente se están utilizando 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 a los 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.

El empleo de marcadores epidemiológicos nos permite realizar dos importantes tipos de evaluación. Una evaluación epidemiológica en la que a través de los datos obtenidos por la aplicación de dichos marcadores podemos determinar cuando una serie de pacientes infectados con una especie bacteriana representan un brote nosocomial. Otra evaluación de carácter clínico, en la que determinamos si diferentes aislados procedentes de un mismo enfermo son una única cepa o si por el contrario son cepas diferentes; esta evaluación adquiere una especial importancia en el caso de los ECN puesto que basándonos en ella vamos a poder establecer la significación clínica de dichos microorganismos.

##### **1.4.1.- CRITERIOS PARA EVALUAR UN SISTEMA DE TIPADO**

En la evaluación de un marcador debemos tener en cuenta criterios como la tipabilidad, reproducibilidad y poder discriminatorio.

###### **Tipabilidad:**

Capacidad de obtener resultados positivos y claros de cada aislado analizado. Se consideran no tipables aquellos aislados en los que el marcador no permite obtener ningún resultado o el obtenido es ininterpretable.

**Reproducibilidad:**

Se refiere a la capacidad de obtener el mismo resultado cuando se estudia la misma cepa repetidamente; éste criterio puede verse afectado por la variación obtenida en el día a día de los resultados de un método particular o bien por la variación en la estabilidad de la característica bacteriana que se está analizando.

**Poder discriminatorio:**

Capacidad para diferenciar entre aislados no relacionados. Idealmente un buen marcador epidemiológico reconocería cada aislado no relacionado como único, pero en la práctica una técnica se considera estadísticamente útil cuando el tipo más común se detecta en un número menor al 5% de la población (Hunter, 1990).

La evaluación rigurosa de cualquier método de tipado requiere analizar un número adecuado de aislados tanto esporádicos como relacionados epidemiológicamente y comparar los resultados con los obtenidos previamente con otro marcador.

Un buen método de tipificación ha de ser altamente reproducible, discriminatorio y capaz de tipificar un gran número de aislados; también debe ser rápido, barato y técnicamente sencillo.

**1.4.2.- CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN**

Los métodos de tipificación pueden 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 para controlar la aparición de dichos brotes.

En la mayoría de los laboratorios microbiológicos de los hospitales se puede iniciar un somero estudio epidemiológico utilizando métodos de tipificación sencillos, como pruebas bioquímicas de identificación, de sensibilidad a antimicrobianos e incluso serológicas. Cuando aparecen

aislados epidemiológicamente importantes que requieren una tipificación más exhaustiva, son los laboratorios de referencia microbiológica los que disponen de métodos más precisos tales como sensibilidad a fagos, análisis del DNA plasmídico o cromosómico, electroforesis de proteínas y de isoenzimas, etc.

A continuación describimos los principales métodos de tipificación.

**-Técnicas fenotípicas:**

Detectan características expresadas por el microorganismo.

**-Técnicas genotípicas:**

Basadas en el análisis del ADN cromosómico o extracromosómico.

**a.- Técnicas fenotípicas**

Estas técnicas están limitadas por el hecho de que todo microorganismo tiene la capacidad de alterar de forma impredecible la expresión de la característica que se esté analizando.

**a.1.- Identificación**

El desarrollo de los distintos sistemas para identificar los ECN ha sido paralelo al aumento de la consideración de dichos microorganismos como patógenos.

La identificación de los estafilococos coagulasa negativos así como una buena caracterización de los mismos, es aconsejable 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 estafilocócicas.

- para poseer información útil en estudios epidemiológicos. (Koontz y Pfaller, 1989).

Kloos y Schleifer (1975b) fueron los primeros que describieron un esquema simplificado para la identificación de los ECN. 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 (50  $\mu\text{g/ml}$ ).
- 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.

Debido a que este método requiere unos largos períodos de incubación, se han desarrollado sistemas comerciales rápidos y algunos automatizados para la identificación de los ECN. Así, mientras en los laboratorios de referencia se utiliza el esquema de identificación propuesto por Kloos y Schleifer, este esquema resulta impracticable en los laboratorios clínicos por lo que en ellos prevalece el uso de los sistemas comerciales. A continuación haremos una breve descripción de las ventajas y desventajas de varios de estos métodos:

#### a.1.1.- Staph Ident System (Analytab Products, Plainview, N.Y.)

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

Presenta la ventaja de no requerir instrumentación, sin embargo es necesario hacer pruebas adicionales, como la actividad fosfatasa para identificar los *S. epidermidis* y la susceptibilidad a la novobiocina para aislados de orina de *S. saprophyticus* (Aldridge y cols., 1983).

a.1.2.- 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).

a.1.3.- 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. No es un sistema 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).

a.1.4.- Microscan Pos Comb (American Microscan Mahwah, N.J.)

Después de la inoculación e incubación, los paneles pueden ser leídos manualmente o bien mediante un lector (auto-SCAN-4). Se ha encontrado una coincidencia del 79% al 95% en la identificación de los ECN al comparar este sistema con métodos convencionales. La desventaja del Microscan es que no identifica todas las cepas de *S. warneri* y *S. hominis* y además 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).

a.1.5.- Sceptor Gram positive MIC/ID (Johnston Labs, Towson, MD.)

Es un panel que tiene las mismas ventajas que el anterior sistema de identificación. Con él, el 91% de las identificaciones coinciden con las realizadas por el método de Kloos y Schleifer. (Skulnick y cols., 1987).

a.1.6.- Automicrobic System Gram positive Identification Card (Vitek systems, Inc., Hazel Wood, Mo.)

Método de identificación automatizado, de corto tiempo de incubación. Su desventaja es que sólo identificaba seis especies, aunque actualmente su base de datos identifica doce. (Almeida y cols., 1983).

a.2.- Biotipia

Consiste en la diferenciación de los aislados basándose en pruebas bioquímicas. La variación de la expresión genética es la razón más común de que los aislados de la misma cepa difieran en una o más reacciones 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).

a.3.- Antibiotipia

Está basada en la determinación de los patrones de sensibilidad de los aislados a los agentes antimicrobianos. Se practica de forma rutinaria en los laboratorios clínicos microbiológicos, mediante procedimientos estandarizados, a la mayoría de los aislados bacterianos ya que les proporciona una importante información acerca de las pautas a seguir en la terapia del enfermo (Aber y Mackel, 1981).

Que la antibiotipia para los ECN es un marcador epidemiológico aceptable lo demuestra 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.

#### a.4.- Serotipia

Es uno de los marcadores clásicos en el que la caracterización de los aislados se realiza mediante antisueros específicos que reaccionan con antígenos específicos del microorganismo. En algunas especies microbianas, la serotipia se ha usado como un método de tipificación para la diferenciación de cepas en importantes situaciones epidemiológicas.

En los ECN la serotipia no se ha desarrollado tanto como la fagotipia, debido a las dificultades en la preparación de los antisueros específicos y en 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 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).

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

#### a.5.- Fagotipia

Con esta técnica, los aislados se caracterizan por su susceptibilidad o resistencia a la lisis por cada miembro de un juego de fagos. Debido a la necesidad de mantener el juego de fagos activos y lo laborioso que ello resulta, la realización de la fagotipia queda casi prácticamente restringida a los centros de referencia.

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 estos fagos (Pereira, 1962; Pulverer y Pillich, 1971). De ahí se dedujo la necesidad de desarrollar un sistema de fagotipia para los ECN.

El primer juego de fagos fue desarrollado en 1970 por varios autores (van Boven y cols., 1969; van Boven, 1976; Verhoef y cols., 1972) en Holanda. Posteriormente, en distintos países se obtuvieron otros juegos de fagos como los de: Pulverer, Pillich y Krivankova en Alemania occidental y Checoslovaquia (Pulverer y Pillich, 1971; Pulverer y cols., 1973); Dean, Williams, Hall y Corse en Inglaterra (Dean y cols., 1973) y Martín de Nicolás y cols. en España (Martín de Nicolás, 1990).

#### **a.6.- Análisis electroforético de proteínas**

##### **a.6.1.- Electroforesis de proteínas totales e inmunoblotting**

Las proteínas y otros productos bacterianos pueden ser detectados por aislamiento de la pared celular o de los productos de la superficie celular separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Costas y cols., 1989). Alternativamente las proteínas pueden ser marcadas radioactivamente y detectadas por autorradiografía (Stephenson y cols., 1986).

El inmunoblotting se realiza por transferencia de los productos bacterianos a una membrana de nitrocelulosa se utiliza un antisuero específico o un pool de suero humano como fuente de anticuerpos (Mulligan y cols., 1988) y así se detectan los polisacáridos y glucolípidos.

Todos los aislados se pueden tipificar por estas técnicas y tienen buen poder discriminatorio. Sin embargo, debido a la complejidad de los patrones obtenidos, la comparación entre las distintas cepas puede ser difícil y el significado de pequeñas diferencias incierto (Gaston y cols., 1988). El análisis mediante ordenador puede facilitar estos estudios (Costas y cols., 1989). Además se requieren estudios adicionales para determinar si las variaciones detectadas entre los productos bacterianos o entre los productos antigenicamente activos reflejan diferencias genotípicas estables

en los aislados o son alteraciones fenotípicas potencialmente menos reproducibles, sujetas a presión ambiental.

#### a.6.2.- Análisis electroforético de isoenzimas

Detecta diferencias en la movilidad electroforética de enzimas metabólicas solubles. Las proteínas se separan en un gel (de poliacrilamida o almidón) y las enzimas se detectan de forma individual con el uso de sustratos específicos (Whittam y cols., 1983). Variaciones en la movilidad electroforética reflejan sustituciones de aminoácidos que alteran la carga de la proteína. Estas sustituciones identifican variaciones en los genes cromosómicos que codifican para la enzima. Aunque en determinados aislados alguna actividad enzimática esté ausente, la evaluación de *múltiples enzimas metabólicas asegura que todos los aislados sean tipables.*

Los estudios iniciales se realizaron para análisis de población de una *determinada especie (Selander y cols., 1986).*

#### b.- Técnicas genotípicas

Debido a los problemas de tipabilidad, reproductibilidad o poder discriminatorio de muchas de las técnicas fenotípicas, se han desarrollado numerosas métodos de tipificación basados en estudios de ADN.

##### b.1.- Plasmidotipia

Fue la primera técnica basada en estudios de ADN desarrollada para análisis epidemiológicos. Los plásmidos que se obtienen de cada aislado se separan electroforéticamente en geles de agarosa para determinar su número, su tamaño y establecer una serie de perfiles útiles para diferenciar unos microorganismos de otros, ofreciendo la posibilidad de establecer relaciones epidemiológicas entre ellos.

Parisi y Hecht (1980), fueron los primeros que utilizaron los perfiles plasmídicos para distinguir diferentes cepas de *S. epidermidis*. Archer y cols. (1982), han combinado esta técnica con la fagotipia y antibiogramas para establecer la relación epidemiológica entre aislados de pacientes con endocarditis. 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 bacteriemia por catéteres intravenosos (Struelens y cols., 1990).

### **b.2.- Análisis molecular de plásmidos**

La plasmidotipia es una metodología que tiene ciertas limitaciones inherentes a la propia técnica debido a que un plásmido puede existir en diferentes formas moleculares (superhelicoidal, circular y lineal) que migran de forma diferente en los geles de agarosa; además plásmidos que han migrado de igual forma no implica que se trate de un mismo plásmido, este hecho se ha tratado de solventar utilizando endonucleasas de restricción.

Al realizar la digestión de los plásmidos mediante endonucleasas de restricción (que catalizan la rotura de la doble hebra de ADN en sitios de reconocimiento específicos), obtenemos unos fragmentos de ADN de diferentes tamaños que son separados por electroforesis, resultando una serie de patrones que pueden ser comparados para determinar su grado de afinidad.

### **b.3.- Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción**

Cada enzima de restricción (endonucleasa) corta el ADN en una secuencia específica de nucleótidos. El número y tamaño de los fragmentos está relacionado con la composición de los nucleótidos en la secuencia de reconocimiento, así como con el número de dichas secuencias presentes en la cadena de ADN.

El ADN cromosómico cuando es digerido con endonucleasas de alta frecuencia de corte ocasiona un elevado número de fragmentos de restricción relativamente pequeños. Los perfiles se obtienen por separación en geles de agarosa. Todos los aislados bacterianos son tipables mediante esta técnica.

Una limitación de este método es el alto número de bandas que se obtienen lo que hace muy dificultoso la interpretación de los resultados. Además Bialkowska-Hobrazanska y cols. (1990), demostraron en estafilococos *coagulasa* negativos que diferencias en el contenido de plásmidos de aislados relacionados epidemiológicamente puede causar variaciones en los patrones obtenidos.

#### **b.4.- Southern blot de la huella genética del ADN cromosómico**

En orden a reducir la complejidad de los patrones obtenidos por la digestión del ADN cromosómico con endonucleasas de restricción, los fragmentos obtenidos en electroforesis de geles de agarosa se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de nylon. Usando un fragmento de ADN como sonda, pueden detectarse fragmentos de restricción que contengan secuencias homólogas a la sonda (Southern, 1975). Las variaciones en el número y tamaño de estos fragmentos reflejan variaciones en el número de locus homólogos a la sonda.

Todas las cepas que posean el locus homólogo son tipables y los resultados muy reproducibles. El procedimiento requiere alguna experiencia técnica. El poder discriminatorio está directamente relacionado con el número y la variabilidad de los fragmentos detectados. Las sondas más efectivas son aquellas que detectan múltiples bandas simultáneamente.

### b.5.- Ribotipia

Esta basada en la técnica anterior y del mismo modo se usa una sonda para reducir el elevado número de bandas generadas por REA (análisis con enzimas de restricción) y simplificar la interpretación de los perfiles genómicos. Pero en este caso la sonda es de ARNr, por lo tanto, la utilización de sondas basadas en un ARNr con fines de tipado recibe el nombre de ribotipia.

En 1986, Patrick y Francine Grimont describen por primera vez esta técnica e informan del uso de una sonda universal de ARNr de *E. coli*.

En el cromosoma bacteriano los genes que codifican para la producción de 16S, 23S y 5S ARN están organizados en unidades de transcripción policistrónicas u operones. El hecho de que en ribotipia se trabaje con los operones ADNr se debe a que están presentes en múltiples copias y tienen un alto grado de conservación (Woese, 1987). En las bacterias muchas de tales secuencias, que codifican para el ARNr, encontradas en las bacterias parecen haber presentado cambios pequeños durante el proceso de evolución, con lo que sondas específicas para estas secuencias pueden tipar un amplio rango de bacterias entre las que se encuentran los ECN (Izard y cols, 1992).

El ARNr (16S + 23S) de *E. coli* es usado como molde para obtener la sonda por medio de la transcriptasa inversa, dicha sonda es un ADNc que se marca radioactivamente o enzimáticamente. Se hibrida el ADN bacteriano problema (que previamente ha sido digerido con endonucleasas de restricción y transferido por el método Southern a una membrana de nylon o nitrocelulosa) con la sonda, y las variaciones obtenidas en el número y tamaño de los fragmentos de la digestión del ADN bacteriano (complementarios con el ARNr) es lo que permite tipificar las bacterias.

### b.6.- Electroforesis en campo pulsado

Variante de la electroforesis convencional en campo unidireccional. Fue descrita por primera vez por Schwartz y Cantor en 1984, los cuales demostraron que grandes moléculas de ADN (mayores de 50 kb) pueden ser separadas en un gel de agarosa cuando están sometidas a la influencia de campos eléctricos alternos que provocan continuos cambios en la *dirección de migración de los fragmentos de ADN*. En estos cambios de reorientación juega un papel importante el peso molecular del fragmento de ADN; ya que los fragmentos de mayor peso molecular necesitan más tiempo para reorientarse, antes que puedan migrar a través del gel, que los de menor peso molecular.

Este proceso se conoce como electroforesis en campo pulsado. (PFGE). Existen muchas variantes de PFGE; aunque la más usada es el campo eléctrico homogéneo de contorno cerrado (CHEF) descrito por Chu y cols. en 1986, en el que 24 electrodos están ordenados en un contorno hexagonal que ofrece ángulos de reorientación de 60° y 120°.

En el PFGE, una suspensión de células bacterianas se incluye en bloques de agarosa. Siendo muy importante estandarizar cuidadosamente la cantidad de células bacterianas, ya que la concentración de ADN va a influir en las distancias absolutas de migración y en la resolución. Posteriormente el material celular es digerido con proteinasa K y el ADN que queda en los bloques es expuesto a la acción de las endonucleasas de restricción, los fragmentos de ADN que se generan son separados al ser sometidos a la influencia de campos eléctricos alternos y posteriormente teñidos con bromuro de etidio.

Para obtener una buena resolución en los geles obtenidos por PFGE hay que ajustar, para cada especie bacteriana y cada endonucleasa de restricción, una serie de parámetros: pulsos eléctricos, voltaje, temperatura y concentración de agarosa.

El PFGE ha sido aplicado a estudios epidemiológicos de un amplio rango de especies entre las que se encuentran los ECN (Lina y cols., 1992). Ello se debe a que es capaz de detectar variaciones sutiles entre aislamientos relacionados filogenéticamente y epidemiológicamente.

#### **b.7.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Como hemos visto, los distintos procesos de hibridación de ácidos nucleicos actualmente están desarrollados hasta el punto de que pueden ser usados para la identificación y tipado de un amplio rango de microorganismos, pero estos procesos requieren que el organismo sea cultivado previamente. El hecho de que para algunos microorganismos no se hallan desarrollado métodos de cultivo (particularmente virus) y que otros requieran un largo periodo de cultivo para proporcionar suficientes ácidos nucleicos para su detección y caracterización, ha llevado a que se desarrollara la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la que se consigue replicar (amplificar) una secuencia específica de ácido nucleico.

La PCR fue introducida por Saiki y cols. en 1985 y es un método enzimático para amplificar exponencialmente un fragmento específico de ADN. Con este método una simple secuencia de ADN puede ser copiada  $10^9$  veces en unas tres horas. La reacción necesita de una ADN polimerasa termoestable, dos iniciadores o "primers" (que son oligonucleótidos sintéticos de 20 a 30 bases de longitud y cuyas secuencias son complementarias a cada uno de los extremos de las dos hebras del fragmento de ADN molde del que solo se requiere cantidades del orden de nanogramos) y los cuatro deoxirribonucleosidos trifosfatos que serán incorporados en el ADN.

Cada amplificación de PCR se subdivide en tres pasos:

- a) Desnaturalización: separación de las hebras de la doble cadena de ADN molde.

- b) **Apareamiento:** el ADN molde desnaturalizado hibrida (se aparea) con las secuencias complementarias de los iniciadores.

- c) **Extensión:** la ADN polimerasa termoestable cataliza la reacción de extensión de los iniciadores por la adición de nucleótidos para producir dos copias de la secuencia original.

Estos tres procesos (desnaturalización, hibridación y extensión) se dan en cada ciclo y la repetición de 20 ó 30 ciclos produce rápidamente un gran número de copias del ADN molde.

Para analizar los productos de la amplificación se han utilizado varios métodos. El método más simple es realizar una electroforesis para identificar el tamaño de los productos de la reacción, los productos obtenidos también se pueden digerir con una endonucleasa y analizar los fragmentos resultantes por electroforesis, pero se consigue una mayor especificidad y sensibilidad al analizar los productos mediante hibridación con una sonda específica. Aunque el método más informativo es determinar la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico amplificada.

**2.- OBJETIVOS**

Los ECN son uno de los principales microorganismos causantes de infección nosocomial. Estas especies son aisladas frecuentemente en los laboratorios de microbiología clínica, pero el hecho de que estos organismos estén presentes en la microflora de la piel y mucosas ha dado lugar a que el establecimiento de si un ECN es agente causal de infección sea un problema controvertido.

En esta tesis se abordará la problemática de valorar la significación clínica de los ECN aislados de hemocultivos, por lo que los estudios que hemos realizado con las cepas de ECN recibidas en nuestro laboratorio durante 1991, procedentes del Hospital Vall d'Hebron, van encaminados a conseguir los siguientes objetivos:

- 1.- Valorar los marcadores fenotípicos y genotípicos en la caracterización de los ECN, para conseguir este objetivo tendremos que:
  - 1.1.- Analizar los aislados recibidos mediante la aplicación de marcadores epidemiológicos convencionales (identificación, fagotipia con dos juegos de fagos (el de "Dean y Williams" y el de Martín de Nicolás) y otras técnicas alternativas de fagotipia).
  - 1.2.- Estudiar los patrones de sensibilidad a antimicrobianos de los aislados.
  - 1.3.- Analizar los aislados mediante la aplicación de marcadores epidemiológicos moleculares (plasmidotipia y electroforesis en campo pulsado).
- 2.- Valorar la utilidad de los marcadores epidemiológicos convencionales y moleculares para la confirmación de la significación clínica de los ECN.
- 3.- Establecer un esquema jerarquizado de utilización de los marcadores epidemiológicos en la caracterización de los ECN.

**3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1.- AISLADOS**

#### **3.1.1.- PROCEDENCIA DE LOS AISLADOS**

Durante 1991, el Departamento de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona usando el sistema de botellas Bactec (NR 660 HS) obtuvo una serie de hemocultivos en los que se aislaban ECN. Estos aislados fueron enviados a nuestro laboratorio (Laboratorio de Infecciones Intrahospitalarias del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (CNMVIS)) para su caracterización.

Una vez recibidos todos los aislados correspondientes a 1991 procedentes del citado hospital, escogimos aquellos que una vez caracterizados nos permitirían realizar una valoración acerca de la significación clínica de los ECN. Para lo cual seleccionamos todos aquellos casos que presentaban más de un aislamiento de ECN, de esta manera elegimos 158 aislados de ECN que correspondían a 63 episodios de bacteriemia de 52 pacientes.

#### **3.1.2.- ASPECTOS CLÍNICOS**

##### **a.- Pacientes**

Los aislados seleccionados corresponden a 52 pacientes, siendo 13 de ellos niños y 39 adultos. Entre los cuales encontramos: pacientes inmunocomprometidos que presentan enfermedad de base severa, pacientes que han sido sometidos a procesos quirúrgicos, pacientes con prótesis, catéteres, etc. y neonatos.

### **b.- Casos y episodios**

Hemos considerado 52 casos correspondientes a 52 pacientes en los que se sospechó bacteriemia y de los que se aisló la misma especie de ECN de distintos hemocultivos.

El hecho de que en algunos casos existieran, a lo largo del tiempo, numerosos hemocultivos en los que se habían aislado ECN, hizo que para obtener una mayor comprensión de lo que estaba ocurriendo durante el proceso infeccioso dividieramos los casos en periodos de tiempo que llamamos episodios. Considerando que los hemocultivos pertenecían a episodios distintos cuando transcurría al menos seis días sin hemocultivos positivos.

Siguiendo los criterios anteriormente expuestos, entre los 52 pacientes seleccionados tenemos casos con uno, dos, tres y cuatro episodios. De manera que los 158 aislados de ECN seleccionados pertenecían a 63 episodios de 52 pacientes en los que se sospechó bacteriemia.

### **c.- Valoración clínica de los distintos casos**

Una vez elegido el conjunto de casos con los que íbamos a trabajar, solicitamos a los médicos del hospital que en base a los criterios clínicos de que disponían realizaran una valoración en la cual determinarían, desde el punto de vista clínico, si los estafilococos coagulasa negativos aislados de cada caso eran agentes etiológicos de las enfermedades o si por el contrario eran simplemente contaminantes. En la Tabla 4. describimos tanto los casos como su valoración clínica.

TABLA 4: DESCRIPCIÓN Y VALORACIÓN CLÍNICA DE LOS CASOS.

Caso	Sexo	Edad	Área	Enfermedad de base	Aislado	Fecha	Nºhemo	Valoración clínica
1	M	≤ 12	P-3	Histocitosis maligna	1341	D-17-90	6-HE	Dudoso
					1342	D-17-90	14-HE	
2	M	56	M-2	Carcinoma pulmonar, metástasis ósea	1347	D-29-90	14-HE	Sin significación clínica
					1348	D-29-90	15-HE	
3	V	NC	C-10	Diálisis	1351	E-4-91	11-HE	Sepsis (Sepsis por catéter)
					1353	E-4-91	13-HE	
4	V	NC	C-10	Sin datos	1354	E-5-91	6-HE	Sin significación clínica
					1355	E-5-91	7-HE	
5	V	NC	M-2	Sin datos	1356	E-4-91	36-HE	Sin significación clínica
					1357	E-4-91	37-HE	
6	V	NC	A-3	Catéter intravenoso	1358	E-6-91	30-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					1359	E-6-91	31-HE	
7	V	NC	C-10	Catéter intravenoso	1364	E-16-91	25-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					1365	E-16-91	27-HE	

TABLA 4: CONTINUACIÓN.

Caso	Sexo	Edad	Área	Enfermedad de base	Aislado	Fecha	Nºhemo	Valoración clínica	
8	V	NC	A-3	Catéter intravenoso	1363	E-16-91	23-HE	Sepsis (Sepsis por catéter)	
					1366	E-16-91	22-HE		
					1368	E-18-91	20-HE		
					1367	E-18-91	21-HE		
					8'	3851	F-19-91		37-HE
					8''	3853	F-25-91		37-HE
					3856	F-25-91	31-HE		
9	M	NC	C-1	Sin datos	2700	E-31-91	45-HE	Sepsis	
					2703	E-31-91	46-HE		
10	V	NC	M-1	Sin datos	2704	F-6-91	19-HE	Sin significación clínica	
					2705	F-6-91	20-HE		
11	V	NC	C-1	Vía central de alimentación parenteral	2701	F-2-91	26-HE	Sepsis (sepsis por cateter)	
					2698	F-2-91	27-HE		
					2699	F-3-91	29-HE		
					2702	F-3-91	30-HE		
					11'	2709	F-13-91		21-HE
					2708	F-13-91	22-HE		
					2710	F-13-91	20-HE		
					2712	F-15-91	35-HE		

TABLA 4: CONTINUACIÓN.

Caso	Sexo	Edad	Área	Enfermedad de base	Aislado	Fecha	Nºhemo	Valoración clínica
12	M	5	P-9	Transplante hepático	3861	M-4-91	21-HE	Sepsis
					3862	M-4-91	3-HE	
13	V	≤12	P-5	Leucemia linfoide aguda	2706	F-12-91	67-HE	Dudoso
					2707	F-11-91	40-HE	
					2715	F-15-91	21-HE	
14	M	61	C-1	Pancreatitis, colelitiasis	3854	F-22-91	67-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
3855					F-22-91	68-HE		
14'					3857	M-2-91	29-HE	
3859					M-2-91	18-HE		
15	M	64	M-1	Prótesis mitral	3858	M-1-91	14-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					3860	M-1-91	15-HE	
16	M	67	C-1	Ampuloma, pancreatitis	3863	M-4-91	49-HE	Sepsis (sepsis por cateter)
					3864	M-4-91	26-HE	
17	M	2	P-7	Teratocarcinoma	6222	A-9-91	40-HE	Sepsis
					6223	A-9-91	41-HE	
					6224	A-11-91	26-HE	
18	M	NC	A-3	Catéter intravenoso	5809	A-23-91	14-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					5810	A-23-91	50-HE	
					5811	A-23-91	49-HE	

TABLA 4: CONTINUACIÓN.

Caso	Sexo	Edad	Área	Enfermedad de base	Aislado	Fecha	Nºhemo	Valoración clínica
19	M	62	C-6	Neoplasia de mama, metástasis ósea	5819	A-29-91	23-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					5820	A-29-19	24-HE	
20	M	73	M-4	Isquémia intestinal, colecistectomía	5818	A-27-19	47-HE	Sepsis (Sepsis por catéter)
					5817	A-27-91	46-HE	
					5816	A-27-91	45-HE	
					5821	A-27-91	48-HE	
21	V	67	A-3	Pancreatitis aguda, coledocistitis	5826	Y-4-91	25-HE	Sepsis (Sepsis por catéter con shock séptico)
					5827	Y-4-91	26-HE	
					5832	Y-6-91	41-HE	
					5834	Y-10-91	24-HE	
22	M	RN	P-2	Distress respiratorio, neumonía, enterocolitis necrotizante	5829	Y-2-91	24-HE	Dudoso
					6225	A-12-91	13-HE	
23	M	59	A-3	Neuromiopatía, tromboembolismo pulmonar, distress respiratorio, neumonía	5822	Y-2-91	15-HE	Sepsis (sepsis por catéter con shock séptico)
					5823	Y-3-91	23-HE	
					5824	Y-3-91	24-HE	
					5825	Y-2-91	14-HE	
24	V	≤ 12	P-5	Transplante de médula ósea	8626	J-24-91	46-HE	Sepsis
					8627	J-24-91	45-HE	

TABLA 4: CONTINUACIÓN.

Caso	Sexo	Edad	Área	Enfermedad de base	Aislado	Fecha	Nºhemo	Valoración clínica
25	V	55	C-1	Neoplasia de páncreas, insuficiencia aortica	5838	Y-11-91	8-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					5839	Y-11-91	9-HE	
26	V	62	C-1	Enfermedad de Crohn	5840	Y-13-91	12-HE	Sepsis (Sepsis por catéter)
					5841	Y-13-91	33-HE	
27	V	57	C-6	Neoplasia de lengua, quimioterapia	6216	M-31-91	23-HE	Dudoso
					6218	M-31-91	24-HE	
28	M	59	C-1	Pancreatitis, colelitiasis	6217	M-29-91	9-HE	Sepsis (Sepsis por catéter)
					6219	M-29-91	8-HE	
29	M	14	OT-3	Hemofilia, catéter intravenoso	7171	Y-27-91	52-HE	Sepsis (Sepsis por catéter)
					7176	Y-28-91	35-HE	
					7169	Y-27-91	50-HE	
					7170	Y-27-91	51-HE	
					7175	Y-28-91	34-HE	
29'					11677	L-17-91	63-HE	
					11681	L-17-91	62-HE	
29''			C-1		11712	G-26-91	44-HE	
		11715	G-21-91	22-HE				

TABLA 4: CONTINUACIÓN.

Caso	Sexo	Edad	Área	Enfermedad de base	Aislado	Fecha	Nºhemo	Valoración clínica
30	V	59	A-3	Colecistitis, pancreatitis	7177	Y-31-91	63-HE	Dudoso
					7178	J-3-91	42-HE	
					7179	J-3-91	39-HE	
					8596	J-3-91	40-HE	
31	V	70	M4	Brote de colitis ulcerosa	7180	J-2-91	14-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					7181	J-2-91	15-HE	
32	V	36	M1	Hidrocefalia	8597	J-5-91	3-HE	Sepsis
					8631	J-5-91	4-HE	
33	M	85	C-10	Insuficiencia renal crónica	8604	J-11-91	8-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					8605	J-11-91	9-HE	
34	V	45	A-3	Fístula intestinal, insuficiencia renal, insuficiencia respiratoria	8598	J-10-91	51-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					8599	J-10-91	52-HE	
					8600	J-10-91	53-HE	
					8601	J-10-91	54-HE	
					8602	J-10-91	55-HE	
35	M	10	P-5	Leucemia aguda	8606	J-10-91	79-HE	Dudoso
					8607	J-10-91	80-HE	

TABLA 4: CONTINUACIÓN.

Caso	Sexo	Edad	Área	Enfermedad de base	Aislado	Fecha	Nºhemo	Valoración clínica
36	V	67	A-3	Cardiopatía isquémica, insuficiencia respiratoria	8609	J-13-91	25-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					8610	J-13-91	26-HE	
					8612	J-14-91	23-HE	
					8613	J-14-91	24-HE	
37	V	RN	P-2	Enterocolitis necrotizante	8618	J-15-91	26-HE	Sepsis (sepsis postquirúrgica)
8619					J-18-91	31-HE		
37'					11666	L-10-91	17-HE	
11667					L-10-91	18-HE		
38	V	72	C-10	Insuficiencia renal crónica, arteriopatía	8620	J-18-91	26-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					8629	J-18-91	16-HE	
39	V	26	A-3	Quemaduras en el 97% del cuerpo	11660	L-2-91	35-HE	Sepsis
					11661	L-2-91	32-HE	
40	V	9	P-4	Tetraplegia espástica por traumatismo craneal intraparto	11663	L-7-91	40-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					11664	L-7-91	39-HE	
41	M	NC	M-4	Sin datos	11668	L-10-91	47-HE	Sepsis
					11669	L-10-91	48-HE	

TABLA 4: CONTINUACIÓN.

Caso	Sexo	Edad	Área	Enfermedad de base	Aislado	Fecha	Nºhemo	Valoración clínica
42	V	1	P3	Leucemia linfoblástica aguda	5806	A-19-91	23-HE	Dudoso
					5808	A-22-91	27-HE	
42'					8611	J-13-91	34-HE	
					8630	J-14-91	50-HE	
					8615	J-15-91	38-HE	
					8614	J-15-91	39-HE	
42''					8625	J-21-91	12-HE	
					8628	J-21-91	13-HE	
42'''					11658	L-1-91	50-HE	
					11659	L-1-91	51-HE	
43	V	12	P-7	Astrocitoma	11686	L-27-91	1-HE	Sin significación clínica
					11687	L-25-91	14-HE	
44	V	54	A-3	Pancreatectomía	11690	L-28-91	40-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					11691	L-28-91	41-HE	
45	M	1	P-9	Transplante hepático, poliinfectado por enterococo y <i>P. aeruginosa</i>	11696	G-1-91	5-HE	Sin significación clínica
					11697	G-1-91	15-HE	
46	V	48	A-3	Broncopatía crónica, neoplasia de esófago	11694	L-27-91	39-HE	Sepsis (sepsis postoperatoria)
					11692	L-29-91	16-HE	
					11693	L-29-91	17-HE	

TABLA 4: CONTINUACIÓN.

Caso	Sexo	Edad	Área	Enfermedad de base	Aislado	Fecha	Nºhemo	Valoración clínica
47	V	88	C-9	Contusión cerebral	11700	G-9-91	16-HEg	Sin significación clínica
					11701	G-9-91	16-HEp	
					11702	G-9-91	26-HEp	
					11703	G-9-91	26-HEg	
48	M	46	A-3	Neoplasia de páncreas	11714	G-27-91	18-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					11716	G-27-91	24-HE	
					11717	G-27-91	19-HE	
					11720	G-27-91	25-HE	
49	V	61	C-14	Hemorragia subaracnoidea	11728	G-22-91	19-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					11711	G-22-91	20-HE	
50	M	RN	P-2	Cardiopatía congénita,traumatismo en el parto, distress respiratorio	12366	O-2-91	3-HE	Dudoso
					12367	O-2-91	6-HE	
51	M	61	M-9	Lesión isquémica cerebral	13230	O-14-91	30-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					13231	O-14-91	31-HE	
52	M	47	M-4	Colitis ulcerosa	11704	G-16-91	40-HE	Sepsis (sepsis por catéter)
					11705	G-16-91	39-HE	
					11707	G-16-91	42-HE	
					11706	G-16-91	39-HE	
					11708	G-16-91	18-HE	

Las abreviaturas utilizadas en la tabla 4 son las siguientes:

La clasificación que a continuación se cita para las distintas áreas y servicios hospitalarios, se realizó basandonos en los criterios del informe EPINE (1992):

- **C:** área de cirugía. Servicios del área de cirugía:
  - C1:** cirugía general.
  - C6:** cirugía cardíaca.
  - C9:** neurocirugía.
  - C14:** oftalmología.
- **M:** área de medicina. Servicios del área de medicina:
  - M1:** medicina interna.
  - M2:** enfermedades infecciosas.
  - M4:** digestivo; neurología.
- **P:** área de pediatría. Servicios del área de pediatría:
  - P2:** neonatos.
  - P3:** lactantes.
  - P4:** escolares.
  - P5:** hematología infantil.
  - P7:** oncología infantil.
- **A:** área de atención intensiva. Servicios del área de atención intensiva:
  - A3:** UCI mixta.
- **OT:** área de otros servicios. Servicios del área otros servicios:
  - OT3:** otros servicios.

A cada paciente se le asignó un número de caso y para diferenciar los episodios de un mismo caso se les nombró con el número de caso al que pertenecían seguido de apóstrofe. **D:** Diciembre; **E:** Enero; **F:** Febrero; **M:** Marzo; **A:** Abril; **Y:** Mayo; **J:** Junio; **L:** Julio; **G:** Agosto; **O:** Octubre; **M:** mujer; **V:** varón; **NC:** no consta edad. **HE:** hemocultivo.

### **3.1.3.- CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN**

Los aislados eran enviados por el laboratorio de microbiología del hospital identificados como "estafilococo coagulasa negativo".

En el momento de su recepción en nuestro laboratorio, cada aislado se sembró en una placa de agar sangre y se incubó a 37°C durante 18 horas.

Aquellos aislados que llegaban contaminados, eran reaislados a partir de la colonia sospechosa en placas de agar sangre incubándose bajo las condiciones anteriormente descritas con el fin de obtener un cultivo puro. Para asegurarnos que el nuevo cultivo era un ECN se sembraba en placas de manitol salado incubándose bajo las condiciones ya descritas.

Tras corroborar que se trataba de un ECN y que trabajábamos con un cultivo puro el microorganismo se conservaba en leche descremada a -70°C hasta su estudio.

### **3.2.- IDENTIFICACIÓN**

Los aislados que estaban conservados en leche descremada se sembraban en agar sangre obteniéndose un cultivo a partir del cual se realizaba la identificación del microorganismo siguiendo el esquema de Kloos y Schleifer (1975a,b), realizándose las siguientes pruebas:

#### **3.2.1- 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 los diferentes aislados durante 4-5 días a 37°C.

### 3.2.2.- ACTIVIDAD COAGULASA

Se realizó según el método de Barry y cols. (1973). Según el cual, se sangraba un conejo de nuestro animalario, recogiendo la sangre en citrato trisódico con una concentración final del 1%. Se separó el plasma por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos, y se guardó el sobrenadante a 4°C hasta su utilización.

Por cada aislado se distribuyó en un vial 300  $\mu$ l de PBS, 100  $\mu$ l de plasma y dos gotas de un cultivo de estafilococos crecido en BHI (infusión de cerebro, corazón) durante 18 horas a 37°C. A continuación, se incubaban dichos viales en un baño a 37°C durante 4 horas, y se observaba 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.

### 3.2.3.- NUCLEASA TERMOESTABLE

Esta prueba fue realizada siguiendo la técnica de Barry y cols. (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 los pocillos de aproximadamente 3mm de diámetro de una placa de agar que contenía ADN y azul de toluidina.

Tras la incubación a 37°C durante 4 horas, los estafilococos productores de nucleasa termoestable lisaban el ADN 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 ADNsa/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.

### 3.2.4.- 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 hematíes 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 ( $\geq 1,5$  mm de halo).

(±): hemólisis débil o moderada ( $< 1,5$  mm de halo).

(-): hemólisis no detectable.

### 3.2.5.- ACTIVIDAD DESOXIRRIBONUCLEASA (DNAsa)

Para detectar la actividad DNAsa, los aislados se siembran rayando un medio que contiene ácido desoxirribonucleico y azul de toluidina, se incuban a 37°C durante 24 H.

Los microorganismos que tienen actividad DNAsa despolimerizan el DNA, y ésta degradación del DNA se detecta porque se produce un viraje de color (de azul a rosa) alrededor de la siembra del microorganismo.

### 3.2.6.- ACTIVIDAD UREASA

Con ésta prueba determinamos la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea, por la acción de una enzima amidohidrolasa llamada ureasa formando dos moléculas de amoníaco y dando carbonato amónico como producto final (Christensen, 1946).

Los aislados fueron sembrados en tubos que contenían 2 ml de agar urea de Christensen y se incubaron a 37°C durante 24 h. Si había actividad ureasa, la urea era metabolizada produciéndose una alcalinización del medio

que era detectada gracias al indicador rojo fenol. De modo que en una reacción positiva aparecía un color rosa intenso y en una reacción negativa no se produce cambio de color.

### 3.2.7.- ACTIVIDAD DECARBOXILASA

La decarboxilación es un proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas decarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos (arginina y ornitina) en su grupo carboxilo (-COOH) dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico (Smith y cols, 1968).

Las decarboxilasas son inducidas por el microorganismo cuando este es cultivado en un medio ácido en presencia del sustrato específico, los productos de la decarboxilación, provocan una desviación del pH hacia la alcalinidad (Møller, 1955).

Cada aislado es sembrado en tres tubos de caldo decarboxilasa, según la fórmula descrita por Falkow (1958), un tubo control sin aminoácidos, otro con arginina y el último con ornitina. Se cubren con aceite mineral y se incuban a 37°C durante 5 días. Durante la incubación las bacterias fermentan la dextrosa acidificando el medio (el medio vira de púrpura a amarillo); en este momento en el que el medio es ácido, si la bacteria produce la enzima decarboxilasa específica, se decarboxilan los aminoácidos y los productos de dicha decarboxilación alcalinizan el medio (produciéndose un reviraje al color púrpura inicial).

### 3.2.8.- ACTIVIDAD FOSFATASA

Los microorganismos fueron sembrados en un tubo que contenía agar nutritivo inclinado, al que se le añadió sal sódica difosfato de fenoftaleina (PDP al 1,5%), y se incubaron a 37°C durante cinco días.

Se utilizó 0,5 ml de hidróxido sódico (NaOH) 10N como reactivo para revelar la actividad fosfatasa.

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

### 3.2.9.- PRODUCCIÓN DE ACETILMETILCARBINOL (ACETOÍNA)

A partir de un inóculo poco denso, los aislados fueron sembrados en 2,5 ml de caldo de Clark y Lubs (1915), caldo RM/VP que contiene peptona y glucosa, y se incubaron a 30 °C durante cinco días. En presencia de oxígeno atmosférico, los productos finales (acetoína y 2,3-butanodiol) son oxidados a diacetilo. Después de la incubación a los cultivos se le agregaron los reactivos VP de Barritt (1936) directamente y en el siguiente orden:

- 0,6 ml de una solución  $\alpha$ -naftol al 5%. Se trata de una solución alcohólica que actúa como intensificador del color.

- 0,2 ml de una solución de hidróxido potásico al 40% que contribuye a la absorción del CO<sub>2</sub>.

Se agitó el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico con el fin de oxidar la acetoína 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 la interpretación de los resultados.

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

### 3.2.10.- REDUCCIÓN DE NITRATOS

Los aislados se sembraron en un tubo que contenía 5 ml de caldo nitrado (medio de nitrato potásico). Este medio favorece el crecimiento y ofrece las condiciones anaeróbicas necesarias para que sea activada la

enzima nitrataasa sensible al oxígeno. Se incubaron a 30°C durante cinco 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- $\alpha$ -naftilamida al 0,6%).
- 1 ml de reactivo B (ácido sulfanílico al 0,8%).

La reducción del nitrato ( $\text{NO}_2$ ) está indicada por la aparición de color cuando el nitrato reacciona con los dos reactivos y se forma un compuesto diazoico (p-sulfobenceno-azo- $\alpha$ 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  $\pm$  a los aislados que reducen débilmente los nitratos, en cuyo caso adquieren un color rosado. El tubo testigo debe presentar muy poca o ninguna coloración.

Algunos microorganismos son capaces de reducir el nitrato a nitrito, aunque destruyen el nitrito con la misma rapidez con la 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. Para lo cual se agrega una pequeña cantidad de polvos de zinc sobre los tubos que no desarrollaron color. Una prueba positiva de esta reducción se traduce por una ausencia de color, e indica que el nitrato fue reducido a nitrito y este último fue reducido a gas. Una prueba negativa dará un color rosado intenso indicando que el nitrito no ha sido reducido por el microorganismo y está presente en el medio.

### 3.2.11.- FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

La capacidad de un organismo de fermentar los hidratos de carbono 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 inoculador múltiple. Se incubaron a 30°C durante cinco días, al cabo de los cuales se realizó una lectura.

Las reacciones fueron interpretadas de la siguiente manera:

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

- ( $\pm$ ): débil producción de ácido. Color amarillo pálido en el lugar donde está el inóculo.

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

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

### **3.2.12.- SUSCEPTIBILIDAD A LA NOVIOBIOCINA**

La susceptibilidad de los estafilococos coagulasa negativos a la novobiocina se comprobó inoculando las cepas crecidas en BHI mediante un inoculador múltiple en una placa que contiene medio A y novobiocina a una concentración de 1,6  $\mu\text{g/ml}$ .

Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37°C y se procedió a su lectura. Los microorganismos se consideraban sensible cuando no se observaba ninguna colonia.

### **3.2.13.- 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 0,4  $\mu\text{g/ml}$  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 eritromicina. Cada placa se sembró con un inoculador múltiple 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.- FAGOTIPIA**

#### **3.3.1.- PROPAGACIÓN DEL JUEGO DE FAGOS DE "DEAN Y WILLIAMS" Y DEL JUEGO OBTENIDO EN EL C.N.M.V.I.S.**

En este estudio se utilizaron dos juegos de fagos; el juego de "Dean y Williams" (1973) compuesto por veinte fagos y otro juego de doce fagos obtenido en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Martín de Nicolás y cols., 1990). Cada fago tiene su cepa propagadora en la cual se multiplica, fagos y cepas se conservan a -70°C.

##### **a) 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 inundaba una placa de agar común 1,1 con un cultivo de 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, considerando como RTD la máxima dilución que produce lisis confluyente.

### b) Propagación en medio sólido

Se realizó por el método de agar semisólido descrito por Swanstrom y Adams (1951). Se calentó el agar semisólido distribuido en tubo a 6ml. 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 de 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 caldo por medio de una pipeta Pasteur doblada en ángulo recto. Esta suspensión se centrifugó a 5.000 r.p.m. una hora y el sobrenadante fue recogido y filtrado mediante unas membranas de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Por último, se realiza 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 se liofilizaron y fueron guardados a -70°C.

### c) 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 su 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, B1 y 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  $10^{-1}$  o  $10^{-2}$  veces menor, el 3 a títulos  $10^{-3}$  o  $10^{-4}$  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. Las Tablas 5 y 6 muestran los espectros líticos de los fagos de los dos juegos utilizados.

Una vez obtenidos los fagos en las condiciones mencionadas se conservaban a  $4^{\circ}\text{C}$ , y a partir de ellos se prepararon las diluciones al 1000xRTD para hacer la fagotipia. Diluciones que se repusieron periódicamente en previsión de una posible pérdida de título.

## ESPECTRO LÍTICO DE LOS FAGOS DEL JUEGO DE DEAN Y WILLIAMS

CEPAS	FAGOS																			
	15	27	28	28A	37	48	71	82	155	157A	165	275	275A	456	459	471A	A6C	RG	B1	A9C
15	5	.	.	.	.	.	3	0	5	.	.	4	4	.	5	.	.	.	1	.
27	4	5	.	5	.	2	5	2	5	.	.	5	5	5	5	5	4	.	5	.
28	.	.	5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28A	1	.	.	5	.	.	4	.	3	.	.	3	3	.	4	3	3	.	3	.
37	.	4	.	.	5	0	5	.	5	.	.	4	4	1	.	1	.	.	.	.
48	4	5	.	.	.	5	5	.	4	.	.	4	4	.	5	.	4	.	3	.
71	4	4	.	.	.	5	5	5	.	.	.	4	4	.	5	.	5	4	.	.
82	.	4	3	5	.	.	4	5	5	2	.	5	5	2	4	4	4	4	4	.
155	5	.	.	.	.	.	5	.	5	.	.	5	5	.	4	5	.	.	5	0
157A	5	4	.	1	.	4	4	.	5	5	.	5	4	.	5	.	4	.	.	0
165	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5	.	.	.	.	.	.	.	.	.
275	3	.	.	3	.	.	5	.	4	.	.	5	5	.	5	3	.	.	5	.
275A	4	5	.	1	.	3	5	.	4	.	.	5	5	.	5	3	2	.	4	.
456	5	5	.	5	.	3	5	4	5	2	.	5	5	5	5	5	5	.	5	0
459	5	.	.	5	.	2	5	2	4	.	.	5	5	5	5	5	3	.	5	0
471A	5	5	.	4	.	.	5	2	5	.	.	5	5	5	5	5	4	.	2	0
A6C	5	5	.	3	.	.	5	0	5	.	.	5	5	3	5	5	5	.	5	.
RG	3	.	.	.	.	.	4	.	.	.	.	4	3	.	.	.	.	5	.	0
B1	5	2	.	5	.	1	5	.	5	.	.	5	5	5	5	5	1	.	5	0
A9C	5	1	.	.	.	0	5	.	4	.	.	4	3	.	4	4	2	.	0	5

TABLA 5: ESPECTRO LÍTICO DE LOS FAGOS DEL JUEGO DE "DEAN Y WILLIAMS"

ESPECTRO LÍTICO DE LOS FAGOS AUTOCTONOS

CEPAS	FAGOS											
	89904	89954	90319	90338	90340	90341	90352	90502	90509	43763	43764	43785
15	.	5	4	5	3	3	.	5	.	4	3	.
27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
48	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
71	3	3	5	5	5	5	3	5	5	5	5	5
82	.	.	1	3	.	.	3	3	.	.	.	.
155	5	5	4	5	5	4	3	5	5	5	5	5
157A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
165	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
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	.	.	.	.	.	.	3	.	.	.	.	.
459	5	4	4	2	4	5	4	5	5	5	4	4
471A	.	.	.	5	2	0	5	3	5	2	.	3
A6C	.	.	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.
RG	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B1	.	.	.	2	.	.	5	2	1	.	.	.
A9C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

TABLA 6: ESPECTRO LÍTICO DE LOS FAGOS AUTÓCTONOS

### 3.3.2. TÉCNICA DE FAGOTIPIA

#### a) Realización

Cada aislado se inoculó en un tubo de caldo común a partir de un cultivo puro y se incubó a 48°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 el dispensador de fagos diseñado por Lindwell (1959) que deposita simultáneamente todas las gotas de 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 los 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.

#### b) Lectura de resultados

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

CL : lisis confluyente.

+ + : más de 50 placas de lisis.

+ : entre 20 y 50 placas de lisis.

+ - : menos de 20 placas de lisis.

### **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. 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 la fagotipia se incluían siempre tres cepas control (3002, 11684, 11334), cuyo fagotipo es conocido (Tabla 7), corrigiendo aquellas diluciones cuyo efecto no era el esperado.

TABLA 7: PATRONES DE FAGOTIPIA DE LAS CEPAS CONTROL

FAGOS	CEPAS		
	3002	11334	11684
15	CL	+·	+·
27	CL	++	+·
28	-	+·	-
28A	-	CL	-
37	+	+	-
48	-	++	+
71	++	CL	+
82	CL	++	+·
155	++	CL	++
157A	CL	+·	-
165	-	+·	-
275	CL	CL	+
275A	CL	CL	+
456	+·	CL	CL
459	CL	CL	CL
471A	-	CL	CL
A6C	+	CL	CL
B1	CL	++	+·
RG	+	-	-
A9C	++	CL	CL
89904	++	CL	+
89954	++	+	+·
90319	++	CL	++
90338	++	CL	+
90340	++	CL	CL
90341	++	CL	++
90352	++	CL	++
90502	++	CL	CL
90509	++	++	++
43763	-	CL	CL
43764	-	CL	CL
43785	+	CL	CL

Fagotipia realizada al 1.000 RTD.

### **3.4.- TÉCNICA DE FAGOTIPIA INVERSA**

La técnica fue realizada según el método de 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 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 para obtener una concentración final de 0,5 µg/ml. Tras incubar nuevamente en baño a 37°C durante media hora se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 2 ml 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 5.000 r.p.m. 15 minutos y se recogió el sobrenadante, en donde se supone que se encontraban los fagos inducidos.

A partir de aquí, se procedió igual que en la fagotipia, utilizando estos fagos inducidos (como supuestos fagos) y estudiando los patrones de lisis que producían sobre las cepas propagadoras de los dos juegos utilizados. La lectura se realizó siguiendo los mismos criterios que en la fagotipia.

### **3.5.- TÉCNICA DE FISK**

Se inducen los fagos lisogénicos mediante mitomicina C de igual manera que en el apartado anterior.

Los fagos inducidos de cada aislado se enfrentan con cada uno de los aislados a partir de los cuales se había realizado la inducción (Fisk, 1942).

### 3.6.- PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

#### 3.6.1.- AGENTES ANTIMICROBIANOS PROBADOS

La selección de los agentes antimicrobianos con los que íbamos a trabajar se hizo combinando tres criterios:

- Tratamos que estuvieran representados el máximo número de grupos antimicrobianos.
- Elegimos aquellos que estaban más indicados en el tratamiento de infecciones causadas por el género *Staphylococcus*.
- Escogimos aquellos sobre los que había publicados numerosos estudios acerca de la sensibilidad en los ECN.

Los antibióticos utilizados y los rangos de concentración en microgramos por mililitro se pueden observar en la Tabla 8

**TABLA 8: ANTIBIÓTICOS Y RANGOS DE CONCENTRACIONES ( $\mu\text{g/ml}$ )**

Ácido fucsídico . . . . .	0,03 - 32
Ampicilina/Clavulánico . . . . .	0,12 - 64
Cefotaxima . . . . .	0,12 - 1024
Ciprofloxacina . . . . .	0,06 - 16
Clindamicina . . . . .	0,06 - 64
Cloranfenicol . . . . .	0,25 - 64
Cloxacilina . . . . .	0,12 - 512
Eritromicina . . . . .	0,03 - 512
Fosfomicina . . . . .	0,12 - 256
Gentamicina . . . . .	0,06 - 1024
Penicilina . . . . .	0,03 - 1024
Tetraciclina . . . . .	0,125 - 64
Rifampicina . . . . .	0,03 - 1024
Vancomicina . . . . .	0,25 - 64

### 3.6.2.- MEDIO, INOCULACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Las diluciones de los antimicrobianos probados utilizados fueron preparadas en agua destilada estéril a partir de soluciones "madre" preparadas en el momento de hacer las placas para el estudio de las CMIs. Esta solución "madre" correspondió en todos los casos a una dilución 10 veces mayor que la concentración más alta que fuera a ser utilizada, y a partir de ella se hicieron diluciones 1:2 para conseguir el resto de las concentraciones mencionadas. El medio utilizado fue un agar Muller-Hinton.

El inóculo de las cepas se realizó a partir de un cultivo de 18 horas en agar sangre. Para ello se hacía una suspensión de la cepa ya crecida en PBS, ajustándola a una concentración de  $10^8$  microorganismos/mililitro.

Las cepas se inocularon con un multirreplicador (Microtiter) que deposita 0,001 ml de cada suspensión, con lo que de cada cepa se inocularon aproximadamente  $10^5$  unidades formadoras de colonias/mililitro.

En todas las ocasiones se incluyó una placa del mismo medio sin antibióticos como control de crecimiento.

Las placas inoculadas fueron incubadas a 37°C entre 18-24 horas. Al cabo de este tiempo se realizó la lectura del antibiograma, siendo la CMI la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano tras 18 horas de incubación. Se expresa en  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.6.3.- CONTROLES

Se emplearon las cepas *S. aureus* NCTC 6571, NCTC 10442, ATCC 29213 y ATCC 25923.

## 3.6.4.- INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para la interpretación de los resultados se siguieron los criterios del NCCLS. (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993). Tabla 9.

TABLA 9: VALORES ESTANDAR DE CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) (NNCLS, 1993)

	<u>Sensible</u>	<u>Intermedia</u>	<u>Resistente</u>
Ácido fucsídico	$\leq 1$	-	$\geq 2$
Ampicilina/clavulánico	$\leq 4/2$	-	$\geq 8/4$
Cefotaxima	$\leq 8$	16-32	$\geq 64$
Ciprofloxacina	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Clindamicina	$\leq 0,5$	1-2	$\geq 4$
Cloranfenicol	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Cloxacilina	$\leq 2$	-	$\geq 4$
Eritromicina	$\leq 0,5$	1-4	$\geq 8$
Fosfomicina	$\leq 32$	-	$\geq 64$
Gentamicina	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Penicilina	$\leq 0,12$	-	$\geq 0,25$
Tetraciclina	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Rifampicina	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Vancomicina	$\leq 4$	8-16	$\geq 32$

### 3.7.- PLASMIDOTIPIA

#### 3.7.1.- 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 100  $\mu$ l de solución de lisis, con lisostafina (Sigma) a una concentración final de 250 U/ml, para romper la pared celular.
- Se incubaron en baño con agitación durante media hora a 37°C.
- Se añadieron 200  $\mu$ l de la solución alcalina (NaOH y SDS), agitando suavemente el tubo. La solución se hizo viscosa debido a la lisis celular alcalina.
- El tubo se mantuvo en un baño con hielo durante 5 minutos y entonces se añadieron 150  $\mu$ l de una solución salina alta (acetato potásico), que proporciona una alta concentración de sales que aseguran la estabilidad de la doble hélice de DNA.
- Se mantuvo el tubo Eppendorf a 0°C durante 30 minutos.
- Estas tres macromoléculas contaminantes fueron separadas por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos. Se retiraron 400  $\mu$ l de sobrenadante mediante una micropipeta, transfiriéndolo a otro tubo Eppendorf.
- Un volumen de la solución fenol-cloroformo fue añadido al sobrenadante, para eliminar los lípidos y proteínas residuales antes de precipitar el ADN plasmídico con etanol.

- Se centrifugó 5 minutos a 12.000 r.p.m. y se recogieron 300  $\mu$ l de sobrenadante, que se transfirieron a otro Eppendorf.
- Se añadieron dos volúmenes (600  $\mu$ l) de etanol frío y 18 $\mu$ l de cloruro sódico 5M. Se centrifugó durante 5 minutos a 12.000 r.p.m. El sobrenadante se retiró con una pipeta.
- El sedimento se resuspendió en 25  $\mu$ l de una solución de Tris ClH y EDTA (TE) con ARNasa a una concentración final de 25  $\mu$ g/ml.
- Se incubó en estufa a 37°C 15 minutos para que actuara el enzima eliminando los restos de RNA.

### 3.7.2.- ELECTROFORESIS DEL ADN PLASMÍDICO.

En los pocillos de los geles de agarosa al 0,8% fueron colocados 10  $\mu$ l de muestra, obtenida por el procedimiento anteriormente descrito, junto con 2  $\mu$ l de 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 TAE 1X. Tras ser teñidos con bromuro de etidio media hora, los plásmidos fueron visualizados con un transiluminador de luz ultravioleta de 250 nm.

### 3.7.3.- CONTROLES

En un pocillo de los extremos se colocó, como control de peso molecular, el ladder (Supercoiled ladder de Sigma) que contenía 11 plásmidos cuyos tamaños variaban desde 2,1 a 16,2 kb.

### **3.8.- ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO**

En 1984, Schawartz y Cantor observaron que moléculas de ADN mayores de 50 Kb podían ser separadas mediante el uso de campos eléctricos alternativos en un proceso conocido como electroforesis en campo pulsado (Cantor y cols., 1988).

#### **3.8.1.- OBTENCIÓN DEL ADN**

- De un cultivo puro de 24 horas, se inocularon 10-20 colonias en 20 ml de BHI y se incubó a 37°C en agitación durante 3-4 horas.
- Tras añadir 0,5 ml de EDTA frío a cada cultivo y se centrifugó durante 20 minutos a 3.000 r.p.m.
- Lavar el sedimento con solución de lavado (frío) (10mM Tris ClH, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 1M ClNa) y centrifugar de nuevo. (Repetir este paso dos veces).
- Se resuspendió el depósito en 7 ml de solución de lavado.
- Se preparó un dilución 1/10 en solución de lavado y se midió la densidad óptica (D.O.) a 420 nm.
- Una vez medida la D.O. se calcula el número de células en la suspensión y a partir de esta suspensión inicial se obtiene otra de 10<sup>9</sup> UFC/ml.
- Preparar la agarosa LMP (agarosa de bajo punto de fusión) al 2% en solución de lavado, mezclar a partes iguales dicha agarosa y la suspensión bacteriana. Con esta mezcla se rellenan los moldes, preparándose así los bloques.
- Dejar los bloques de agarosa a 4°C y una vez endurecidos volcar en bijoux , a los que se ha añadido 3 ml de solución de lisis ( 6mM Tris ClH, 100mM EDTA, 1M ClNa, 0,5% Brij 59, 0,2% Deoxicolato sódico, 0,5% Lauril sarcosil) que contiene 30 U/ml de lisostafina

(Ambicin L) y 500 $\mu$ g/ml de lisozima. Incubar toda la noche a 37°C en un baño con agitación.

- Se retiró la mezcla de lisis y se reemplazó con 3 ml de solución de proteolisis ( 0,25M EDTA, 20mM EGTA, 1% Lauril sarcosil) con 250  $\mu$ g/ml de proteinasa K.

- Se incubó a 56°C durante 5-6 horas en agitación, transcurridas las cuales se cambia la mezcla de proteolisis con proteinasa K por otra fresca y se deja durante toda la noche.

- Se procedio a realizar tres lavados en TE, para eliminar la proteinasa K, dejando cada lavado al menos 10 minutos a 4°C. Los cambios se realizaron a 4°C.

- Los bloques pueden ser conservados en TE durante al menos 6 meses, cambiando la solución de TE mensualmente.

### 3.8.2.- DIGESTIÓN DEL ADN

- Se transfiere medio bloque a un Eppendorf y se añadió 100-200  $\mu$ l de la solución Y (33 mM Tris-acetato (pH 7,9), 10mM acetato de magnesio y 66 mM de acetato potásico) . Se dejó equilibrando durante 30 minutos en hielo.

- Se sustituyó la solución por 100  $\mu$ l de solución fresca que contiene 10 unidades de SmaI y se incubó a 30°C durante 3-4 horas.

- Se repitió este último paso de nuevo.

- Para terminar la digestión se añadió TE y se conservó a 4°C hasta su utilización.

### 3.8.3.- ELECTROFORESIS

- Para la electroforesis se utilizó un equipo CHEF-DR II de Biorad.

- Se preparó 400 ml de agarosa al 1,2% en solución 0,5 X de Tris borato (TBE) . Tras disolverla mantenerla a 55-60°C .

- Ensamblar el molde y comprobar que está nivelado, colocar el peine y volcar la agarosa dejándola enfriar.
- Una vez solidificada, retirar el peine e introducir en los pocillos los bloques de agarosa y rellenar los pocillos con agarosa, para inmovilizar el ADN.
- En el último pocillo se colocó un marcador de pesos moleculares (*E. coli* MG 1655 digerida con *Not I*).
- Se llenó el tanque de electroforesis con 2,5 litros de TBE 0,5 X y se dejó recircular hasta que se enfrió a 12°C .
- Se introduce el gel de agarosa comprobando que lo cubre el TBE 0,5 X.
- Las bandas de ADN fueron separadas con pulsos de 1 a 35 segundos durante 42 horas a 200 V.
- Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio a 1 µg/ml durante media hora y fue desteñido en agitación por espacio de dos o tres horas.
- El gel fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta de 250 nm., y fotografiado con una cámara Polaroid.

#### 3.8.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se asignó un tipo arbitrario a cada uno de los patrones de bandas obtenidos con la electroforesis en campo pulsado. La similitud entre los tipos fue evaluada con el programa informático MVSP (Kovach Computing Services, 85 Nant-y-Felin, Pentraeth, Anglesey LL758UY, Wales, Reino Unido) que realiza el análisis estadístico de multivariadas.

El programa creó una matriz de coeficientes de similitud, coeficiente de Sorensen o Dice (Römling, 1992) y generó un dendograma, por emparejamiento de medias no ponderadas, que relacionaba los diferentes patrones según los índices de similitud (Li, 1981).

## APÉNDICE

Como regla general, salvo que se indique lo contrario, todos los medios, reactivos y soluciones una vez elaborados se conservarán en nevera a 4°C hasta su uso.

### MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN

#### AGAR SANGRE

- Sangre de carnero . . . . .	5%	gr
- <u>Bacto Mueller Hinton medium</u>		
Ingredientes (por litro):		
Infusión de carne . . . . .	300	gr
Ácidos de casamino . . . . .	17,5	gr
Almidón . . . . .	17	gr
Bacto agar . . . . .	17	gr
pH final 7,3.		

Preparación: resuspender 38 gramos de polvos Mueller Hinton en un litro de agua destilada y hervir hasta disolver el medio 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	gr
Extracto de carne . . . . .	1	gr
D-manitol . . . . .	10	gr
Cloruro sódico . . . . .	75	gr

---

Bacto agar . . . . .	15	gr
Rojo fenol . . . . .	0,025	gr
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 la conservación de los cultivos. Cuando se prepara 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. Alicuotar a 0,5 ml en viales.

### MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

#### MEDIO P

Ingredientes (por litro):

Peptona . . . . .	10	gr
Extracto de levadura . . . . .	5	gr
Cloruro sódico . . . . .	5	gr
Glucosa . . . . .	1	gr
Bacto agar . . . . .	15	gr
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.

BHI (infusión de cerebro y corazón)

Ingredientes (por litro):

Infusión de cerebro de ternera	200	gr
Infusión de corazón de vacuno	250	gr
Peptona proteosa . . . . .	10	gr
Dextrosa . . . . .	6	gr
Cloruro sódico . . . . .	5	gr
Fosfato disódico . . . . .	2,5	gr

pH final 7,4.

Preparación: disolver 37 gramos en un litro de agua destilada.  
Distribuir a 5 ml por tubo y autoclavar.

PBS (Tampón fosfato)

Ingredientes (por litro):

Fosfato disódico . . . . .	1,09	gr
Fosfato sódico . . . . .	0,31	gr
Cloruro sódico . . . . .	8,5	gr

pH final 7

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

AGAR NUCLEASA TERMOESTABLE

Ingredientes (por litro):

Tris(hidroximetil)aminometano	6,1	gr
ADN . . . . .	0,3	gr
Cloruro sódico . . . . .	10	gr
Bacto agar . . . . .	10	gr
Cloruro cálcico anhidro . . . . .	1,1	gr
Azul de toluidina . . . . .	0,083	gr

Preparación: pesar 6,1 gramos de Tris y añadir un litro de agua destilada. Ajustar el pH a 9. Añadir el ADN, cloruro sódico, agar y cloruro cálcico anhidro y disolver calentando 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 PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DNAsaDNAsa test agar

Ingredientes (por litro):

Triptosa . . . . .	20	gr
Ácido deoxirribonucleico . . . . .	2	gr
Cloruro sódico . . . . .	5	gr
Agar . . . . .	15	gr

Preparación: Disolver 8,4 gr de DNAsa test agar en 200 ml de agua destilada. Calentarlo hasta la ebullición para la disolución completa del medio. Añadir azul de toluidina al 0,01% y autoclavar.

MEDIO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD UREASAUrea agar base:

## Ingredientes (por litro):

Peptona . . . . .	1	gr
Dextrosa . . . . .	1	gr
Cloruro sódico . . . . .	5	gr
Fosfato potásico monobásico .	2	gr
Urea . . . . .	20	gr
Rojo fenol . . . . .	0,012	gr

*Preparación:* Disolver por ebullición 12,45 gr de agar en 750 ml de agua destilada, esterilizar en autoclave y enfriar hasta 50°C, entonces añadirle 75 ml de una solución filtrada de urea agar base (21,75 gr de urea agar base en 75 ml de agua destilada). Distribuir en tubos a 2 ml.

MEDIO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DECARBOXILASADecarboxilasa medio base

## Ingredientes (por litro):

Peptona . . . . .	5	gr
Extracto de levadura . . . . .	3	gr
Dextrosa . . . . .	1	gr
Púrpura de bromocresol . . . . .	0,02	gr

*Preparación:* A un litro de medio base decarboxilasa, que previamente ha sido disuelto calentándolo suavemente, se le añade 0,5% de los aminoácidos-L apropiados. Se distribuye en tubos a 5 ml por tubo y se autoclava.

### MEDIO Y REACTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA

#### Agar nutritivo difosfato de fenolftaleína

##### Ingredientes (por litro):

##### - Agar:

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

pH final 7,3

##### - Sustrato:

Sal sódica difosfato fenolftaleína(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  $\mu\text{m}$  de diámetro y volcar asépticamente en placas Petri.

#### Reactivo para la prueba de la fosfatasa

##### Hidróxido sódico 10N (40%):

Hidróxido sódico . . . . .	40	gr
Agua destilada . . . . .	100	ml

#### REACTIVOS RM/VP (producción de acetoina)

##### Reactivo A): $\alpha$ -naftol al 5%

$\alpha$ -naftol . . . . .	5	gr
Alcohol etílico (absoluto) . . . .	100	ml

Reactivo B): hidróxido potásico al 40%

Hidróxido potásico . . . . .	40	gr
Agua destilada . . . . .	100	ml

### REACTIVOS PARA LA REDUCCIÓN DE NITRATOS

Reactivo A): Dimetil- $\alpha$ -naftilamida al 0,6%

Dimetil- $\alpha$ -naftilamida . . . . .	6	gr
Ácido acético 5N (30%) . . . . .	1	l

Reactivo B): Ácido sulfanílico al 0,8%

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

Preparación: disolver el dimetil- $\alpha$ -naftilamida en el ácido acético mediante un suave calentamiento. Ambos reactivos se filtran y se guardan protegidos de la luz en un frasco de topacio.

### MEDIO PARA DETERMINAR LA FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

#### Púrpura agar base

Ingredientes (por litro):

- Agar:

Peptona . . . . .	10	gr
Extracto de carne . . . . .	1	gr
Cloruro sódico . . . . .	5	gr
Bacto agar . . . . .	15	gr
Púrpura . . . . .	0,02	gr

pH final 6,8

- Sustrato:

Azúcares al 10% en H <sub>2</sub> O destil. . . . .	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%.

#### MEDIO PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA

Ingredientes:

Medio P . . . . .	180	ml
Novobiocina (16 µg/ml) . . . . .	20	ml

#### PRODUCCIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE GLICEROL CON ERITROMICINA

Ingredientes:

Púrpura agar base . . . . .	1	l
Glicerol . . . . .	10	ml
Eritromicina . . . . .	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 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. La concentración final de eritromicina es de 0,4 µg/ml.

**MEDIOS Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LAS TÉCNICAS DE FAGOTIPIA****CALDO COMÚN (Nutrient broth)**

Ingredientes (por litro):

Extracto de carne . . . . .	3	gr
Peptona . . . . .	5	gr
pH final 6,8.		

Preparación: disolver los 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	gr
TSB . . . . .	7,8	gr

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

**AGAR SEMISÓLIDO**

Ingredientes:

Caldo común . . . . .	1,2	gr
Bacto agar . . . . .	0,75	gr
Agua destilada . . . . .	150	ml

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

### CLOURURO CÁLCICO

Ingredientes:

Cloruro cálcico . . . . .	1	gr
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.

### REACTIVOS UTILIZADOS EN LA TÉCNICA DE PLASMIDOTIPIA

#### SOLUCIÓN DE LISIS

Ingredientes:

Tris ClH 1M pH 8 . . . . .	2,5	ml
EDTA 0,5M pH 8 . . . . .	2	ml
Glucosa 500 mM . . . . .	10	ml
Agua destilada . . . . .	85,5	ml

Preparación: Para elaborar el Tris-ClH 1M pesar 121,14 gr y disolverlos en 800 ml de Agua destilada, añadir ácido clorhídrico puro hasta conseguir un pH de 8 y enrasar con agua destilada hasta un litro. El EDTA 0,5M se obtiene al disolver 186,12 gr en 800 ml de agua destilada, se añade NaOH 10 N para disolverlo hasta llegar a un pH de 8 y se enrasa con agua destilada hasta un litro. En el caso de la glucosa 500 mM pesamos 9,908 gr de glucosa y los disolvemos en 100 ml de agua destilada estéril, esterilizando por filtración dicha solución. Las soluciones anteriormente descritas se guardan a temperatura ambiente exceptuando la glucosa 500 mM que se guarda a 4°C.

Una vez que tenemos todas las soluciones medimos todos los

componentes y los mezclamos obteniendo la solución de lisis que se filtra mediante una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Guardar a 4°C.

Al utilizar la solución de lisis hay que añadir 25  $\mu\text{l}$  de lisostafina (preparada con Tris ClH 1M a una concentración de 10.000  $\mu\text{g/ml}$  para conseguir una concentración final de 250  $\mu\text{g/ml}$ ) a 1 ml de solución de lisis.

### SOLUCIÓN ALCALINA

#### Ingredientes:

Hidróxido sódico 0,2M

SDS 1%

#### Preparación:

- El NaOH se prepara 0,4M (1,6 gramos en 100 ml de agua destilada estéril).

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

En el momento de usarse se coge un volumen de NaOH 0,4M y un volumen de SDS al 2%, obteniéndose así las concentraciones necesarias.

### SOLUCIÓN SALINA ALTA

#### Ingredientes:

Acetato potásico 5M . . . . .	60	ml
Ácido acético glacial . . . . .	11,5	ml
Agua destilada . . . . .	28,5	ml

Preparación: el acetato potásico 5M se prepara pesando 490,75 gramos y disolviéndolo en un litro de agua destilada.

SOLUCIÓN FENOL-CLOROFORMO

## Ingredientes:

Fenol . . . . .	500	ml
Cloroformo . . . . .	500	ml
Alcohol isoamílico . . . . .	10	ml
Hidroxiquinoleina . . . . .	1	gr
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 1M, 2 ml EDTA 0,5M, 20 ml C1Na 5M 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 en oscuridad.

CLOURURO SÓDICO 5M

## Ingredientes:

C1Na . . . . .	292,2	gr
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 1M . . . . .	10	ml
EDTA 0,5M . . . . .	2	ml
Agua destilada . . . . .	enrasar hasta un litro	

Preparación: medir las cantidades indicadas y filtrar en una membrana de 0,22  $\mu$ m de diámetro.

### TAMPÓN DE ELECTROFORESIS (TAE 1X)

Ingredientes para el TAE 50X:

Tris . . . . .	242	gr
Ácido acético glacial . . . . .	57,1	ml
EDTA 0,5M . . . . .	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 40 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 (10mg/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 100 $\mu$ l de la solución stock de bromuro de etidio. La concentración final es de 1 $\mu$ g/ml.

**SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA TÉCNICA DE PFGE****EGTA 0,1M**

Ingredientes:

EGTA . . . . .	19,02	gr
Agua destilada . . . . .	300	ml

Añadir NaOH 1N hasta un pH 8 para conseguir una buena disolución.

Enrasar con agua destilada hasta 500 ml. No necesita esterilización y conservar a temperatura ambiente.

**SOLUCIÓN DE LAVADO PARA ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO**

Ingredientes:

Tris ClH 1M . . . . .	10	ml
EDTA 0,5M . . . . .	20	ml
EGTA 0,1 M pH 8 . . . . .	100	ml
ClNa 5M . . . . .	200	ml

Preparación: ya ha sido descrita en la técnica de plasmidotipia.

SOLUCIÓN DE LISIS

Tris ClH 1M . . . . .	0,6	ml
EDTA 0,5M . . . . .	20	ml
ClNa 5M . . . . .	20	ml
0,5% Brij 59 . . . . .	0,5	gr
0,2% Deoxicolato sódico . . . .	0,2	gr
0,5% Lauril sarcosil . . . . .	0,5	gr

Ajustar al pH a 7,5 con ClH. Enrasar a 100 ml con agua destilada.  
Conservar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN DE PROTEOLISIS

EDTA 0,5M . . . . .	250	ml
EGTA 0,1M . . . . .	100	ml
Ajustar el pH a 9 con NaOH y añadir		
Lauril sarcosil 30% . . . . .	5	ml

Enrasar hasta 500 ml con agua destilada. No necesita esterilización.  
Conservar a temperatura ambiente.

TAMPÓN TBE 10 X

Tris . . . . .	108	gr
EDTA Na <sub>2</sub> . . . . .	4,65	gr
Ácido bórico . . . . .	55,65	gr
Agua destilada . . . . .	1000	ml

**4.- RESULTADOS**

#### **4.1- VALORACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS DE LOS CASOS ESTUDIADOS**

##### **4.1.1.- SELECCIÓN DE LOS AISLADOS**

Para realizar nuestro estudio seleccionamos los estafilococos coagulasa negativos basándonos en dos criterios:

- Que los ECN fueran aislados en diferentes hemocultivos de un mismo paciente.
- Que dispusiéramos de la información clínica del paciente.

De este modo seleccionamos 158 estafilococos coagulasa negativos de 63 episodios pertenecientes a 52 pacientes.

##### **4.1.2.- ORIGEN DE LOS AISLADOS**

El origen de todas las muestras en las que se aislaron los 158 estafilococos coagulasa negativos seleccionados fue la sangre.

##### **4.1.3.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES**

Al analizar los datos obtenidos de las historias clínicas observamos que los ECN seleccionados fueron aislados de pacientes que cumplían al menos una de las siguientes características:

- Rotura de la barrera natural de la piel como es el caso de los pacientes de cirugía, traumatología, etc.
- Presencia de dispositivos implantados como catéteres, prótesis, etc.
- Ser pacientes inmunocomprometidos.
- Ser neonatos.

#### 4.1.4.- VALORACIÓN CLÍNICA DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS POR ECN

Los hemocultivos de los 52 casos fueron valorados por el clínico en función de los resultados preliminares obtenidos en el laboratorio de microbiología del hospital estableciendo tres categorías:

- Hemocultivo sin significación clínica en cuyo caso al ECN aislado no se le daba un valor clínico, pudiendo ser considerado como contaminante.

- Hemocultivo de dudosa significación clínica en el que no estaba claro el valor clínico del ECN aislado de hemocultivo.

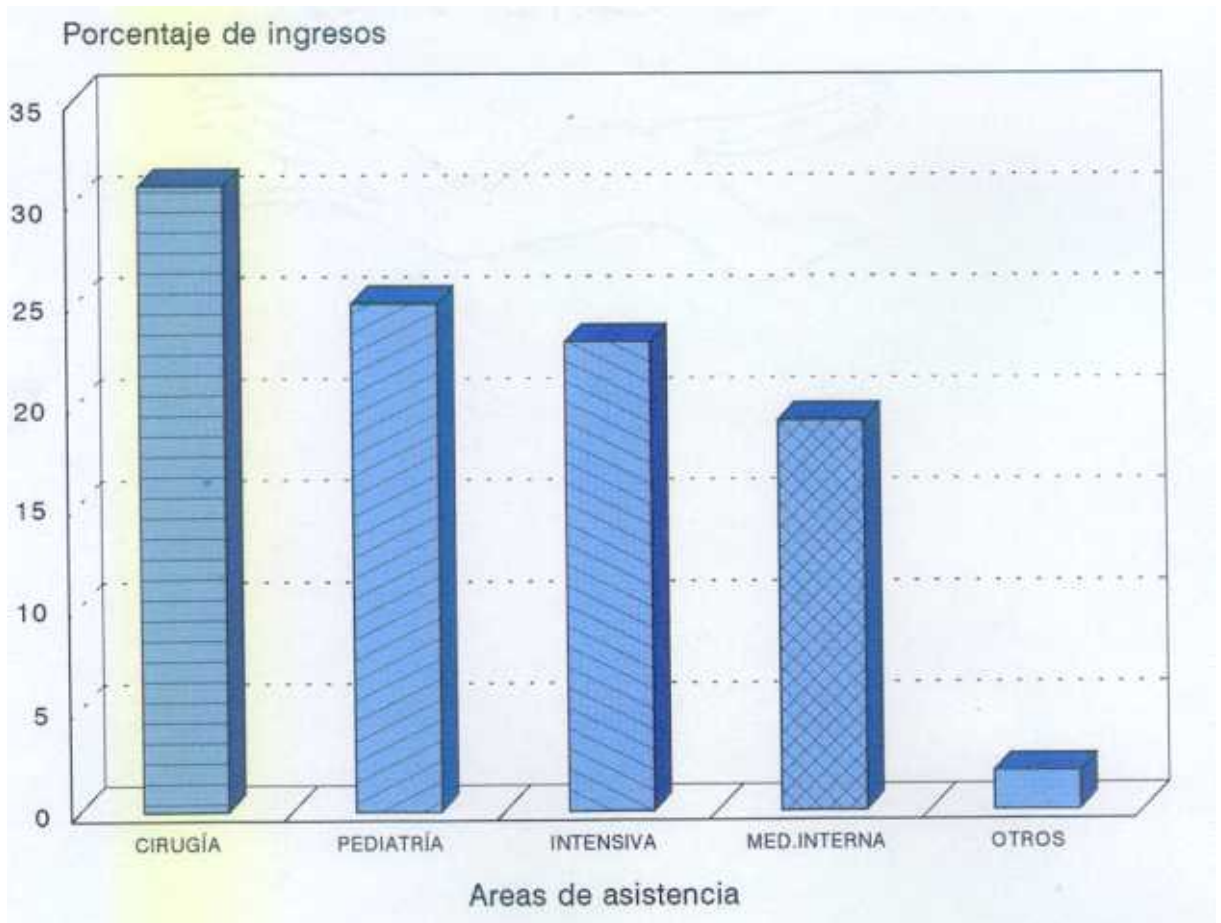
- Hemocultivo con significación clínica en el que el ECN aislado de sangre fue considerado el patógeno causante de la bacteriemia.

Según esta valoración clínica, de los 52 casos seleccionados 37 (71,1%) presentaron hemocultivos con significación clínica, 8 (15,4%) dudosa significación clínica y 7 (13,5%) sin significación clínica.

#### 4.1.5.- DISTRIBUCIÓN POR ÁREAS DE ASISTENCIA DE LOS CASOS DE BACTERIEMIA ESTUDIADOS

En relación a las cinco grandes áreas de asistencia establecidas en el informe EPINE, observamos que en el hospital Vall D'Hebron de los 52 pacientes ingresados durante 1991 en cuyos hemocultivos se aislaron ECN: el mayor porcentaje de pacientes fue ingresado en el área de cirugía donde tuvo lugar el 30,8% de los ingresos, seguido del área de pediatría (25%), atención intensiva (23,1%), área de medicina (19,2%), otros servicios (1,9%), no encontrándose ningún ingreso en el área de obstetricia y ginecología. Fig. 5.

**FIG. 5: DISTRIBUCIÓN POR ÁREAS DE ASISTENCIA DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS EN LOS QUE SE AISLARON ECN**



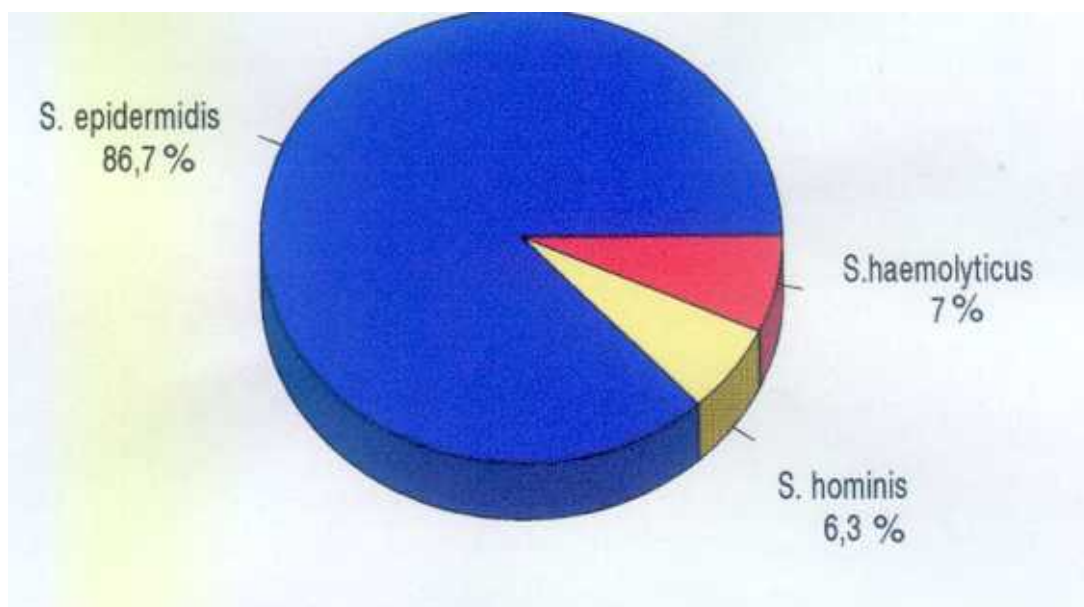
#### **4.2.- IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS**

Los ECN fueron identificados a nivel de especie siguiendo el esquema simplificado de identificación rutinaria propuesto por Kloos y Schleifer (1975a, 1975b), con las siguientes pruebas bioquímicas adicionales: fermentación de carbohidratos en un medio de agar trehalosa-manitol, ureasa y decarboxilasa.

Decidimos incluir estas tres pruebas bioquímicas en el esquema de Kloos y Schleifer por el hecho de que gracias a ellas obteníamos una identificación más exacta de los ECN. La utilización del medio de agar trealosa-manitol nos permitió diferenciar *S. epidermidis* de otros ECN, mientras que la determinación de la actividad ureasa y decarboxilasa nos permitió diferenciar *S. haemolyticus* de *S. hominis*, especies difíciles de identificar utilizando el esquema de identificación anteriormente citado.

De los 158 estafilococos coagulasa negativos, 137 (86,7%) fueron identificados como *S. epidermidis*, 10 (6,3%) como *S. hominis* y 11 (7%) como *S. haemolyticus*. En la Figura 6 podemos apreciar la distribución porcentual de las especies de ECN aisladas de hemocultivos del Hospital Vall D'Hebron durante 1991.

**FIG. 6: DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS ESPECIES DE ECN AISLADAS DE LOS HEMOCULTIVOS ESTUDIADOS**



#### **4.3.- ANÁLISIS DE LOS AISLADOS MEDIANTE LA FAGOTIPIA**

Los 158 aislados fueron fagotipados al aplicarles dos juegos de fagos: el de "Dean y Williams" (De Saxe y Notley, 1978) y el de Martín de Nicolás y colaboradores (1990), juego autóctono obtenido en nuestro laboratorio. La fagotipia se realizó al 1000 RTD, los fagos fueron aplicados a una concentración mil veces mayor que la dilución de rutina sobre los aislados crecidos en un caldo común durante 4 horas a 48° C.

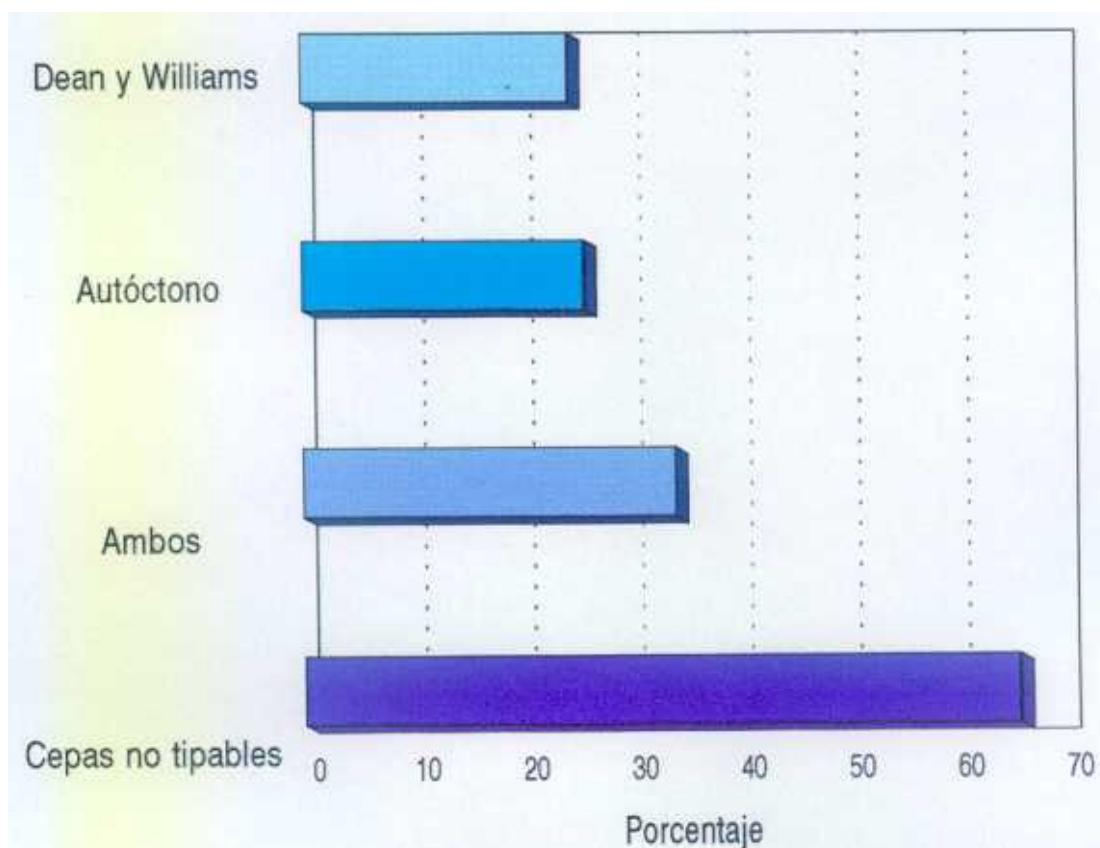
El juego de Dean y Williams está constituido por los siguientes fagos: 15, 27, 28, 28A, 37, 48, 71, 82, 155, 157A, 165, 275, 275A, 456, 459, 417A, A6C, B1, RG, A9C. Los fagos pertenecientes al juego autóctono son: 89904, 89954, 90319, 90338, 90340, 90341, 90352, 90502, 90509, 43763, 43764, 43785.

##### **4.3.1.- PROPORCIÓN DE TIPABILIDAD**

La proporción de cepas tipificadas por fagotipia varía al utilizar únicamente el juego de fagos de "Dean y Williams", el autóctono y el juego de fagos combinado (que resulta de la aplicación conjunta de ambos juegos de fagos).

Cuando realizamos la fagotipia con los dos juegos de fagos por separado únicamente el 24,7% de los aislados fueron sensibles a algún fago del juego de "Dean y Williams". El porcentaje de tipabilidad aumentó ligeramente con el juego de fagos autóctono, de manera que un 26,6% de las cepas resultó sensible a algún fago de ese juego. El hecho de que se obtuviera un bajo porcentaje de tipabilidad al aplicar ambos juegos de fagos por separado nos llevó a aplicarlos conjuntamente aumentando la proporción en un 10,1%, llegándose a tipar un 34,8% de los aislados y quedando el 65,2% sin caracterizar. Fig. 7.

**FIG. 7: PROPORCIÓN DE AISLADOS CARACTERIZADOS POR FAGOTIPIA AL APLICAR LOS DISTINTOS JUEGOS DE FAGOS**



#### **4.3.2.- PATRONES OBTENIDOS POR FAGOTIPIA CON EL JUEGO DE FAGOS COMBINADO**

Los patrones fágicos hallados al aplicar el juego de fagos combinado, constituido por los fagos del juego de "Dean y Williams" y los fagos del juego autóctono, son muy numerosos (30); existiendo pocas cepas que compartan el mismo patrón de fagotipia como se puede observar en la Tabla 10.

**TABLA 10: PATRONES DE FAGOTIPIA CON EL JUEGO DE FAGOS COMBINADO**

Fagotipo	Fagos que produjeron efecto lítico	Nº Aislados (Nº casos)
1	43785	2 (1)
2	90341	6 (4)
3	15	2 (1)
4	456	2 (1)
5	90352	1 (1)
6	27	2 (1)
7	27, 90509	2 (1)
8	456, 459	4 (2)
9	90319, 43785	2 (1)
10	90338, 90341	1 (1)
11	27, 471A	1 (1)
12	456, 471A, 90509	2 (1)
13	275A, 459, 90341	2 (1)
14	456, 459, 90341	1 (1)
15	456, 459, 471A	1 (1)
16	90340, 90341, 43785	1 (1)
17	A9C, 456, 459, A6C	1 (1)
18	A9C, 456, 459, 471A, 90341	1 (1)
19	27, 459, 471A, RG, 90340, 90509	1 (1)
20	A9C, 27, 90319, 90338, 90340, 90341, 43785	2 (1)
21	90319, 90338, 90340, 90341, 43763, 43764, 43785	3 (2)
22	27, 82, 157A, 456, 471A, 90340	1 (1)
23	27, 90319, 90338, 90340, 90341, 90352, 90509, 43763, 43764, 43785	1 (1)
24	27, 275, 456, 459, 471, A6C, B1, 89904, 90340, 90341, 90509, 43785	1 (1)
25	15, 27, 82, 155, 275, 456, 459, 471A, B1, 90319, 90338, 90340, 90341, 90509, 43763, 43785	1 (1)
26	A9C, 275, 275A, 456, 459, 471A, A6C, B1, 89954, 90319, 90338, 90340, 90341, 90352, 90502, 90509, 43763, 43764, 43785	1 (1)
27	A9C, 82, 275, 275A, 456, 459, 471A, A6C, B1, 89904, 90319, 90338, 90340, 90341, 90352, 90502, 90509, 43763, 43764, 43785	1 (1)
28	A9C, 15, 48, 82, 157A, 275, 275A, 456, 459, 471A, A6C, B1, 89904, 89954, 90319, 90338, 90340, 90341, 90352, 90502, 90509, 43763	8 (1)
29	27, 28A, 82, 157A, 275, 275A, 456, 459, 471A, A6C, B1, 89904, 89954, 90319, 90338, 90340, 90341, 90352, 90502, 90509, 43763, 43764, 43785	1 (1)
30	No tipificables (NT)	103 (38)

#### 4.3.3.- FRECUENCIAS DE PATRONES DE FAGOTIPIA

Los patrones encontrados entre los aislados tipificados 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 11 se recogen los porcentajes de patrones obtenidos con el juego de fagos combinado, siendo el patrón corto el que presentó un mayor porcentaje (15,8%) seguido muy de cerca por el patrón largo (13,3%).

**TABLA 11: FRECUENCIAS DE PATRONES DE FAGOTIPIA**

Aislados	Nº (%)	Patrón de fagotipia	Nº (%)
Aislados tipificados	55(34,8)	Patrón corto	25(15,8)
		Patrón intermedio	9(5,7)
		Patrón largo	21(13,3)
Aislados no tipificados	103(65,2)		

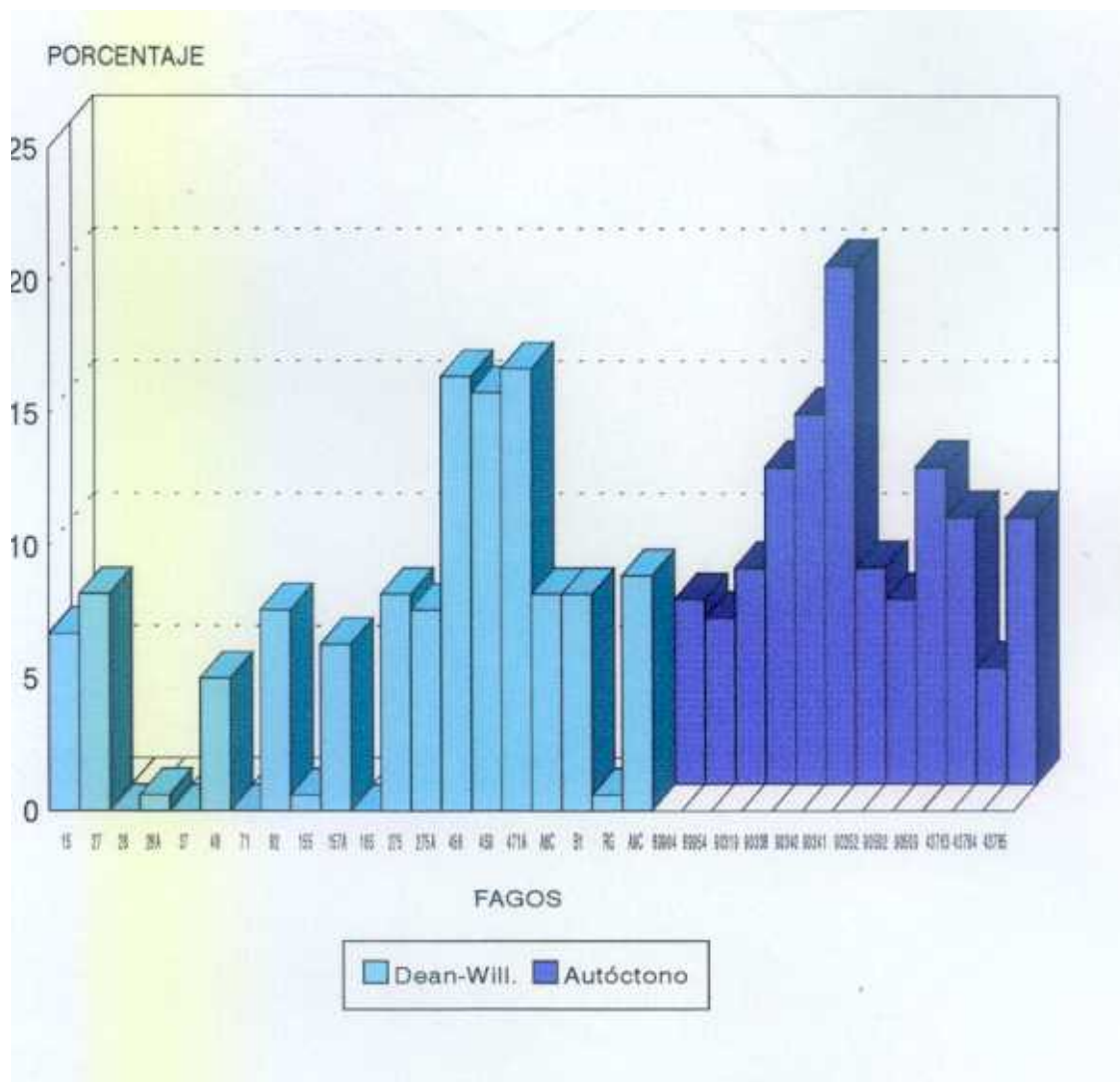
#### 4.3.4.- FRECUENCIAS DE REACCIÓN DE LOS FAGOS

En el juego de "Dean y Williams" el fago que presenta una mayor frecuencia de reacción es el 471A (16,7%) seguido del 456 (16,4%) y del 459 (15,8%). En el juego autóctono la mayor frecuencia de reacción la presentan los fagos 90341 (19,6%), 90340 (13,9%) y 90338 (12,0%) como se puede comprobar en la Figura 8.

Al analizar las frecuencias de reacción de los distintos fagos hemos observado que tanto en el juego de "Dean y Williams" como en el

autóctono hay unos fagos que respecto a su capacidad de reacción están estrechamente relacionados y actúan como si fueran un bloque, de manera que cuando un fago produce una reacción también la suelen producir los otros fagos asociados a este. Así en el juego de "Dean y Williams" los fagos 456, 459, 471A suelen actuar en bloque; mientras que en el autóctono habría dos bloques de actuación, uno constituido por los fagos 90338, 90340 90341 y otro por 90509, 43763, 43785.

**FIGURA 8: FRECUENCIA DE REACCIÓN DE LOS FAGOS DEL JUEGO COMBINADO**



#### **4.4.- ANÁLISIS DE LOS AISLADOS MEDIANTE FAGOTIPIA INVERSA**

El hecho de que con la fagotipia el 65,2% de los aislados quedaran sin tipificar, nos llevó a realizar la fagotipia inversa para conseguir una mejor caracterización de los casos.

La fagotipia inversa se realizó sobre todos los aislados recibidos de los 52 pacientes. Los 158 aislados fueron tratados con mitomicina C para convertir sus fagos lisogénicos en líticos. Cada fago supuestamente inducido fue aplicado de igual manera que en la fagotipia, pero en este caso sobre 32 cepas patrón (20 cepas propagadoras del juego de fagos de "Dean y Williams" y 12 del juego autóctono).

##### **4.4.1.- PROPORCIÓN DE TIPABILIDAD**

La proporción de aislados tipificados por fagotipia inversa varía al utilizar únicamente las cepas propagadoras del juego de "Dean y Williams", las del juego autóctono y las de ambos.

Cuando realizamos la fagotipia inversa con las cepas patrón de "Dean y Williams" el 22,8% de los aislados se tiparon. El porcentaje de tipabilidad fue menor con las cepas propagadoras del juego autóctono (17,7%).

Los bajos porcentajes de tipabilidad nos llevaron a que realizáramos la fagotipia inversa con las propagadoras de ambos juegos de fagos, aumentando la tipabilidad en un 2,5%, llegándose a tipar un 25,3% de los aislados y quedando sin caracterizar el 74,7%. Fig. 9.

##### **4.4.2.- PATRONES DE FAGOTIPIA INVERSA**

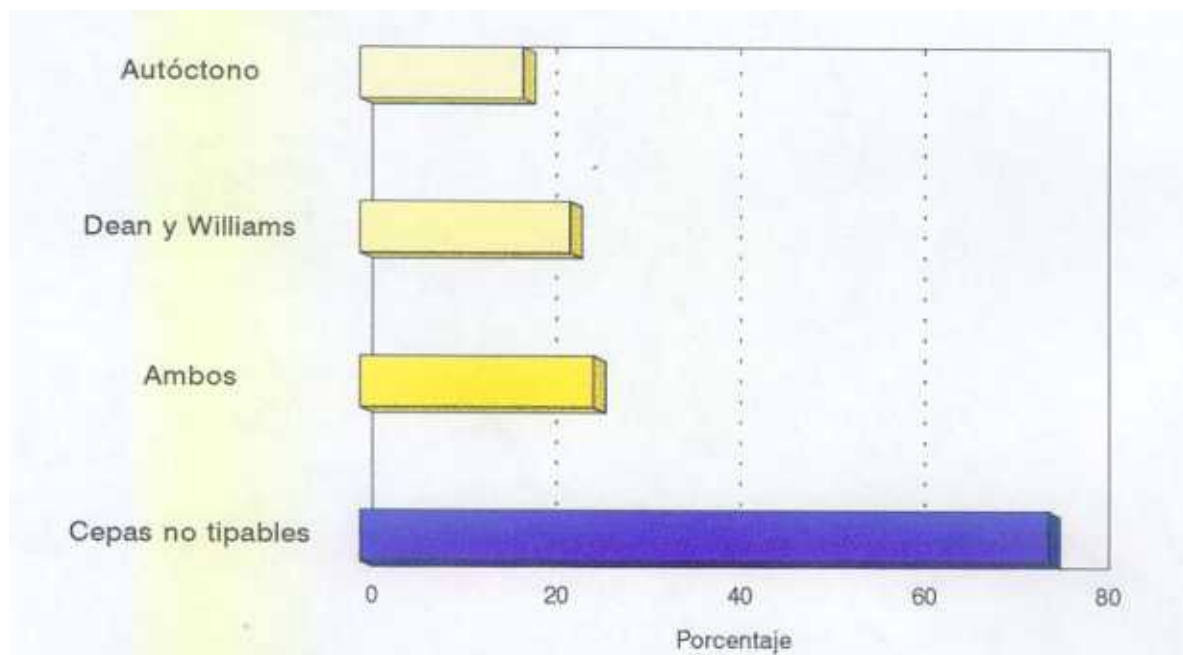
Los patrones de lisis obtenidos al realizar la fagotipia inversa sobre las cepas propagadoras del juego de "Dean y Williams" y del autóctono están recogidos en la Tabla 12.

TABLA 12: PATRONES DE FAGOTIPIA INVERSA

Fagotipo	Cepas patrón en las que los fagos inducidos han producido lisis	N°Aislados*
1	71	1 (1)
2	90319	2 (1)
3	90343	2 (2)
4	48,71	3 (2)
5	48,155	1 (1)
6	15,90374	1 (1)
7	15,90343	2 (1)
8	456,471A	1 (1)
9	28A,155	1 (1)
10	A9C,28A,71	1 (1)
11	15,48,155	4 (1)
12	15,71,275A,456,471A,90319	1 (1)
13	A9C,89925,89939,90319,90418,90510	1 (1)
14	48,71,459,471A,90319,90343,90374,90510	2 (1)
15	A9C,28,456,89925,89939,90319,90343,90418,90510	1 (1)
16	15,155,157A,275A,456,89939,90319,90343,90418,90510	1 (1)
17	15,48,71,155,275,275A,459,471A,89939,90343,90418	4 (2)
18	15,28,48,71,82,275,459,471A,89939,90343,90418	2 (1)
19	15,28A,48,71,155,275,275A,459,471A,89939,90343,90347,90418	3 (1)
20	15,28A,48,71,82,155,157A,275A,456,89939,90319,90343,90418,90510	1 (1)
21	15,27,28A,48,71,155,275,275A,456,459,471A,89939,90343,90418	2 (1)
22	15,28,28A,71,82,155,157A,165,275,275A,456,459,471A,A6C,89925,89939,90319	2 (1)
23	15,28A,82,157A,275,275A,456,459,471A,A6C,B1,89925,89939,90319,90343,90374,90418,90510	1 (1)
24	No tipificables (NT)	118 (42)

\* Aislados en los que se han inducido fagos.

**FIG 9: PROPORCIÓN DE AISLADOS CARACTERIZADOS POR FAGOTIPIA INVERSA**



**4.4.3.- FRECUENCIA DE PATRONES DE FAGOTIPIA INVERSA**

Con los fagos inducidos el patrón de lisis más frecuente fue el patrón largo como puede verse en la Tabla 13.

**TABLA 13: FRECUENCIAS DE PATRONES DE FAGOTIPIA INVERSA**

Aislados	Nº (%)	Patrón de fagotipia	Nº (%)
Aislados tipificados	40(25,3)	Patrón corto	14(8,8)
		Patrón intermedio	5(3,2)
		Patrón largo	21(13,3)
Aislados no tipificados	118(74,7)		

#### **4.5.- UTILIZACIÓN DE UN JUEGO DE FAGOS ADICIONALES PARA LA TIPIFICACIÓN DE LOS ECN**

La baja proporción de aislados tipificados mediante fagotipia y fagotipia inversa nos llevó a la utilización de un juego de fagos adicionales con el fin de conseguir una mejor caracterización de los casos.

Para obtener el juego de fagos adicionales entre nuestros aislados fueron elegidas cinco cepas en las que se indujeron sus profagos mediante mitomicina C. Esta selección se realizó basándonos en el gran efecto lítico producido por los fagos obtenidos a partir de las citadas cepas sobre las cepas propagadoras de los juegos de "Dean y Williams" y autóctono. Este juego está constituido por los fagos: 8596, 8620, 11697, 11711, 12366.

##### **4.5.1.- PROPORCIÓN DE TIPABILIDAD**

De los 158 aislados, con el fin de conseguir una mejor caracterización de los casos, seleccionamos 106 para ser fagotipados con los cinco fagos adicionales (8596, 8620, 11697, 11711, 12366) resultando 22 (20,7%) sensibles a algún fago del juego adicional y 84 (79,3%) fueron no tipables.

##### **4.5.2.- PATRONES DE FAGOTIPIA OBTENIDOS CON EL JUEGO DE FAGOS ADICIONALES**

Con el juego de fagos adicionales obtuvimos cinco patrones, los cuales se describen en la Tabla 14.

**TABLA 14: PATRONES DE FAGOTIPIA CON EL JUEGO DE FAGOS ADICIONALES**

Fagotipo	Fagos que produjeron efecto	Nº Aislados (Nº casos)
1	11697	7 (4)
2	12366	2 (1)
3	11711, 12366	4 (2)
4	11697, 11711, 12366	9 (2)
5	No tipificables (NT)	84 (29)

#### **4.6.- ANÁLISIS DE LOS AISLADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE FISK**

Seleccionamos 89 aislados que fueron tratados con mitomicina C para convertir sus profagos en fagos y se realizó la técnica de la fagotipia enfrentando dichos fagos a las 89 cepas parentales.

##### **4.6.1.- PROPORCIÓN DE TIPABILIDAD**

Esta técnica nos permitió tipificar el 23,6% de los aislados, quedando el 76,4% sin caracterizar.

##### **4.6.2.- PATRONES DE FAGOTIPIA OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE FISK**

Al aplicar los fagos inducidos sobre las cepas parentales obtuvimos seis patrones como puede verse en la Tabla 15.

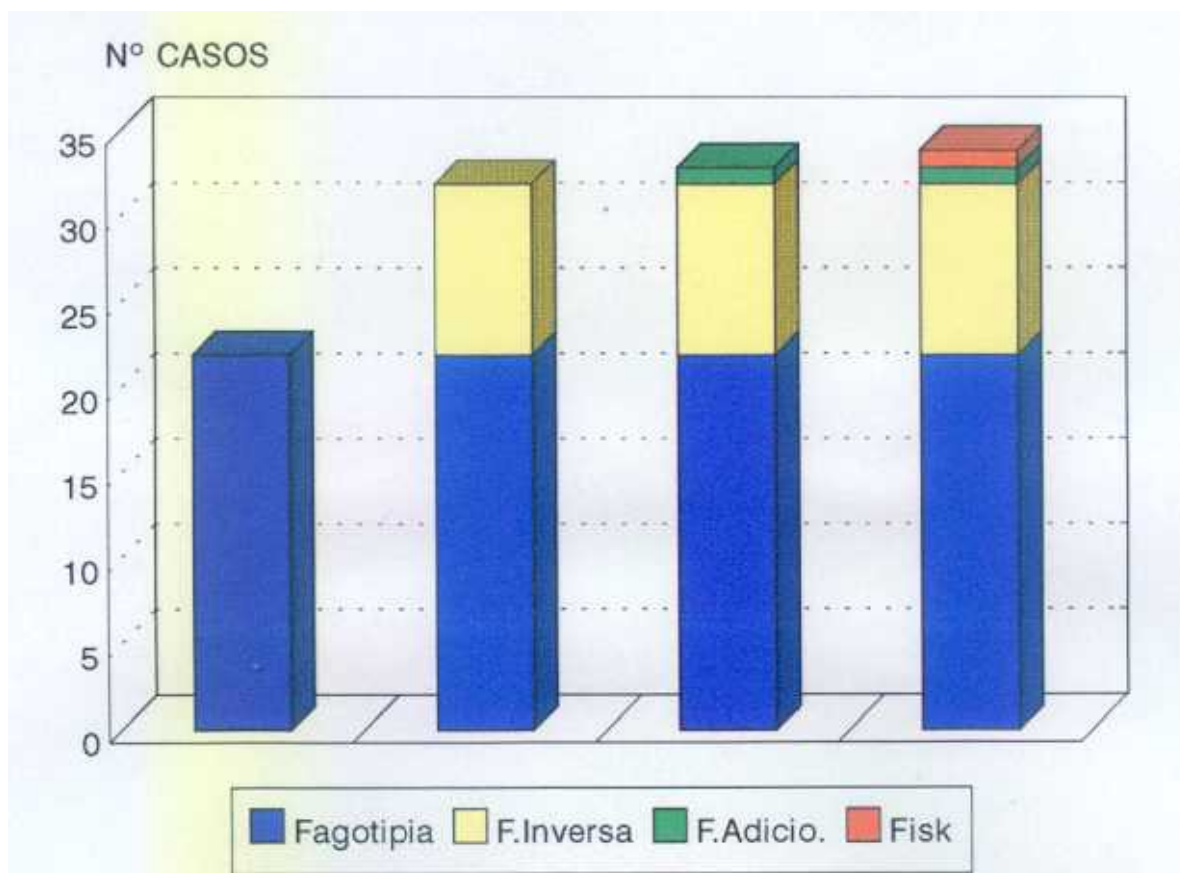
TABLA 15: PATRONES OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE FISK

Fagotipo	Fagos que produjeron efecto	Nº Aislados (Nº casos)
1	2707	5 (2)
2	1357	2 (1)
3	2706,2707,2715	2 (1)
4	8614,8615,8628,8625,11690	1 (1)
5	2708,2710,2712,2706,2707,2715	10 (3)
6	8630,8614,8615,8628,8625,11690,7181,11715	1 (1)
7	No tipificables (NT)	68 (23)

#### 4.7.- EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE FAGOTIPIA EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS

El principal reto que se debe abordar para caracterizar epidemiológicamente los ECN es el de encontrar un marcador que tipe en una proporción suficiente a estos microorganismos, de manera que permita establecer similitudes o diferencias entre aislados posiblemente relacionados epidemiológicamente. Con este objeto hemos evaluado las distintas técnicas de fagotipia viendo que número de casos se caracterizaban al realizar cada una de estas técnicas. Conseguimos caracterizar 22 de los 52 casos (22/52) con la fagotipia, y 10 casos más (32/52) al valorar conjuntamente los datos de la fagotipia y de la fagotipia inversa. Un caso más (33/52) con la valoración conjunta de la fagotipia, fagotipia inversa y fagos adicionales. Por último al analizar los datos obtenidos por las fagotipias anteriormente citadas con los obtenidos por el Fisk se caracteriza uno más (34/52) quedando 18 casos sin caracterizar. Fig. 10.

FIG 10: CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS MEDIANTE LAS DISTINTAS TÉCNICAS DE FAGOTIPIA



**4.8.- SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS**

A los 158 aislados de ECN se les realizaron pruebas de sensibilidad frente a 14 antimicrobianos y los resultados obtenidos se indican en la Tabla 16.

La proporción de ECN resistentes a los  $\beta$ -lactámicos fue alta, obteniéndose valores del 97,4% de resistencia a penicilina, el 84,1% a cloxacilina y el 58,3% a cefotaxima. Las tasas de resistencias más bajas fueron las de la tetraciclina (19,7%), ácido fusídico (17,6%), rifampicina (16,9%), cloranfenicol (14,5%) y como era de esperar, dado que los ECN son todavía sensibles a la vancomicina, no se encontró ninguna resistencia a dicho antibiótico.

Como puede verse en la Tabla 17 los ECN son generalmente microorganismos multirresistentes. Al considerar la sensibilidad a antimicrobianos como marcador; hemos podido establecer 66 patrones de resistencia a antimicrobianos, 15 de los cuales se repiten en dos o más casos diferentes. El patrón de resistencia 35 es el que se presenta en un mayor número de casos, un total de 14 aislados pertenecientes a 7 casos presentaban este patrón.

**TABLA 16: SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ECN**

Antibiótico	Rango	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		%Resistencia
		50%	90%	
Penicilina	0,03-1024	4	128	97,4%
Cloxacilina	0,12-512	64	>512	84,1%
Cefotaxima	0,12-1024	16	256	58,3%
Ampicilina/clavulánico	0,12-64	2	16	21,0%
Gentamicina	0,06-1024	32	256	66%
Clindamicina	0,06-64	64	>64	65,8%
Eritromicina	0,03-512	512	>512	62,5%
Fosfomicina	0,12-256	4	>256	24,5%
Ciprofloxacina	0,06-16	0,06	4	23%
Tetraciclina	0,125-64	0,5	64	19,7%
Ac. fusídico	0,015-32	<0,03	2	17,6%
Rifampicina	0,03-1024	0,03	8	16,9%
Cloranfenicol	0,25-64	4	32	14,5%
Vancomicina	0,25-64	1	1	0%

TABLA 17: PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Antibiotipo	Resistencia a antimicrobianos	Nº aislados (nº casos)
1	Sensible a todos los antimicrobianos	6(3)
2	Pen	14(5)
3	Ffm	1(1)
4	Pen, Etr	2(1)
5	Pen, Ttr	1(1)
6	Pen, Clr	1(1)
7	Pen, Cld	1(1)
8	Pen, Clx	3(2)
9	Pen, Ttr, Clx	1(1)
10	Pen, Etr, Cld	1(1)
11	Pen, Etr, Clx	1(1)
12	Pen, Clr, Clx	1(1)
13	Pen, Rfm, Clx	1(1)
14	Pen, Afc, Clx	1(1)
15	Pen, Cft, Clx	2(2)
16	Pen, Ffm, Clx	1(1)
17	Pen, Gen, Etr, Cld	1(1)
18	Pen, Gen, Cld, Clx	7(3)
19	Pen, Gen, Cft, Clx	3(3)
20	Pen, Ttr, Afc, Clx	1(1)
21	Pen, Ttr, Cpr, Clx	3(1)
22	Pen, Etr, Cld, Clx	1(1)
23	Pen, Cld, Cft, Clx	1(1)
24	Pen, Cld, Ffm, Clx	3(1)
25	Pen, Afc, Cft, Clx	3(1)

TABLA 17: CONTINUACIÓN

Antibiotipo	Resistencia a antimicrobianos	Nº aislados (Nº casos)
26	Pen, Gen, Etr, Cft, Clx	2(1)
27	Pen, Gen, Cld, Ffx, Clx	1(1)
28	Pen, Gen, Acf, Cfx, Clx	2(1)
29	Pen, Ttr, Etr, Cpr, Clx	1(1)
30	Pen, Etr, Cld, Cfx, Clx	1(1)
31	Pen, Gen, Ttr, Etr, Cld, Clx	4(3)
32	Pen, Gen, Ttr, Cft, Ffm, Clx	1(1)
33	Pen, Gen, Etr, Cld, Afc, Clx	1(1)
34	Pen, Gen, Etr, Cld, Cpr, Clx	4(2)
35	Pen, Gen, Etr, Cld, Cft, Clx	14(7)
36	Pen, Gen, Cld, Cpr, Ffm, Clx	1(1)
37	Pen, Ttr, Etr, Cld, Cft, Clx	2(1)
38	Pen, Etr, Cld, Cft, Clx, A/C	1(1)
39	Pen, Gen, Ttr, Etr, Clr, Cld, Clx	1(1)
40	Pen, Gen, Ttr, Etr, Cld, Cpr, Clx	2(1)
41	Pen, Gen, Ttr, Etr, Cld, Cft, Clx	7(4)
42	Pen, Gen, Ttr, Etr, Cft, Ffm, Clx	1(1)
43	Pen, Gen, Etr, Clr, Cld, Cft, Clx	5(3)
44	Pen, Gen, Etr, Clr, Cld, Ffm, Clx	2(1)
45	Pen, Gen, Etr, Cld, Rfm, Cfx, Clx	2(2)
46	Pen, Gen, Etr, Cld, Cpr, Cft, Clx	1(1)
47	Pen, Gen, Etr, Cld, Cfx, Ffm, Clx	1(1)
48	Pen, Gen, Etr, Cld, Cfx, Clx, A/C	1(1)
49	Pen, Gen, Rfm, Cft, Ffm, Clx, A/C	1(1)
50	Pen, Etr, Clr, Cld, Rfm, Cft, Clx	1(1)

TABLA 17: CONTINUACIÓN

Antibiotipo	Resistencia a antimicrobianos	Nº aislados (Nº casos)
51	Pen, Gen, Ttr, Etr, Cld, Rfm, Cft, Clx	2(1)
52	Pen, Gen, Etr, Clr, Cld, Cpr, Cft, Clx	2(1)
53	Pen, Gen, Etr, Clr, Cld, Cft, Clx, A/C	1(1)
54	Pen, Gen, Etr, Cld, Rfm, Cft, Clx, A/C	3(1)
55	Pen, Gen, Etr, Cld, Cpr, Cft, Clx, A/C	6(2)
56	Pen, Gen, Etr, Cld, Cft, Ffm, Clx, A/C	3(3)
57	Pen, Gen, Etr, Cpr, Cft, Ffm, Clx, A/C	2(1)
58	Pen, Gen, Ttr, Etr, Clr, Cld, Cft, Ffm, Clx	1(1)
59	Pen, Gen, Etr, Cld, Cpr, Cft, Ffm, Clx, A/C	4(1)
60	Pen, Gen, Etr, Clr, Cld, Rfm, Cft, Clx, A/C	3(1)
61	Pen, Gen, Etr, Clr, Cld, Acf, Cpr, Ffm, Clx	1(1)
62	Pen, Gen, Etr, Cld, Rfm, Cft, Ffm, Clx, A/C	1(1)
63	Pen, Gen, Ttr, Etr, Cld, Rfm, Cpr, Cft, Clx, A/C	1(1)
64	Pen, Gen, Etr, Cld, Rfm, Afc, Cpr, Cft, Ffm, Clx	1(1)
65	Pen, Gen, Ttr, Etr, Clr, Cld, Rfm, Cpr, Cft, Clx, A/C	1(1)
66	Pen, Gen, Etr, Cld, Rfm, Afc, Cpr, Cft, Ffm, Clx, A/C	5(1)

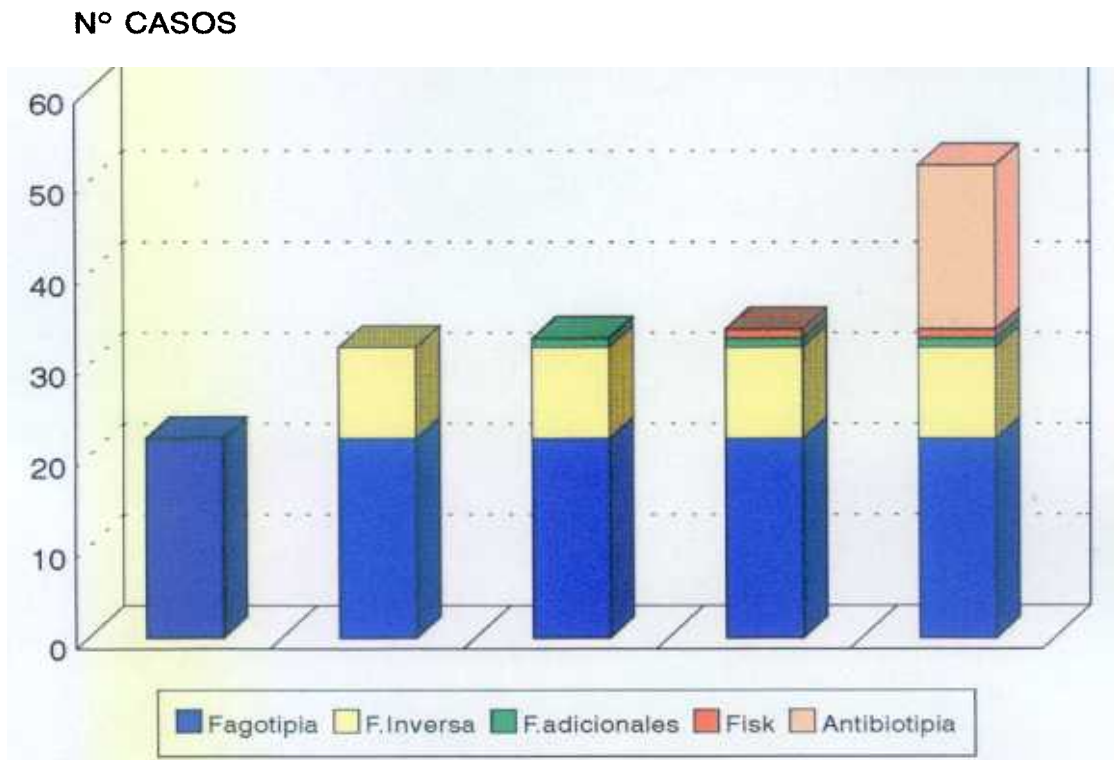
Las abreviaturas utilizadas en la tabla son las siguientes:

**A/C:** Ampicilina/clavulánico, **Afc:** Ácido fusídico, **Cft:** Cefotaxima, **Cld:** Clindamicina, **Clr:** Cloranfenicol, **Clx:** Cloxacilina, **Cpr:** Ciprofloxacina, **Etr:** Eritromicina, **Ffm:** Fosfomicina, **Gen:** Gentamicina, **Pen:** Penicilina, **Rfm:** Rifampicina, **Ttr:** Tetraciclina, **Van:** Vancomicina.

#### 4.9.- CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE MARCADORES FENOTÍPICOS.

Como ya hemos visto con la realización de todas las técnicas de fagotipia conseguimos caracterizar 34 de los 52 casos estudiados (Fig 10). Los 18 casos restantes fueron caracterizados en base a sus patrones de resistencia a antimicrobianos. Fig 11.

**FIG 11: CASOS CARACTERIZADOS CON MARCADORES FENOTÍPICOS**



Con la aplicación de los marcadores fenotípicos (fagotipia, fagotipia inversa, fagotipia con fagos adicionales, Fisk y antibiotipia) se caracterizan todos los casos estudiados, pero debido a que en algunos casos obtuvimos resultados de difícil interpretación junto con la necesidad de buscar otro método de tipificación que en los ECN fuera altamente tipable, reproducible y discriminatorio nos llevó a la utilización de los marcadores genotípicos.

#### 4.10.- ANÁLISIS PLASMÍDICO.

##### 4.10.1.- NÚMERO DE PLÁSMIDOS PRESENTES EN LOS AISLADOS

Entre los 158 aislados estudiados, 114 (72,2%) cepas presentaban plásmidos mientras que 44 (27,8%) carecían de ellos.

Como podemos observar en la Tabla 18, el número de plásmidos encontrados en los aislados varía desde ninguno hasta siete. Si analizamos las cepas que presentan plásmidos, las que poseen dos aparecen en una proporción más elevada que aquellas que tienen mayor número de (5, 6 ó 7 plásmidos).

**TABLA 18: PROPORCIÓN DE AISLADOS EN RELACIÓN AL NÚMERO DE PLÁSMIDOS**

Nº de plásmidos	Nº cepas	% cepas
0	44	27,8
1	28	17,7
2	55	34,8
3	12	7,6
4	11	7,0
5	6	3,8
6	1	0,6
7	1	0,6

#### 4.10.2.- TAMAÑO DE LOS PLÁSMIDOS

El tamaño de los plásmidos presentes en los aislados estaba comprendido en un rango desde <2,1 kb para el plásmido más pequeño a >16,2 kb para el más grande. El plásmido cuyo peso molecular está comprendido entre 2 y 3 kb es el que se encuentra en un mayor número de aislados.

Podemos establecer tres categorías respecto al tamaño de los plásmidos:

- mayores de 16,2 kb
- entre 16,2 kb y 7 kb
- menores de 7 kb

El porcentaje de plásmidos hallados teniendo en cuenta la división anterior se observa en la Tabla 19.

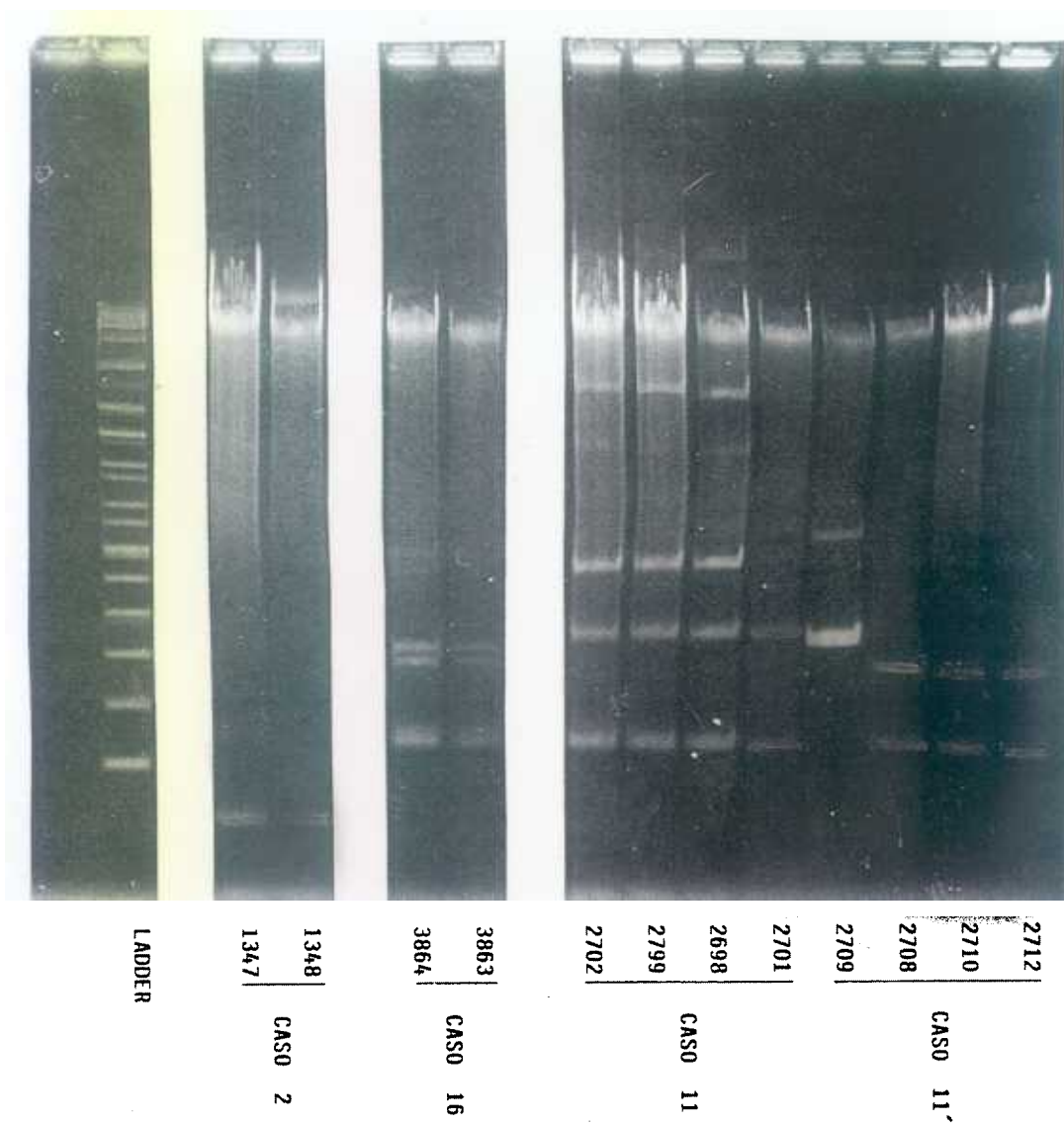
**TABLA 19: PORCENTAJE DE PLÁSMIDOS SEGÚN SU TAMAÑO**

Tamaño	Nº de plásmidos	Porcentaje
> 16,2 kb	20	7,9
16,2 - 7 kb	66	26,2
<7 kb	166	65,9

El 65,9 % de los plásmidos hallados tenían un tamaño menor de 7 kb, por lo tanto son los plásmidos de pequeño tamaño los que encontramos con mayor frecuencia en nuestro estudio mientras que los de más de 16,2 kb raramente aparecen (7,9%).

La Figura 12 muestra varios perfiles plasmídicos, con plásmidos de diferentes tamaños, obtenidos de aislados pertenecientes a distintos casos.

FIG 12: PERFILES PLASMÍDICOS DE ECN AISLADOS DE HEMOCULTIVOS DE DIFERENTES PACIENTES



## 4.10.3.- PERFILES PLASMÍDICOS

El número de perfiles plasmídicos encontrados en los 158 aislados es alto, 45 de los 46 perfiles se hallan representados gráficamente en la Figura 13, el perfil 46 corresponde a aquellos aislados que carecen de plásmidos y que por lo tanto eran no tipificables (NT) por plasmidotipia.

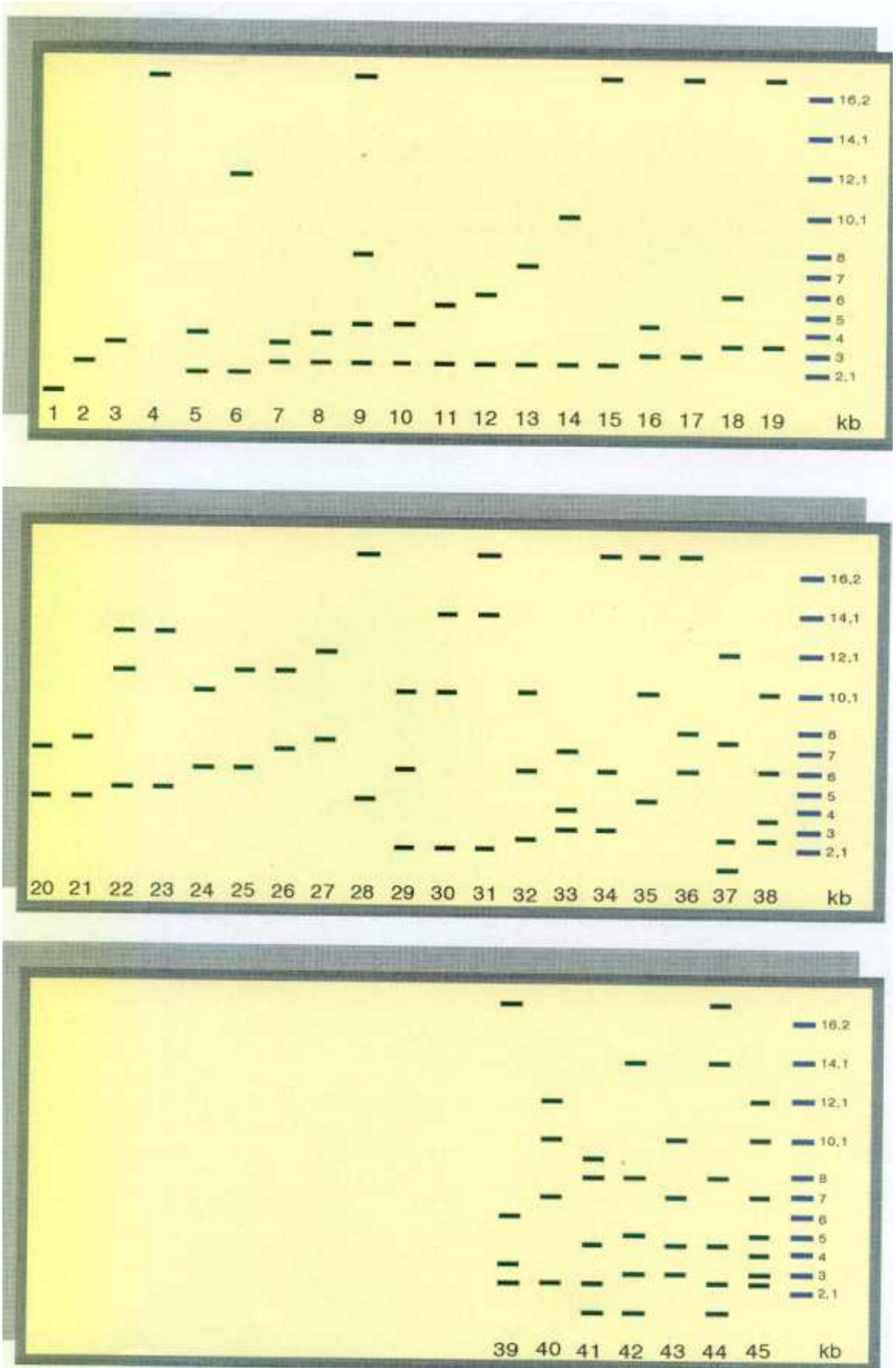
El perfil 2 es el que aparece mayoritariamente entre todas aquellas cepas que presentaban plásmidos. Tabla 20.

TABLA 20: N° DE AISLADOS EN LOS DISTINTOS PERFILES PLASMÍDICOS

\* Los perfiles citados en esta Tabla están representados en la Fig. 13.

PERFIL*	N° CEPAS (N°CASOS)	PERFIL*	N° CEPAS (N°CASOS)	PERFIL*	N° CEPAS (N°CASOS)	PERFIL*	N° CEPAS (N°CASO)
1	2(1)	13	1(1)	25	1(1)	37	2(1)
2	20(9)	14	1(1)	26	1(1)	38	3(1)
3	3(2)	15	5(1)	27	3(2)	39	1(1)
4	3(3)	16	2(1)	28	2(1)	40	2(1)
5	2(2)	17	2(1)	29	1(1)	41	2(1)
6	3(1)	18	1(1)	30	2(1)	42	4(1)
7	5(3)	19	1(1)	31	1(1)	43	2(1)
8	3(2)	20	1(1)	32	1(1)	44	1(1)
9	13(7)	21	1(1)	33	2(1)	45	1(1)
10	1(1)	22	1(1)	34	1(1)	46	44
11	2(1)	23	1(1)	35	2(1)	(NT)	(17)
12	3(1)	24	1(1)	36	1(1)		

FIG 13: ESQUEMA DE LOS PERFILES PLASMÍDICOS.



#### **4.11.- ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO**

##### **4.11.1.- DETERMINACIÓN DE LA ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN ÓPTIMA**

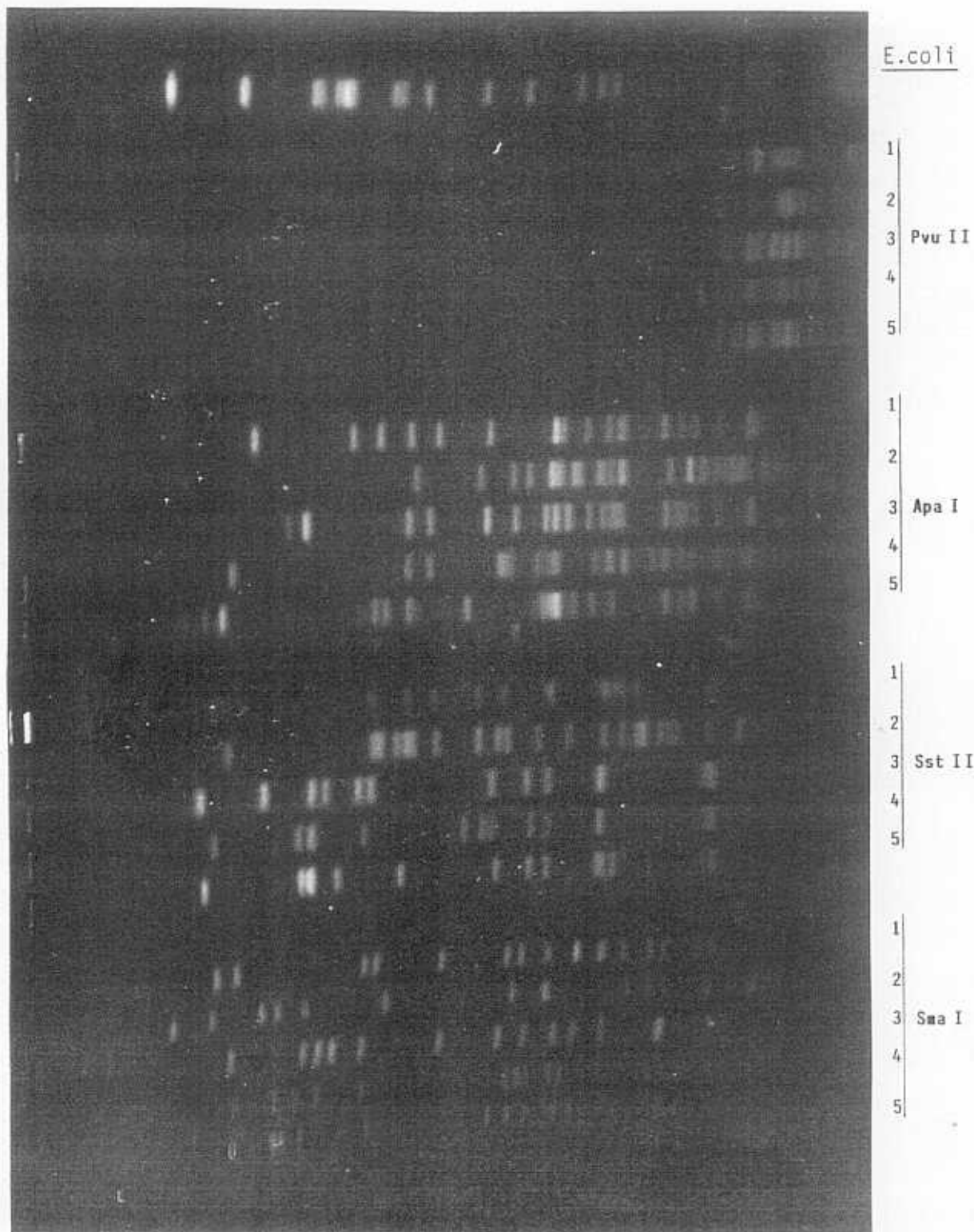
En la elección de la endonucleasa de restricción más adecuada para nuestro estudio, por un lado seleccionamos cinco enzimas (*Sma* I, *Sst* II, *Apa* I y *Pvu* II) en base a la proporción de G+C (30-39%) presente en el cromosoma de *Staphylococcus* y a la secuencia de corte de las enzimas, por otro lado basándonos en los resultados obtenidos en los anteriores marcadores seleccionamos cinco cepas distintas entre los aislados de nuestra colección. El ADN de las cinco cepas fue digerido con cada una de las enzimas y el gel obtenido mediante la electroforesis en campo pulsado se muestra en la Fig. 14.

Después de analizar los perfiles de restricción obtenidos con las cuatro enzimas, decidimos trabajar con *Sma*I ya que producía un perfil con una fragmentación de un amplio rango de pesos moleculares, con bandas claras y en número adecuado. La segunda endonucleasa de elección fue *Sst* II.

##### **4.11.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ELECTROFORESIS**

Se realizaron una serie de ensayos iniciales para determinar las condiciones de electroforesis y se estableció que utilizando un equipo CHEF-DR II (Biorad) las condiciones óptimas de electroforesis en campo pulsado de los ECN son: para un gel de un tamaño de 25x20 cm una concentración de agarosa del 1,2%, pulsos de 1 a 35 segundos durante 42 horas a 200 voltios.

FIG 14: PERFILES OBTENIDOS POR CAMPO PULSADO PARA SELECCIONAR LA ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN



#### 4.11.3.- PERFILES DE RESTRICCIÓN OBTENIDOS POR ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)

Con el fin de conseguir una mejor caracterización de los casos (cuyos resultados obtenidos por la aplicación de los marcadores anteriormente citados resultaron difíciles de interpretar), seleccionamos 114 aislados pertenecientes a 38 casos, cuyo ADN fue digerido con la enzima de restricción *Sma* I. Mediante la electroforesis en campo pulsado obtuvimos 68 perfiles electroforéticos de los cuales 59<sup>\*</sup> eran claramente diferentes y los nueve perfiles restantes presentaban ciertas diferencias con respecto a alguno de los anteriores 59 perfiles.

En la Figura 15 podemos ver la representación gráfica de todos los perfiles electroforéticos obtenidos, donde a cada perfil distinto se le asignó un número diferente y a perfiles similares el mismo número seguido de distinta letra.

El número de bandas presentes en los diferentes perfiles electroforéticos variaba desde 3 hasta 21 bandas. El 79,6% de los *S. epidermidis* presentaban perfiles con un número de bandas igual o superior a 13. En general, cuando encontrábamos un perfil con un pequeño número de bandas solía corresponder a las especies *S. haemolyticus* (ejemplo Fig. 15 perfil 17) o *S. hominis* (ejemplo Fig. 15, perfil 58).

A partir de los 68 perfiles electroforéticos se generó un dendograma (Fig 16) en el que los coeficientes de similitud de Sorensen entre los agrupamientos quedan reflejados en la Tabla 21. Cuando el coeficiente de similitud era inferior a 0,69 los perfiles electroforéticos eran claramente distintos y pertenecían a cepas no relacionadas, mientras que cuando era superior a 0,69 los perfiles guardaban ciertas similitudes y pertenecían a cepas relacionadas. La mayoría de los perfiles encontrados presentaban un coeficiente de similitud inferior a 0,69. Cepas pertenecientes a distintas especies de ECN presentaron un coeficiente igual o inferior al 0,48.

FIG 15: ESQUEMA DE LOS PERFILES OBTENIDOS POR PFGE

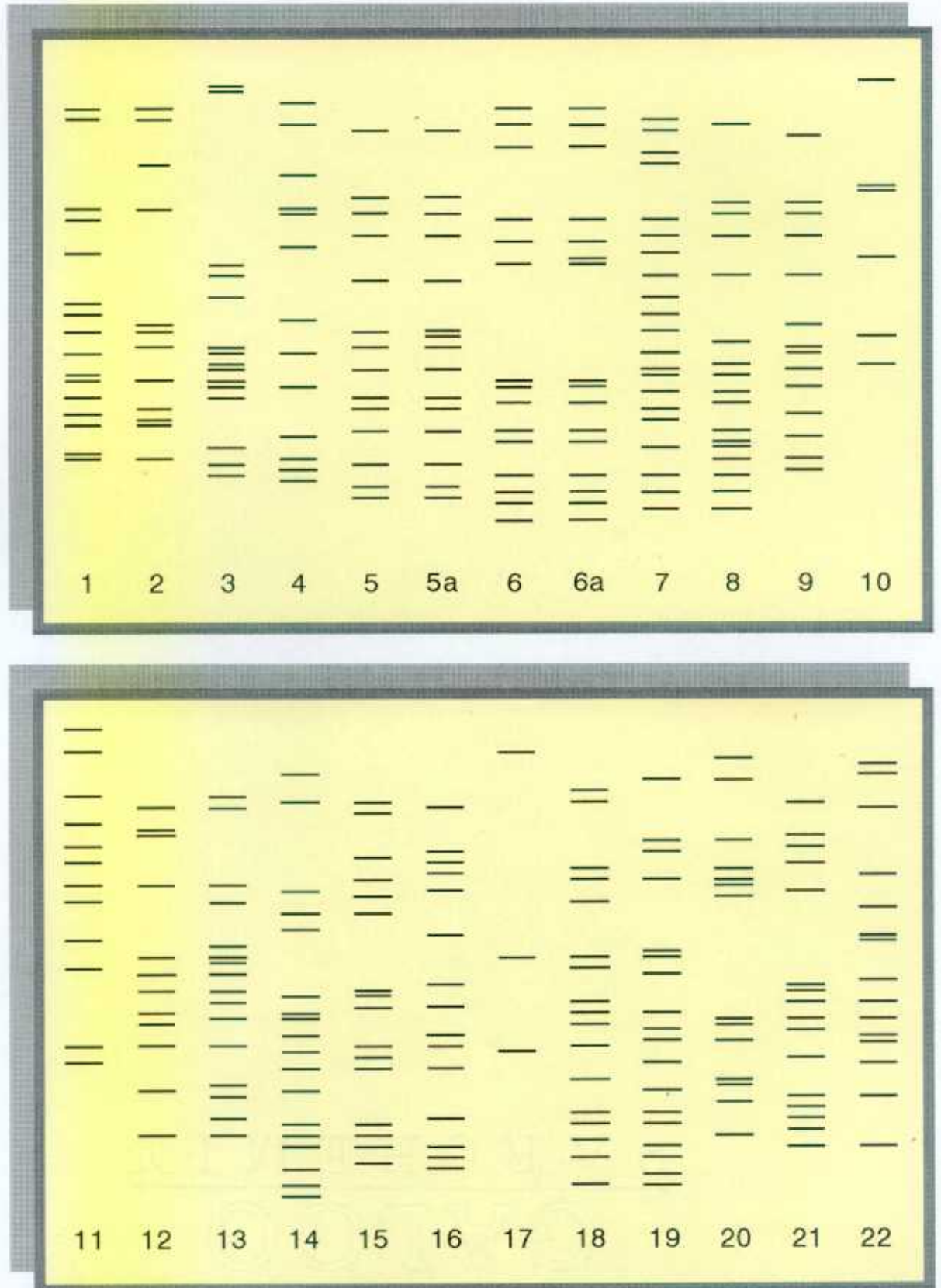




FIG 15: (CONTINUACIÓN)

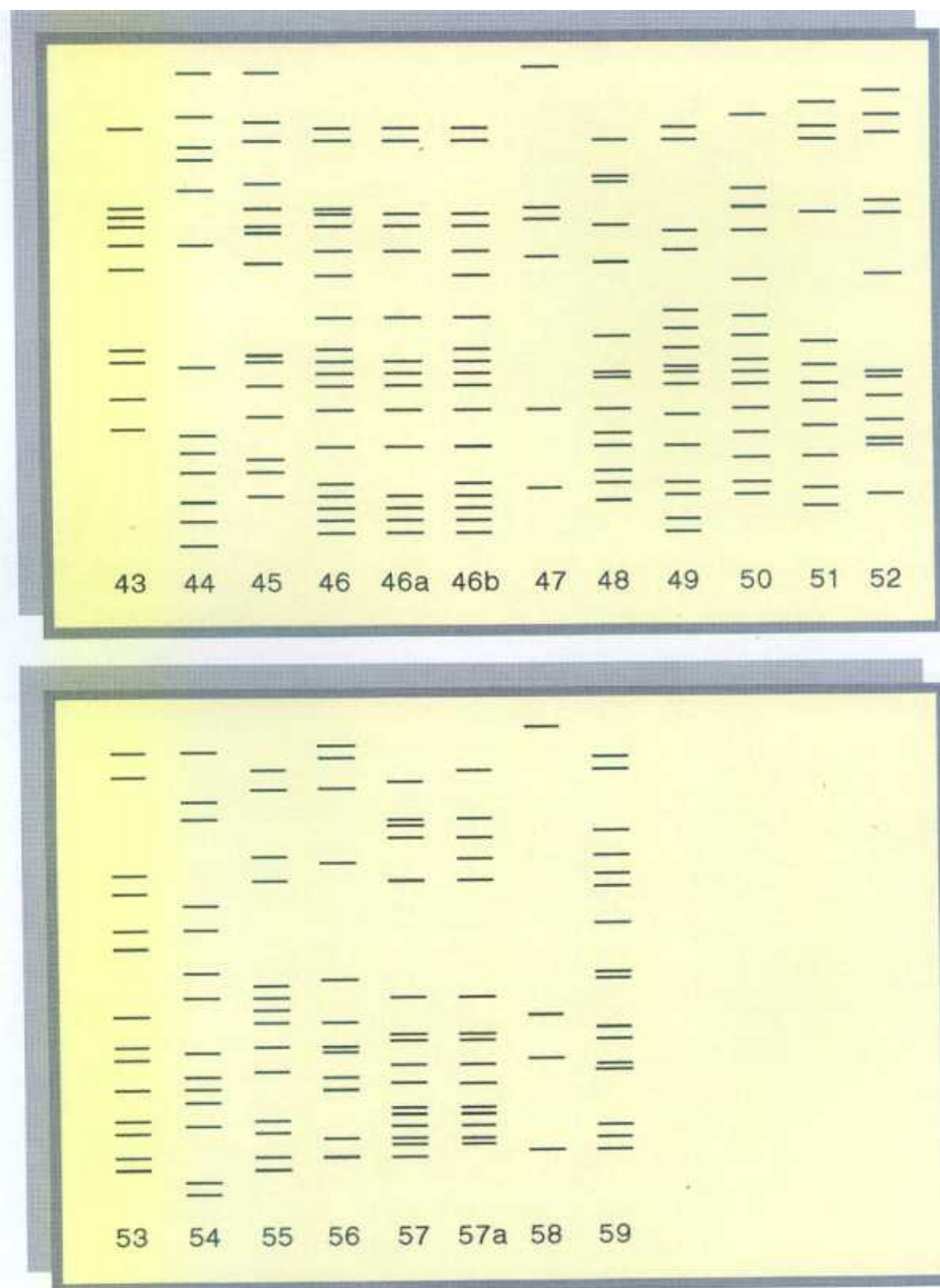


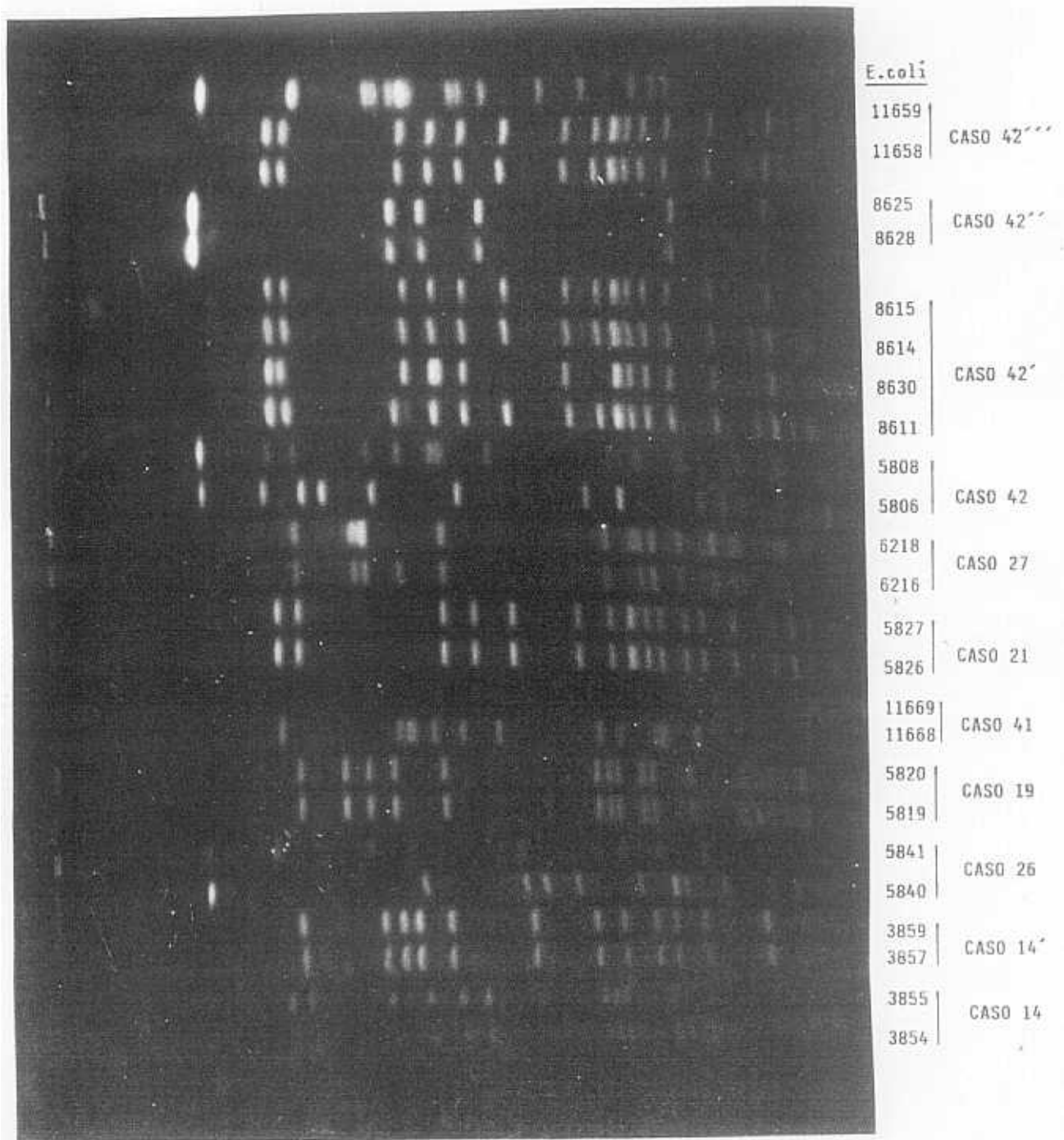


TABLA 21: COEFICIENTE DE SIMILITUD DE SORENSEN

Nudo	grupo1	grupo2	Similitud	Nudo	grupo1	grupo2	Similitud
1	5	5a	0.97	36	16	47	0.38
2	6	6a	0.97	37	Nudo 21	48	0.38
3	22a	22c	0.97	38	Nudo 12	Nudo 37	0.38
4	46	46b	0.97	39	Nudo 28	53	0.36
5	28	28a	0.93	40	23	Nudo 32	0.34
6	Nudo 4	46a	0.87	41	20	Nudo 34	0.33
7	57	57a	0.84	42	Nudo 13	Nudo 38	0.33
8	22	22b	0.75	43	Nudo 29	Nudo 11	0.32
9	18	Nudo 6	0.70	44	Nudo 15	27	0.32
10	21	Nudo 5	0.70	45	Nudo 35	Nudo 26	0.31
11	Nudo 8	Nudo 3	0.69	46	Nudo 19	Nudo 22	0.31
12	Nudo 9	49	0.60	47	Nudo 42	Nudo 23	0.29
13	Nudo 1	50	0.54	48	31	58	0.29
14	8	37	0.52	49	Nudo 47	Nudo 39	0.28
15	1	2	0.50	50	Nudo 24	Nudo 41	0.28
16	12	13	0.50	51	Nudo 27	43	0.28
17	51	58	0.50	52	Nudo 48	Nudo 45	0.27
18	40	52	0.48	53	Nudo 33	Nudo 40	0.27
19	Nudo 2	14	0.48	54	Nudo 50	Nudo 49	0.26
20	9	59	0.47	55	Nudo 54	Nudo 16	0.24
21	45	55	0.47	56	Nudo 44	Nudo 43	0.24
22	25	36	0.46	57	Nudo 55	Nudo 52	0.22
23	32	34	0.46	58	Nudo 51	11	0.22
24	3	28	0.44	59	Nudo 57	Nudo 53	0.20
25	33	54	0.44	60	Nudo 56	Nudo 30	0.20
26	Nudo 10	Nudo 7	0.43	61	Nudo 58	Nudo 36	0.19
27	4	Nudo 20	0.43	62	Nudo 60	Nudo 59	0.18
28	15	35	0.42	63	Nudo 62	Nudo 31	0.18
29	7	39	0.41	64	Nudo 63	Nudo 61	0.16
30	29	Nudo 25	0.41	65	Nudo 64	Nudo 48	0.10
31	24	44	0.40	66	Nudo 65	10	0.08
32	30	Nudo 17	0.40	67	Nudo 66	17	0.05
33	19	42	0.39				
34	Nudo 18	41	0.39				
35	Nudo 14	38	0.38				

La figura 17 muestra los perfiles electroforéticos, obtenidos por campo pulsado, de aislados de ECN pertenecientes a distintos casos.

**FIG 17: PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE CEPAS DE ECN PERTENECIENTES A DISTINTOS CASOS**



#### **4.12.- VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS CASOS**

Los datos obtenidos por la aplicación de los distintos marcadores fueron analizados conjuntamente para valorar desde un punto de vista microbiológico los 52 casos estudiados, determinando si los ECN aislados de distintos hemocultivos de un mismo paciente eran una misma cepa o si por el contrario eran cepas diferentes. Esta información nos permitiría establecer la significación clínica de dichos microorganismos. Tabla 22.

Con el fin de comprender mejor la Tabla 22 aclararemos que:

1.- Los datos de la Tabla 22 complementan a los de la Tabla 4 (páginas 45-53), de manera que mientras la Tabla 4 detalla los datos clínicos de cada caso, la Tabla 22 muestra los datos conseguidos en el laboratorio por la aplicación de los distintos marcadores epidemiológicos.

2.- El significado de las siglas utilizadas en la tabla es el siguiente: **PF:** patrón de fagotipia, **PFi:** patrón de fagotipia inversa, **PFA:** patrón de fagotipia con fagos adicionales, **PFisk:** Patrón de Fisk, **PRA:** patrón de resistencia a antimicrobianos, **PP:** perfil plasmídico, **PFGE:** perfil obtenido por campo pulsado, **NT:** no tipificable, **ND:** ADN no digerido, **SOMBREADO:** sin dato debido a que no se aplicó el marcador correspondiente.

3.- El hecho de que no se pudieran exponer en una misma tabla los patrones y perfiles obtenidos por los diferentes marcadores, nos llevó a realizar una codificación en la que se dió un número a cada uno de estos patrones o perfiles. Los códigos y sus descripciones están recogidos en las páginas:

- pág. 101, patrones de fagotipia.
- pág. 105, patrones de fagotipia inversa.
- pág. 108, patrones con el juego de fagos adicionales.
- pág. 109, patrones de Fisk.
- pág. 112 a 114 patrones de resistencia a antimicrobianos.
- pág. 120 perfiles plasmídicos.
- pág. 124 a 126 perfiles electroforéticos de campo pulsado.

#### 4.12.1.- CRITERIOS SEGUIDOS EN EL LABORATORIO PARA DETERMINAR CUANDO DOS CEPAS SON IGUALES

Los criterios seguidos en la Tabla 22 para valorar los datos microbiológicos y establecer si dos cepas eran idénticas o distintas fueron los siguientes:

1.- Como norma general hemos considerado que dos cepas son idénticas cuando presentan los mismos patrones en todos los marcadores. Ejemplo: caso 23.

2.- Para valorar los patrones de fagotipia seguimos la regla de "las dos diferencias" propuesta por Williams y Rippon (1952) y adoptada por el subcomité de fagotipia de *Staphylococcus* (Blair y Williams, 1961), según la cual dos patrones fueron considerados el mismo cuando presentaban los mismos efectos o una discrepancia de menos de dos diferencias significativas. Ejemplo: caso 27.

3.- Respecto a los patrones de resistencia a antimicrobianos y los perfiles plasmídicos aunque en general resultaron de gran utilidad, en algunos casos era difícil su interpretación ya que las cepas adquieren y pierden plásmidos con gran facilidad y también adquieren resistencias debido a la presión hospitalaria a la que están sometidas. Este hecho nos llevó a considerar dos cepas como idénticas cuando a pesar de presentar ciertas diferencias en los perfiles plasmídicos o en los patrones de resistencia a antimicrobianos, presentaban los mismos patrones en el resto de los marcadores. Ejemplo: caso 31.

4.- De todos los marcadores utilizados, los datos obtenidos por campo pulsado nos permitieron establecer una mejor caracterización de las cepas. Basándonos en los datos conseguidos por los demás marcadores junto con los datos obtenidos por campo pulsado establecimos la siguiente clasificación de los aislados:

- Cepas que presentaban un coeficiente de similitud de 1 fueron consideradas cepas idénticas. Ejemplo: caso 2.
- Cepas con un coeficiente de similitud entre 0,97 y 0,84 fueron consideradas cepas relacionadas (estrechamente relacionadas). Ejemplo: caso 51.
- Cepas con un coeficiente de similitud entre 0,84 y 0,69 fueron consideradas como posiblemente relacionadas. Ejemplo: caso 20.
- Cepas con un coeficiente de similitud inferior al 0,69 fueron consideradas distintas. Ejemplo: caso 4.

Como hemos expresado anteriormente en este punto del estudio nuestro objetivo era averiguar si los ECN, obtenidos de distintos hemocultivos de un mismo enfermo, eran una única cepa o cepas distintas.

Para alcanzar el citado objetivo, a todos los aislados se les realizó fagotipia, fagotipia inversa, resistencia a antimicrobianos y plasmidotipia. Con los datos obtenidos de estos marcadores en algunos casos se pudo determinar si los ECN pertenecientes a cada caso eran o no una única cepa. Casos: 1, 10, 15, 22, 32, 33, 43, 49 y 50.

En el resto de los casos con los datos de estos marcadores era difícil dar una valoración, por lo que fue necesario la aplicación de otros marcadores. De esta manera, cuando añadíamos los datos obtenidos por la fagotipia con fagos adicionales, conseguíamos determinar si los aislados de ECN de algunos casos eran idénticos o distintos; un ejemplo de esto es el caso 24. Cuando además agregamos los datos conseguidos con el Fisk se podía establecer en algunos casos si los aislados eran idénticos o no, como por ejemplo ocurre con el caso 29.

El alto porcentaje de cepas no tipificables obtenidas por las distintas técnicas de fagotipia, hizo que en algunos casos para poder realizar una valoración microbiológica fuera necesario la aplicación de todos los marcadores, incluido campo pulsado. Como ejemplo podemos ver en el caso 34.

TABLA 22: VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS CASOS.

Caso	Aislado	Identificación	PF	PFI	PFA	PFisk	PRA	PP	PFGE	Valoración microbiológica	Valoración clínica
1	1341	<i>S.epidermidis</i>	7	NT			41	10		Cepas idénticas	Dudoso
	1342	<i>S.epidermidis</i>	7	NT			41	10			
2	1347	<i>S.epidermidis</i>	8	NT	NT		28	1	1	Cepas idénticas	Sin significación clínica
	1348	<i>S.epidermidis</i>	8	NT	NT		28	1	1		
3	1351	<i>S.epidermidis</i>	12	7			4	40	2	Cepas idénticas	Sepsis
	1353	<i>S.epidermidis</i>	12	7			4	40	2		
4	1354	<i>S.epidermidis</i>	18	NT	NT		56	31		Cepas distintas	Sin significación clínica
	1355	<i>S.epidermidis</i>	NT	NT	NT		7	NT			
5	1356	<i>S.epidermidis</i>	1	NT	NT	NT	49	NT	5	Cepas relacionadas	Sin significación clínica
	1357	<i>S.epidermidis</i>	1	NT	NT	NT	62	NT	5a		
6	1358	<i>S.epidermidis</i>	2	NT	NT		52	2		Cepas idénticas	Sepsis
	1359	<i>S.epidermidis</i>	2	NT	NT		52	2			
7	1364	<i>S.epidermidis</i>	NT	4	NT		45	2		Cepas idénticas	Sepsis
	1365	<i>S.epidermidis</i>	NT	4	NT		46	2			

TABLA 22: CONTINUACIÓN.

Caso	Aislado	Identificación	PF	PFI	PFA	PFisk	PRA	PP	PFGE	Valoración microbiológica	Valoración clínica
8	1363	<i>S.hominis</i>	NT	11			55	NT	6	Cepas idénticas (1)	Sepsis
	1366	<i>S.hominis</i>	NT	11			55	NT	6		
	1368	<i>S.hominis</i>	NT	11			55	NT	6		
	1367	<i>S.hominis</i>	NT	11			55	NT	6a	Cepa relacionada con (1)	
8'	3851	<i>S.epidermidis</i>	NT	3			61	10	7	Cepa idénticas (2)	Sepsis
8''	3853	<i>S.epidermidis</i>	NT	NT			36	9	7	Cepa idéntica (2)	
	3856	<i>S.epidermidis</i>	NT	16			35	NT	8	Cepa distinta	
9	2700	<i>S.epidermidis</i>	20	NT	1	NT	35	NT	9	Cepas idénticas	Sepsis
	2703	<i>S.epidermidis</i>	20	NT	1	NT	19	NT	9		
10	2704	<i>S.epidermidis</i>	NT	17			9	7		Cepas distintas	Sin significación clínica
	2705	<i>S.epidermidis</i>	25	NT			3	NT			
11	2701	<i>S.epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	5	20	11	Cepa distinta	Sepsis
	2698	<i>S.epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	60	7	10	Cepas idénticas	
	2799	<i>S.epidermidis</i>	NT	NT	2	NT	60	7	10		
	2702	<i>S.epidermidis</i>	NT	NT	2	NT	60	7	10		
11'	2709	<i>S.epidermidis</i>	27	NT	4	5	6	10		Cepa distinta	Sepsis
	2708	<i>S.epidermidis</i>	NT	19	NT	NT	24	38		Cepas idénticas	
	2710	<i>S.epidermidis</i>	NT	19	NT	NT	24	38			
	2712	<i>S.epidermidis</i>	NT	19	NT	NT	24	38			

TABLA 22: CONTINUACIÓN.

Caso	Aislado	Identificación	PF	PFI	PFA	PFisk	PRA	PP	PFGE	Valoración microbiológica	Valoración clínica
12	3861	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT			50	21	12	Cepas distintas	Sepsis
	3862	<i>S. epidermidis</i>	NT	4			30	13	13		
13	2706	<i>S. epidermidis</i>	NT	17	NT	1	18	NT	14	Cepas idénticas	Dudoso
	2707	<i>S. epidermidis</i>	NT	17	NT	1	18	NT	14		
	2715	<i>S. epidermidis</i>	NT	17	NT	1	18	NT	14		
14	3854	<i>S. epidermidis</i>	NT	1	NT	NT	43	NT	15	Cepas idénticas (1)	Sepsis
	3855	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	43	39	15		
14'	3857	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	2	NT	16	Cepas idénticas (2)	
	3859	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	2	NT	16		
15	3858	<i>S. epidermidis</i>	NT	3			2	8		Cepas distintas	Sepsis
	3860	<i>S. epidermidis</i>	19	10			23	45			
16	3863	<i>S. haemolyticus</i>	NT	14			20	8	17	Cepas idénticas	Sepsis
	3864	<i>S. haemolyticus</i>	NT	14			14	8	17		
17	6222	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	35	6	18	Cepas idénticas	Sepsis
	6223	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	35	6	18		
	6224	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	35	6	18		
18	5809	<i>S. epidermidis</i>	9	2	1		25	27	19	Cepas idénticas	Sepsis
	5810	<i>S. epidermidis</i>	9	2	1		25	27	19		
	5811	<i>S. epidermidis</i>	NT	5	NT		25	36	20	Cepa distinta	

TABLA 22: CONTINUACIÓN.

Caso	Aislado	Identificación	PF	PF1	PFA	PFisk	PRA	PP	PFGE	Valoración microbiológica	Valoración clínica
19	5819	<i>S. epidermidis</i>	NT	15	NT	NT	2	NT	21	Cepas idénticas	Sepsis
	5820	<i>S. epidermidis</i>	NT	13	NT	NT	2	NT	21		
20	5818	<i>S. epidermidis</i>	13	NT	NT	NT	37	10	22a	Cepas idénticas (1)	Sepsis
	5817	<i>S. epidermidis</i>	13	NT	NT	NT	37	10	22a		
	5816	<i>S. epidermidis</i>	2	NT	NT	NT	18	10	22	Cepas posiblemente relacionadas con cepa (1)	
	5821	<i>S. epidermidis</i>	2	NT	NT	NT	18	10	22b		
21	5826	<i>S. epidermidis</i>	14	NT	3	3	18	2	22c	Cepas idénticas	Sepsis
	5827	<i>S. epidermidis</i>	2	NT	3	3	18	2	22c		
	5832	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	11	18		Cepas distintas	
	5834	<i>S. epidermidis</i>	15	NT	NT	NT	33	10	23		
22	5829	<i>S. epidermidis</i>	24	NT			15	19		Cepas distintas	Dudoso
22'	6225	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT			56	NT			
23	5822	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	34	42	24	Cepas idénticas	Sepsis
	5823	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	34	42	24		
	5824	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	34	42	24		
	5825	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	34	42	24		
24	8626	<i>S. epidermidis</i>	8	NT	3		43	41		Cepas idénticas	Sepsis
	8627	<i>S. epidermidis</i>	8	NT	3		43	41			

TABLA 22: CONTINUACIÓN.

Caso	Aislado	Identificación	PF	PFI	PFA	PFisk	PRA	PP	PFGE	Valoración microbiológica	Valoración clínica
25	5838	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	8	NT	25	Cepas idénticas	Sepsis
	5839	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	13	NT	25		
26	5840	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	31	10	26	Cepas distintas	Sepsis
	5841	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	38	10	27		
27	6216	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	8	NT	28	Cepas relacionadas	Dudoso
	6218	<i>S. epidermidis</i>	5	NT	NT	NT	8	NT	28a		
28	6217	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT		65	4	29	Cepas distintas	Sepsis
	6219	<i>S. epidermidis</i>	2	6	NT		43	44	30		
29	7171	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	10	14		Cepa distinta Cepas idénticas (1)	Sepsis
	7176	<i>S. epidermidis</i>	28	NT	4	5	12	NT			
	7169	<i>S. epidermidis</i>	28	NT	4	5	2	NT			
	7170	<i>S. epidermidis</i>	28	NT	4	5	2	NT			
	7175	<i>S. epidermidis</i>	28	NT	4	5	2	NT			
29'	11677	<i>S. epidermidis</i>	28	NT	4	5	2	NT		Cepas idénticas (1)	
	11681	<i>S. epidermidis</i>	28	NT	4	5	2	NT			
29''	11712	<i>S. epidermidis</i>	28	NT	4	5	2	NT		Cepas idénticas (1)	
	11715	<i>S. epidermidis</i>	28	NT	4	5	2	NT			

TABLA 22: CONTINUACIÓN.

Caso	Aislado	Identificación	PF	PFI	PFA	PFisk	PRA	PP	PFGE	Valoración microbiológica	Valoración clínica
30	7177	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	44	NT	31	Cepas idénticas	Dudoso
	7178	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	44	NT	31		
	7179	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	27	NT	ND	Cepas distintas	
	8596	<i>S. epidermidis</i>	10	23	1	NT	58	2	32		
31	7180	<i>S. epidermidis</i>	21	NT	1	1	19	NT		Cepas idénticas	Sepsis
	7181	<i>S. epidermidis</i>	21	NT	1	1	35	7			
32	8597	<i>S. epidermidis</i>	3	NT			1	35		Cepas idénticas	Sepsis
	8631	<i>S. epidermidis</i>	3	NT			1	35			
33	8604	<i>S. epidermidis</i>	4	NT			41	10		Cepas idénticas	Sepsis
	8605	<i>S. epidermidis</i>	4	NT			41	10			
34	8598	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	66	15	33	Cepas idénticas	Sepsis
	8599	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	66	15	33		
	8600	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	66	15	33		
	8601	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	66	15	33		
	8602	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	66	15	33		
35	8606	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	35	3	34	Cepas idénticas	Dudoso
	8607	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	35	3	34		

TABLA 22: CONTINUACIÓN.

Caso	Aislado	Identificación	PF	PFI	PFA	PFisk	PRA	PP	PFGE	Valoración microbiológica	Valoración clínica
36	8609	<i>S. hominis</i>	NT	NT			29	NT	ND	Cepas distintas	Sepsis
	8610	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT			64	NT	35		
	8612	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT			45	4	36		
	8613	<i>S. epidermidis</i>	21	12			38	3	37		
37	8618	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	42	28		Cepas idénticas (1)	Sepsis
	8619	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	32	28			
37'	11666	<i>S. haemolyticus</i>	NT	NT	NT		26	37	38	Cepas idénticas (2)	
	11667	<i>S. haemolyticus</i>	NT	NT	NT		26	37	38		
38	8620	<i>S. epidermidis</i>	NT	22			2	43	39	Cepas idénticas	Sepsis
	8629	<i>S. epidermidis</i>	NT	22			2	43	39		
39	11660	<i>S. epidermidis</i>	22	NT			31	5	40	Cepas distintas	Sepsis
	11661	<i>S. epidermidis</i>	23	8			15	29	41		
40	11663	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	35	2	42	Cepas idénticas	Sepsis
	11664	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	35	2	42		
41	11668	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	57	24	43	Cepas distintas	Sepsis
	11669	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	57	25	ND		

**TABLA 22: CONTINUACIÓN.**

Caso	Aislado	Identificación	PF	PFI	PFA	PFisk	PRA	PP	PFGE	Valoración microbiológica	Valoración clínica
42	5806	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	63	NT	44	Cepas distintas	Dudoso
	5808	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	54	NT	45		
42'	8611	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	6	35	2	46	Cepas relacionadas con la cepa (1)	
	8630	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	17	2	46a		
	8615	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	19	NT	46b	Cepas idénticas (1)	
	8614	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	35	2	46b		
42''	8625	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	54	NT	47	Cepas idénticas (2)	
	8628	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	55	NT	47		
42'''	11658	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	35	2	46b	Cepas idénticas (1)	
	11659	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	35	2	46b		
43	11686	<i>S. epidermidis</i>	NT	9			41	5		Cepas distintas	Sin significación clínica
	11687	<i>S. epidermidis</i>	29	NT			1	26			
44	11690	<i>S. epidermidis</i>	26	NT	NT	5	47	NT	ND	Cepas distintas	Sepsis
	11691	<i>S. epidermidis</i>	17	NT	NT	NT	56	2	48		
45	11696	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT			22	32	49	Cepas distintas	Sin significación clínica
	11697	<i>S. epidermidis</i>	16	20			48	2	50		
46	11694	<i>S. haemolyticus</i>	52	NT	NT		53	34	52	Cepa distinta	Sepsis
	11692	<i>S. haemolyticus</i>	51	NT	NT		55	17	51	Cepas idénticas	
	11693	<i>S. haemolyticus</i>	51	NT	NT		55	17	51		

TABLA 22: CONTINUACIÓN.

Caso	Aislado	Identificación	PF	PFI	PFA	PFisk	PRA	PP	PFGE	Valoración microbiológica	Valoración clínica
47	11700	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT			16	4	53	Cepa distinta	Sin significación clínica
	11701	<i>S. hominis</i>	NT	NT			1	33	54	Cepas idénticas	
	11702	<i>S. hominis</i>	NT	NT			1	33	54		
	11703	<i>S. epidermidis</i>	11	NT			1	27	55	Cepa distinta	
48	11714	<i>S. haemolyticus</i>	NT	NT			59	2	56	Cepas idénticas	Sepsis
	11716	<i>S. haemolyticus</i>	NT	NT			59	2	56		
	11717	<i>S. haemolyticus</i>	NT	NT			59	2	56		
	11720	<i>S. haemolyticus</i>	NT	NT			59	2	56		
49	11728	<i>S. epidermidis</i>	NT	18			31	11		Cepas idénticas	Sepsis
	11711	<i>S. epidermidis</i>	NT	18			31	11			
50	12366	<i>S. epidermidis</i>	6	21			41	30		Cepas idénticas	Sepsis
	12367	<i>S. epidermidis</i>	6	21			41	30			
51	13230	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	51	22	57	Cepas relacionadas	Sepsis
	13231	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	NT	51	22	57a		
52	11704	<i>S. hominis</i>	NT	NT	NT	NT	21	12	58	Cepas idénticas (1)	Sepsis
	11705	<i>S. hominis</i>	NT	NT	NT	NT	21	12	58		
	11707	<i>S. hominis</i>	NT	NT	NT	NT	21	12	58		
	11706	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	2	40	16	59	Cepas idénticas (2)	
	11708	<i>S. epidermidis</i>	NT	NT	NT	2	40	16	59		

#### 4.12.2.- DESCRIPCIÓN DE LAS DISTINTAS SITUACIONES ENCONTRADAS AL VALORAR LOS CASOS DESDE UN PUNTO DE VISTA MICROBIOLÓGICO.

Siguiendo el criterio microbiológico utilizado para determinar el agente etiológico de la bacteriemia (según el cual cuando de un mismo enfermo se obtienen una serie de distintos cultivos positivos y en todos ellos se aísla el mismo ECN, éste es considerado como patógeno, mientras que si después de un primer cultivo positivo los siguientes cultivos son negativos o en caso de ser positivos se aísla un microorganismo diferente al ECN del cultivo inicial entonces se habla de contaminación) se analiza conjuntamente la información clínica y los datos que obtuvimos en el laboratorio. Vemos que desde el punto de vista del laboratorio los casos pueden ser agrupados en distintos tipos de situaciones, pudiéndose establecer la siguiente clasificación:

- A. Casos que presentan un único episodio de bacteriemia.

De los 52 casos estudiados en la Tabla 22, 45 casos presentaron un único episodio de bacteriemia, presentándose entre ellos diferentes circunstancias que detallamos a continuación:

- A.1.: 27 fueron casos de bacteriemia con un episodio en el que el ECN aislado es considerado patógeno. A esta situación pertenecen los casos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 13, 16, 17, 19, 20, 23, 24, 25, 27, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 40, 48, 49, 50 y 51.

- A.2.: 5 fueron casos de bacteriemia con un episodio en el que además del agente etiológico de la bacteriemia se aíslan uno o más ECN que son considerados posibles contaminantes. Casos 18, 21, 30, 46, 47.

- A.3.: Hay un único caso de bacteriemia con un episodio en el que se aíslan simultáneamente dos ECN distintos que son considerados

patógenos. Caso 52 (en el que hablaríamos de una infección mixta producida por *S. hominis* y *S. epidermidis*).

- A.4.: 12 fueron casos de bacteriemia con un único episodio, en los que con los resultados microbiológicos no pudimos determinar si los ECN aislados eran o no eran contaminantes. Casos 4, 10, 12, 15, 26, 28, 36, 39, 41, 43, 44, 45.

- B. Casos que presentan más de un episodio de bacteriemia.

A continuación describimos siete casos en los que se encontró más de un episodio de bacteriemia.

- Caso 8: en el primer episodio (8) el ECN patógeno es un *S. hominis*, en el segundo episodio (8') el ECN patógeno es un *S. epidermidis*, estafilococo que volvemos a encontrar en el tercer episodio (8'') junto con otro *S. epidermidis* que consideramos como un posible contaminante.

- Caso 11: presenta dos episodios, en el primer episodio (11) aparecen dos *S. epidermidis*, uno es considerado patógeno y el otro como posible contaminante. En el segundo episodio (11') vuelven a hallarse dos *S. epidermidis*, uno patógeno (que es distinto de el del episodio anterior) y otro posible contaminante.

- Caso 14: en el que hay dos episodios en los cuales la bacteriemia está producida por un *S. epidermidis* distinto.

- Caso 22: en el que con los datos obtenidos en el laboratorio no hemos podido determinar cuál era el ECN causante de la bacteriemia.

- Caso 29: que presenta tres episodios, en cuyo primer episodio se aísla junto con un posible contaminante, un *S. epidermidis* que es considerado patógeno y que persiste durante el segundo (29') y tercer episodio (29'').

- Caso 37: con dos episodios, en el primero (37) la bacteriemia está producida por un *S. epidermidis* y en el segundo (37') por un *S. haemolyticus*.

- Caso 42: con cuatro episodios, en cuyo primer episodio (42) con

los datos de laboratorio no pudimos determinar si los *S. epidermidis* aislados eran agentes patógenos o contaminantes. En el segundo episodio (42') se aísla un *S. epidermidis* que es considerado patógeno y que se vuelve a aislar en el cuarto episodio (42'''), mientras que la bacteriemia del tercer episodio (42'') es causada por otro *S. epidermidis* distinto del anterior.

Como vemos en los resultados anteriormente expuestos, con el análisis de los datos microbiológicos, en 39 (75%) de los 52 casos estudiados un ECN fue considerado como el agente etiológico de la bacteriemia.

#### **4.12.3. PORCENTAJES DE CASOS EN LOS QUE CON LA APLICACIÓN SUCESIVA DE LOS MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS SE HAN PODIDO ESTABLECER SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE AISLADOS DE UN MISMO PACIENTE.**

Una vez que consideramos que todos los casos estaban adecuadamente caracterizados, analizamos globalmente el hecho de que con la aplicación sucesiva de los distintos marcadores íbamos obteniendo nueva información que nos permitía ir aumentando el número de casos en los que se podían establecer si distintos aislados pertenecientes a un mismo paciente eran o no la misma cepa. Encontramos que dicha relación epidemiológica se pudo determinar en 16 (30,8%) casos con el análisis de los patrones de las distintas técnicas de fagotipia; y en 17 casos más cuando añadíamos los patrones de resistencia a antimicrobianos, lo que hacía un total de 33 (63,5%) casos; cuando a los anteriores marcadores añadíamos los patrones plasmídicos en 9 casos más, lo que constituía un 42 (80,8%) de los casos, establecíamos las similitudes y diferencias; y cuando por último añadíamos los patrones obtenidos por PFGE las relaciones epidemiológicas quedaban claras en los 10 casos restantes, por

lo que en este punto en los 52 (100%) casos se pudo establecer si los ECN aislados de hemocultivos de un mismo enfermo eran una única cepa o cepas diferentes. Estos datos están reflejados en la Tabla 23.

**TABLA 23: CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS ESTABLECIENDO SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE AISLADOS DE UN MISMO ENFERMO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS**

<b>Técnicas</b>	<b>Nuevos casos caracterizados</b>	<b>Total casos caracterizados</b>
Fagotipias	16 (30,8%)	16 (30,8%)
Fag. + Antib.	17 (32,7%)	33 (63,5%)
Fag. + Antib. + Plasm.	9 (17,3%)	42 (80,8%)
Fag. + Antib. + Plasm. + PFGE	10 (19,2%)	52 (100%)

Fag.: Fagotipias. Antib.: Antibiotipia. Plasm.: Plasmidotipia. PFGE: Electroforesis en campo pulsado.

#### **4.13.- COMPARACIÓN ENTRE LA VALORACIÓN CLÍNICA Y LA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA**

Como hemos visto el carácter patógeno o contaminante de los ECN, ha sido establecido en este estudio en base a dos criterios, por un lado en base a criterios clínicos y por otro a nuestros datos microbiológicos. Al comparar la valoración clínica y nuestra valoración microbiológica sobre la patogenicidad de los ECN encontramos las siguientes situaciones:

- En 34 casos existe una concordancia entre el criterio dado por el clínico y nuestro criterio microbiológico:

- En 30 de los 34 casos el ECN aislado ha sido considerado como agente etiológico de la bacteriemia por ambos criterios. Tabla 22, casos: 3, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 29, 31, 32, 33, 34, 37, 38, 40, 46, 48, 49, 50, 51, 52.
- En 4 de los 34 casos, el ECN aislado fue considerado sin significación clínica por el clínico, corroborándose este criterio por los datos obtenidos en el laboratorio. Tabla 22, casos: 4, 10, 43 y 45.
- En 6 casos los datos de laboratorio ayudan al clínico a decantarse acerca de la significación clínica del ECN aislado de sangre, ya que en todos estos casos conseguimos identificar cual era el ECN responsable de la bacteriemia. Tabla 22, casos: 1, 13, 27, 30, 35 y 42.
- En 3 de los 52 casos existía un desacuerdo entre la valoración dada por el clínico y la nuestra dada en base a los datos obtenidos en el laboratorio. De manera que mientras para el clínico los ECN aislados de estos tres casos carecían de significación clínica, en el laboratorio las cepas de ECN aisladas de los sucesivos hemocultivos eran idénticas. Tabla 22, casos: 2, 5 y 47.
- En los nueve casos restantes los datos de laboratorio no nos permitieron establecer si los ECN tenían o no tenían significación clínica.
  - En 8 de los 9 casos el clínico consideró al ECN aislado como patógeno, no pudiéndose corroborar esta valoración con los datos microbiológicos. Tabla 22, casos: 12, 15, 26, 28, 36, 39, 41 y 44.
  - En 1 de los 9 casos el clínico presentaba dudas acerca del carácter patógeno del ECN, dudas que no pudieron ser aclaradas con los datos de laboratorio. Tabla 22, caso 22.

---

Como conclusión diremos que los datos obtenidos en el laboratorio nos permitieron determinar si un ECN tenía o no significación clínica en 43 casos, lo que supone el 82,7% de los casos estudiados. De los 43 casos, en tan solo tres casos existía un desacuerdo entre el criterio dado por el clínico y el criterio obtenido en base a los datos del laboratorio, es decir, que en tan sólo un 7% de los casos se han encontrado discrepancias entre el criterio clínico y microbiológico.

**5.- DISCUSIÓN**

Hasta la década de los 70, tanto clínicos como microbiólogos generalmente consideraron a los ECN como contaminantes y únicamente *S. aureus* era considerado como patógeno dentro de las especies estafilocócicas. Es en las últimas dos décadas cuando se han realizado considerables progresos tanto en la clasificación de los estafilococos como en el desarrollo de los métodos de tipado; progresos que han permitido a la comunidad médica estar más al corriente acerca de la gran variabilidad de especies clínicas de ECN y aumentar la credibilidad de que éstos organismos son agentes etiológicos de una variedad de enfermedades.

Actualmente los ECN son considerados como microorganismos patógenos oportunistas causantes de infecciones nosocomiales. Al analizar la evolución de los distintos tipos de infecciones nosocomiales, según los informes NNIS, desde 1980 se ha producido un aumento progresivo de las bacteriemias (Emori y Gaynes, 1993); siendo los ECN los principales agentes etiológicos de este tipo de infección nosocomial (Emori y Gaynes, 1993; EPINE, 1992). Fue este aumento significativo de las bacteriemias lo que nos llevó a estudiar todos los aislados de ECN enviados por el Hospital Vall d'Hebron durante 1991 que pertenecían a casos de bacteriemia en los que se disponía de ECN aislados de diferente hemocultivos de un mismo paciente, así como de la información clínica del mismo, con el fin de conseguir una buena caracterización tanto de los aislados como de los casos, para así poder establecer desde el punto de vista microbiológico si el ECN presente en el hemocultivo era el agente etiológico de la bacteriemia.

### 5.1.- VALORACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS DE LOS CASOS ESTUDIADOS.

Al analizar los informes clínicos de los pacientes de nuestro estudio comprobamos que los ECN se aislaban del mismo tipo de pacientes que se describen en otros estudios (Kloos y Bannerman, 1994): pacientes con rotura de la barrera natural de la piel, pacientes con dispositivos implantados como prótesis, catéteres, etc., pacientes inmunocomprometidos y/o con severa enfermedad de base y neonatos.

Cuando analizamos la distribución de los casos de bacteriemia en el hospital Vall D'Hebron basándonos en las cinco grandes áreas de asistencia establecidas en el informe EPINE (1992), observamos que en este hospital de los 52 pacientes ingresados durante 1991 en cuyos hemocultivos se aislaron ECN, el mayor porcentaje de pacientes fue ingresado en el área de cirugía, seguido de pediatría, atención intensiva y medicina. Mientras que en la distribución dada por los informes NNIS (1991) y EPINE (1992) vemos que las bacteriemias aparecen en una mayor proporción en el área de pediatría, seguida de atención intensiva, medicina y cirugía; además en pediatría las bacteriemias aparecen con una mayor frecuencia que otro tipo de infecciones como las del tracto urinario, tracto respiratorio, etc.. Al comparar todos estos datos se deduce que las bacteriemias tienen especial relevancia en el área de pediatría.

En los datos publicados acerca de la distribución de las especies de los ECN, está descrito que *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. hominis* son por ese orden las tres especies de ECN más frecuentemente halladas en los aislados clínicos (Kleeman y cols, 1993). Al estudiar la distribución porcentual de los ECN aislados en nuestros hemocultivos encontramos que al igual que en otros trabajos publicados (Neumeister y cols., 1995), *S. epidermidis* fue la especie que se aisló con mayor frecuencia, y en menor proporción también se aislaron *S. haemolyticus* y *S. hominis*.

## **5.2.- VALORACIÓN DE LOS MARCADORES FENOTÍPICOS EN EL ANÁLISIS DE LOS AISLADOS DE ECN**

### **5.2.1- ANÁLISIS DE LOS AISLADOS POR FAGOTIPIA**

Al contrario de lo que ocurre con *S. aureus*, en los estafilococos coagulasa negativos no existe un juego de fagos internacionalmente admitido, aunque algunos Laboratorios de Referencia de Estafilococos utilizan este marcador. En la actualidad, los juegos de fagos más usados en la fagotipia de los ECN son el de "Dean y Williams", juego mixto compuesto por fagos ingleses y holandeses (en el que 10 fagos fueron aislados por Dean y cols.(1973), 9 fagos fueron aislados por Verhoef y cols.(1971) y un fago aislado en el Central Public Health Laboratory) (De Saxe y Notley, 1978) y el juego de Pulverer y cols. (1975, 1976).

Antes de realizar la fagotipia en nuestro estudio, por los datos que había publicados, sabíamos que esta técnica era altamente reproducible (Dryden y cols., 1992). Que con su utilización íbamos a encontrar un alto porcentaje de aislados de ECN no tipificables (Rosdahl y cols, 1990; Jarlöv y cols., 1992). Que la tipabilidad aumentaba cuando la fagotipia se realizaba tras el crecimiento de los cultivos con calor a 48°C (Dowset y cols, 1984) y cuando se realizaba al 1000 RTD (De Saxe y Notley, 1978). Que para incrementar la tipabilidad era conveniente utilizar otros fagos además de los fagos de un único juego, de manera que trabajamos con un gran número de fagos. (Vandenesch y cols., 1993; De Saxe y Notley, 1978). Que el juego de fagos de Pulverer aunque proporciona una buena tipabilidad, con él se obtiene un limitado número de patrones por lo que su poder discriminatorio no es satisfactorio (De Saxe y cols., 1981). Que la actividad de los fagos puede presentar algunas limitaciones geográficas, lo que hace que los juegos de fagos no sean generalmente intercambiables (Fridhandler y cols., 1978). La baja proporción de tipabilidad obtenida en

Estados Unidos con los fagos de "Dean a Williams" (Talbot y Parisi, 1976; Blouse y cols., 1975) y las diferencias en los porcentajes de tipabilidad en los cultivos de diferentes ciudades europeas con los fagos de Pulverer apoyan esta teoría.

Basándonos en todos los datos anteriormente expuestos y tratando de conseguir los mejores resultados posibles con la fagotipia decidimos realizar la fagotipia al 1000 RTD, tras el crecimiento de los cultivos a 48°C, usando el juego de fagos de "Dean y Williams" ya que era el que mayor *poder discriminatorio presentaba*. Para paliar las posibles limitaciones en la actividad de los fagos del citado juego por cuestiones geográficas, usamos también un juego de fagos autóctono (Martín de Nicolás, y cols. 1990). Al analizar la proporción de tipabilidad obtenida con el juego de fagos de "Dean y Williams", mientras que en la bibliografía se describe que de un 18,8% a un 20% de los aislados son tipados por los fagos del citado juego (Jarløv y cols., 1992; Dryden y cols., 1992) en nuestro estudio obtuvimos un ligero aumento de la tipabilidad (24,7%), este aumento en la tipabilidad probablemente se deba a que la fagotipia se realizó al 1000 RTD tras tratamiento con calor. El porcentaje de aislados caracterizados por fagotipia con el juego autóctono fue un poco mayor que el obtenido con el de "Dean y Williams" (26,6%), mientras que dicho porcentaje aumentó hasta un 34,8% al utilizar conjuntamente ambos juegos de fagos. Estos datos apoyan por un lado la teoría de las limitaciones geográficas en la actividad de los fagos y por otro la necesidad de trabajar con el mayor número de fagos posible para incrementar la tipabilidad.

La baja tipabilidad de los aislados puede explicarse por varios tipos de mecanismos:

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

La presencia de cápsula en las cepas afectaría a su susceptibilidad

hacia los fagos, pero el crecimiento de las cepas a alta temperatura impide la formación de la cápsula (Lorian y cols., 1985). Como la fagotipia se realiza con un tratamiento con calor, supuestamente se habría impedido la formación de la cápsula por lo que esta causa por si sola no justificaría los bajos porcentajes de tipabilidad. Además Sompolinsky y cols. (1985) describieron cepas capsuladas tipificables y no tipificables, entonces la presencia de cápsula no afectaría a la susceptibilidad de la cepa por los fagos, a no ser que las cepas capsuladas se tipifiquen debido a la existencia de poblaciones heterogéneas. Las endonucleasas de restricción parecen eliminarse por tratamiento térmico, al haberse realizado la fagotipia a 48 °C, este no debería ser el problema a menos que se haya producido una incompleta destrucción de las endonucleasas de restricción. Entonces la baja tipabilidad podríamos explicarla por un efecto de inmunidad lisogénica debida a la presencia de profagos (Rosdahl y cols., 1990) o de plásmidos, ya que los plásmidos pueden llevar genes que controlan la adsorción de los fagos (Schaeffler, 1972).

Al analizar la fagotipia con el juego de fagos combinado, constituido por los fagos de "Dean y Williams" y los de Martín de Nicolás, hemos encontrado numerosos patrones fágicos (30 patrones en un total de 55 aislados tipificados), existiendo pocas cepas que comparten el mismo patrón de fagotipia; lo que nos permite afirmar que el poder discriminatorio del juego de fagos combinado es alto. Cuando dividimos los patrones fágicos en cortos, intermedios y largos de acuerdo con el criterio de Richardson y Marples (1987), los patrones cortos fueron los más frecuentes al igual que se describe en el trabajo de Martín de Nicolás y cols. (1990).

En el juego de fagos de "Dean y Williams" el fago que mostraba una mayor frecuencia de reacción con los diferentes aislados fue el 471A seguido del 456 y 459, mientras que en el juego autóctono fue el fago 90341 seguido del 90340 y 90338. La razón por la que un fago tiene mayor potencia que otro no es bien conocida, probablemente sea debida a

una cuestión relacionada con los receptores del bacteriófago en las cepas, bien por la naturaleza química de los mismos o por alteraciones en el componente lipídico de la pared celular de las cepas de manera que la absorción de los fagos difiere de una cepa o otra y por lo tanto se obtiene una frecuencia de reacción cuyo valor varía de un fago a otro. Al estudiar las frecuencias de reacción de los distintos fagos hemos observado que tanto en el juego de "Dean y Williams" como en el autóctono hay unos fagos que respecto a su capacidad de reacción están estrechamente relacionados y actúan como si fueran un bloque, de manera que cuando un fago produce una reacción también la suelen producir los otros fagos asociados a él. Así en el juego de "Dean y Williams" los fagos 456, 459 y 471A suelen actuar en bloque; mientras que en el autóctono habría dos bloques de actuación, uno constituido por los fagos 90338, 90340, 90341 y otro por 90509, 43763, 43785. Por el hecho de que mantener los fagos con un título adecuado para realizar la fagotipia resulta un trabajo laborioso y que el dispensador de fagos de Lindwell (1959) distribuye 25 fagos, se simplificaría mucho el trabajo si el juego de fagos combinado estuviera constituido por 25 fagos, por lo que proponemos que dicho juego esté compuesto por los 20 fagos de Dean y Williams (puesto que es el juego que se utiliza en otros Laboratorios de Referencia de Estafilococos como el de Inglaterra o Dinamarca, siendo entonces posible la comparación de nuestros resultados con los obtenidos en otros países) y los 5 fagos del juego autóctono: 89904, 90319, 90341, 90352 y 90509, la selección de estos fagos la hemos realizado eligiendo aquellos fagos que presentaban una mayor frecuencia de reacción y seleccionando un único fago de aquellos que actuaban en bloque.

### 5.2.2.- ANÁLISIS DE LOS AISLADOS POR FAGOTIPIA INVERSA

Según Marples y cols. (1978) la fagotipia en los ECN no proporciona una buena tipabilidad, sobre todo en el caso de cepas multirresistentes, por lo que la fagotipia inversa podría ser de gran valor para el estudio de los aislados de ECN.

El bajo porcentaje de tipabilidad obtenido con la fagotipia y el criterio de Marples y cols.(1978) anteriormente expuesto, nos llevó a aplicar la fagotipia inversa a nuestros aislados. En esta técnica se utilizaron las cepas propagadoras del juego de "Dean y Williams" y las del juego autóctono. El porcentaje de aislados que se tiparon por esta técnica con las cepas propagadoras de "Dean y Williams" fue del 22,8%, este porcentaje fue del 17,7% con las del juego autóctono, mientras que al realizar la fagotipia inversa con las cepas de ambos juegos de fagos se obtuvo un ligero aumento de la tipabilidad llegándose a tipar un 25,3% de los aislados.

Al igual que ocurría en la fagotipia, con la fagotipia inversa también obtuvimos un bajo porcentaje de tipabilidad, resultado que concuerda con el obtenido en otros trabajos (Dryden y cols., 1992). Este bajo porcentaje de tipabilidad podrían explicarse bien porque no sea muy frecuente la presencia de profagos en los aislados de ECN o bien porque con la técnica no conseguimos liberar los profagos de todos los aislados con lo que los fagos lisogénicos no se convertirían en líticos.

El número de patrones fágicos conseguidos con esta técnica, al igual que ocurría con los obtenidos en la fagotipia, es elevado (23 patrones en un total de 40 aislados tipificados), lo que indica un alto poder discriminatorio. Siendo los patrones largos los más frecuentes.

La fagotipia inversa es un marcador altamente reproducible y discriminatorio, y aunque proporciona una baja tipabilidad, la valoración conjunta de los patrones fágicos de fagotipia y fagotipia inversa nos va a permitir establecer similitudes y diferencias entre aislados relacionados.

### **5.2.3.- ANÁLISIS DE LOS AISLADOS MEDIANTE LA FAGOTIPIA CON EL JUEGO DE FAGOS ADICIONALES**

Con el fin de contrarrestar el posible efecto de una menor actividad de los fagos debido al tipo de población e intentar aumentar la proporción de tipificación de los aislados, realizamos la fagotipia con un juego de fagos adicionales constituido por cinco fagos obtenidos por inducción a partir de cinco de las de cepas de este estudio.

Los fagos fueron obtenidos induciendo los profagos en cinco de nuestras cepas de ECN. A pesar de que estos fagos habían dado en la fagotipia inversa un gran efecto lítico, en la mayoría de las cepas propagadoras del juego de fagos de "Dean y Williams" y autóctono tan sólo un 20,7% de los aislados fueron sensibles a algún fago del juego adicional.

Como vemos, el porcentaje de tipabilidad obtenido con el juego de fagos adicionales es bajo y bastante similar al de la fagotipia con el juego de fagos combinado y fagotipia inversa. Pero en contra de lo que ocurría con las técnicas anteriormente citadas, el número de patrones obtenidos por la fagotipia con el juego de fagos adicionales es pequeño y en consecuencia existen varias cepas que comparten un mismo patrón de fagotipia por lo que su poder discriminatorio es menor que el conseguido en las otras fagotipias.

### **5.2.4. ANÁLISIS DE LOS AISLADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE FISK**

Como ocurre en el resto de las técnicas de fagotipia, mediante esta técnica conseguimos tipificar un bajo porcentaje de ECN (23,6%) y al igual que en la fagotipia con los fagos adicionales el número de patrones obtenidos con la técnica de FISK es pequeño.

Resumiendo todos los datos obtenidos del análisis de los aislados mediante las distintas técnicas de fagotipia, diremos que con todas las técnicas se obtuvieron bajos porcentajes de tipabilidad y fue la fagotipia con el juego de fagos combinado la que mayor tipabilidad proporcionó, siendo esta técnica junto con la fagotipia inversa las que mayor poder discriminatorio presentaron. Además cuando valoramos conjuntamente los fagotipos obtenidos con todas las técnicas de fagotipia, conseguimos establecer similitudes y diferencias entre aislados pertenecientes a un mismo paciente en 16 (30,8%) de los casos.

#### 5.2.5.- ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS A LOS ANTIMICROBIANOS

Al analizar los datos obtenidos del estudio de sensibilidad de todos nuestros ECN frente a 14 antimicrobianos encontramos, como era de esperar, una alta proporción de ECN resistentes a los  $\beta$ -lactámicos obteniendo valores del 97,4% de resistencia a penicilina, del 84,1% a cloxacilina y del 58,3% a cefotaxima. Aunque en nuestros datos las resistencias a los  $\beta$ -lactámicos son más elevadas que las descritas en el tercer estudio multicéntrico español (Díaz y cols., 1994), nuestros porcentajes de resistencia concuerdan con los publicados por otros autores como demuestra el estudio de bacteriemias causadas por ECN realizado por Jones y cols. (1989) donde la mayoría de los aislados eran *S. epidermidis* y el 78% de los ECN fueron resistentes a la oxacilina. En otro estudio se describe un porcentaje del 84% de resistencia a meticilina en *S. epidermidis* (Karchmer y cols., 1983). Según Archer y cols. (1994) los porcentajes de aislamientos resistentes a la meticilina son mayores si la evaluación de la susceptibilidad está únicamente referida a *S. epidermidis*, lo cual podría explicar nuestra elevada proporción de resistencia a la cloxacilina en comparación con la del estudio multicéntrico español, puesto que en nuestro estudio el 87% de los ECN eran *S. epidermidis* mientras que en el

estudio multicéntrico esta especie representaba el 60% de los ECN estudiados.

Por otro lado, en nuestros datos encontramos una gran proporción de aislados multirresistentes y observamos que la resistencia a la cloxacilina va asociada a la resistencia a otros grupos de antibióticos además de los  $\beta$ -lactámicos. Archer y Climo (1994), describen este hecho en su trabajo en el que una alta proporción de los *S. epidermidis* resistentes a la oxacilina y causantes de bacteriemias son multirresistentes presentando resistencias a eritromicina, clindamicina, gentamicina y otros antibióticos. El hecho de que los ECN sean microorganismos nosocomiales resistentes a una gran variedad de antibióticos hace que sean considerados como un importante reservorio de genes de resistencia en el medio hospitalario (Archer, 1988).

Como era de esperar, no encontramos resistencias a la vancomicina. Aunque ya se han descrito algunas resistencias clínicas a este glicopéptido en *S. haemolyticus* (Veach y cols., 1990). El conjunto de los ECN continúa siendo susceptible a la vancomicina (Archer y Climo, 1994) por lo que es el antibiótico de elección utilizado en el tratamiento de los ECN resistentes a meticilina y multirresistentes.

En su revisión de la susceptibilidad antimicrobiana de los ECN, Archer y Climo (1994) describen a estos microorganismos como altamente susceptibles a la tetraciclina, rifampicina y ciprofloxacina, datos que concuerdan con los bajos porcentajes de resistencia de nuestros aislados frente a estos antibióticos.

El hecho de que la mayoría de nuestros aislados sean multirresistentes es debido a dos causas, por un lado a que la mayoría de nuestros aislados eran *S. epidermidis* y está descrito que esta especie es uno de los cocos gram positivos que muestra con gran frecuencia resistencia a muchos de los agentes antimicrobianos. Por otro lado a que todos nuestros ECN fueron aislados de pacientes y está demostrado que los ECN aislados del medio hospitalario son más resistentes que los de portadores sanos (Parisi, 1985), lo cual podría ser explicado por la

existencia de una interrelación compleja entre la terapia antibiótica y la adquisición de resistencias a antibióticos por parte de las bacterias en la infección nosocomial, en la que el uso de agentes antimicrobianos tiende a crear una presión selectiva que favorece la aparición de microorganismos resistentes y predispone a los pacientes a ser colonizados por tales microorganismos. (Emori y Gaynes, 1993).

Cuando hicimos el análisis de los resultados de la sensibilidad a los antimicrobianos desde el punto de vista de un sistema de tipado encontramos que con la antibiotipia todos los aislados fueron caracterizados y obtuvimos 66 patrones. Patrones que junto con los de fagotipia nos proporcionaron una mejor caracterización de los aislados permitiéndonos en 33 casos (63.5%) establecer similitudes y diferencias entre aislados relacionados. Al relacionar los patrones de fagotipia con los de resistencia a antimicrobianos vemos que aquellos aislados que eran multirresistentes resultaban generalmente no tipificables por las técnicas de fagotipia, fenómeno que también ha sido descrito por Rosdahl y cols. (1990).

Existen críticas a la antibiotipia como sistema de tipado, una de ellas es el elevado número de patrones que se obtienen y junto con el hecho de que muchos de los aislados son multirresistentes, hace difícil la evaluación de los patrones (Smith y cols, 1982). Además la expresión de resistencias a antimicrobianos en algunas cepas de ECN puede ser inestable (Mickelsen y cols. 1985), hecho que se debe a múltiples mecanismos genéticos uno de los cuales es la presencia de plásmidos portadores de genes que codifican para la resistencia a antibióticos, plásmidos que son muy inestables y al igual que se pierden con facilidad también pueden ser adquiridos por conjugación dando lugar a distintos patrones de resistencia en cepas con idéntico cromosoma. (Maslow, 1993; Hall, 1987). Por otro lado, aislados no relacionados pueden tener el mismo patrón de resistencia, mientras que cepas relacionadas pueden ser falsamente consideradas distintas en base a diferencias en su antibiograma (Dryden y cols., 1992).

A pesar de estas críticas, nosotros al igual que Ludlam y cols.

(1989a) consideramos a la antibiotipia como un marcador bastante reproducible, discriminatorio y de utilidad ya que la información obtenida con la realización de antibiogramas de manera sistemática en los laboratorios hospitalarios a todos los aislados, tiene gran importancia, pues conociendo las resistencias más frecuentes existentes en un determinado hospital, si aparecen patrones de resistencia nuevos (Goetz y cols., 1992) o si se observa un incremento en el número de un determinado patrón de resistencia, estos datos constituirían un primer e importante aviso sobre la posible existencia de un brote nosocomial y además proporcionaría información indispensable para el tratamiento de los enfermos.

### **5.3.- VALORACIÓN DE LOS MARCADORES FENOTÍPICOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIAS**

Hasta ahora, al analizar los datos obtenidos de los marcadores fenotípicos y al valorar dichos marcadores, no habíamos considerado las posibles relaciones epidemiológicas existentes entre nuestros aislados. Es a partir de este momento cuando vamos a considerar la posible relación de los aislados a la hora de analizar los datos.

Según describen algunos autores, la inexistencia de un único método de tipificación efectivo para los ECN hace que en el estudio epidemiológico de la infección causada por estos microorganismos sea aconsejable usar un esquema jerarquizado de una combinación de marcadores (Christensen y cols., 1983; Ludlam y cols., 1989b; Dryden y cols., 1992). Siguiendo esta recomendación, valoramos globalmente los patrones que se habían obtenido con los distintos marcadores fenotípicos en los aislados pertenecientes a un mismo enfermo y encontramos que 22 de los 52 casos se caracterizaban con la fagotipia, diez casos más (32/52) al valorar conjuntamente los patrones de fagotipia y fagotipia inversa, un caso más (33/52) con la valoración global de los patrones de fagotipia, fagotipia inversa y fagos adicionales, otro caso más (34/52) se caracteriza al analizar

los fagotipos anteriormente citados con los del Fisk, y los 18 casos restantes se caracterizaban con la antibiotipia.

Como vemos, a pesar de los bajos porcentajes de tipabilidad conseguidos con algunos de los marcadores fenotípicos, como las diferentes técnicas de fagotipia, con la aplicación sucesiva de estos marcadores hemos ido obteniendo cada vez más información que nos permitió caracterizar todos los casos estudiados. Además cuando valoramos conjuntamente los patrones obtenidos con las distintas técnicas de fagotipia, en 16 (30,8%) casos pudimos establecer si los aislados pertenecientes a un mismo paciente eran cepas idénticas o diferentes y cuando junto con los fagotipos teníamos en cuenta el patrón de resistencia a antimicrobianos en 17 casos más, es decir, en un total de 33 (63,5%) casos pudimos establecer relaciones de similitud o diferencia entre aislados epidemiológicamente relacionados. Mientras que en 19 (36,5%) casos a pesar de haber sido caracterizados por uno o varios de los marcadores fenotípicos, la información que se obtuvo no era suficiente para establecer estas similitudes o diferencias debido a que los aislados resultaron no tipificados por la mayoría de estos marcadores o a que se obtuvieron resultados de difícil interpretación, lo cual nos llevó a la utilización de marcadores genotípicos.

#### **5.4. VALORACIÓN DE LOS MARCADORES GENOTÍPICOS EN EL ANÁLISIS DE LOS AISLADOS DE LOS ECN**

##### **5.4.1. ANÁLISIS DE LOS AISLADOS MEDIANTE PLASMIDOTIPIA**

Está descrito que generalmente es frecuente encontrar plásmidos en los ECN (Valentine y cols, 1988). Algunos de estos plásmidos presentes en los ECN llevan genes que codifican para la resistencia a determinados antibióticos, mientras que otros tienen una función desconocida (Ludlam y cols., 1989b); así, se sabe que un plásmido de pequeño tamaño (4,5 kb)

es responsable de la resistencia a la tetraciclina (Cooksey y Baldwin 1985) y que la resistencia a la eritromicina, gentamicina y fosfomicina también puede deberse a plásmidos. (Etienne y cols., 1990).

En nuestro estudio al trabajar con *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, y *S. hominis*, que son algunas de las especies de ECN que presentan plásmidos con mayor frecuencia (Kloos y Bannerman, 1994), como era de esperar, hemos encontrado que la mayoría de los aislados de estas especies contenían plásmidos (72,2%); dato que se corresponde con el 79,2% dado por Martín de Nicolás y cols.(1995) en su estudio de aislamientos de ECN en pacientes españoles. Al igual que se describe en este trabajo, nosotros hemos encontrado que el tamaño de los plásmidos variaba de 1 a 30 kb; siendo los plásmidos pequeños (< 7 kb) los más frecuentes, seguidos de los de tamaño intermedio (16,2-7 kb) y los de > 16,2 kb los menos frecuentes. Igualmente vimos que existe una gran variabilidad en el número de plásmidos presentes en los aislados, ya que encontramos desde ECN que carecían de plásmidos hasta ECN que presentaban siete plásmidos, variabilidad que también se corrobora con el trabajo de Dryden y cols. (1992) en el cual se describen desde aislados sin plásmidos hasta aislados con 12.

Del mismo modo que se describe en el trabajo de Martín de Nicolás y cols. (1995), hallamos un elevado número de perfiles plasmídicos y el perfil 2, que correspondía a un único plásmido de pequeño tamaño, fue el perfil mayoritario. También observamos que cuando los perfiles plasmídicos presentaban pequeño número de bandas, el mismo perfil aparecía en aislados pertenecientes a distintos pacientes sin una evidente relación epidemiológica; este dato contradice la teoría de Archer y cols. (1984) quienes sugieren que en ausencia de relación epidemiológica es muy poco frecuente encontrar perfiles plasmídicos idénticos en cultivos de dos individuos distintos. La única explicación que podemos dar a este hecho es que todos nuestros ECN fueron aislados durante un año en un mismo hospital y según el propio Archer y cols. (1985), los ECN son

microorganismos nosocomiales que están sometidos a una fuerte presión selectiva que favorece el desarrollo de resistencia a antibióticos y como es frecuente que dichas resistencias estén codificadas por genes que se encuentran en los plásmidos, tales plásmidos pueden diseminarse de unas cepas a otras y persistir durante prolongados períodos de tiempo en una institución, este hecho explicaría que dentro de un mismo hospital aislados de pacientes distintos presentaran el mismo plásmido.

La plasmidotípia es un método de tipado que presenta ciertas deficiencias que hacen difícil la interpretación de los perfiles plasmídicos, algunas de estas deficiencias vienen dadas por que:

- Los plásmidos son elementos extracromosomales que presentan una gran inestabilidad, ya que pueden perderse parcial o totalmente, existiendo una tendencia en los aislados de ECN a perder fácilmente plásmidos de resistencia a antimicrobianos (Mickelsen y cols., 1985; Parisi y Hecht, 1980). Y por otro lado, los plásmidos de resistencia pueden transferirse por conjugación dentro de una misma especie, o de una especie a otra de estafilococos (Parisi, 1985). Esta inestabilidad hace que a la hora de interpretar los perfiles plasmídicos sea difícil establecer reglas con respecto a la identidad de los aislados en base únicamente a sus perfiles. Hay autores que dicen que la pérdida de una banda e incluso dos bandas en los perfiles plasmídicos no justifica que aislados relacionados sean considerados como pertenecientes a dos cepas distintas (Parisi y cols., 1986), otros autores han considerado que aislados epidemiológicamente relacionados podrían presentar hasta tres diferencias en sus perfiles plasmídicos. (Archer y cols., 1982 y 1984; Mickelsen y cols., 1985).

- Existen variables ligadas al método de extracción que pueden dar tres formas del mismo plásmido (superenrollada, circular y lineal) que tienen movilidades electroforéticas distintas y que no resultan fáciles de distinguir (Archer y cols., 1984).

- Existen variables debidas a las condiciones electroforéticas. (Archer y col., 1984).

- Plásmidos con idéntica movilidad electroforética no tienen porque ser idénticos, por lo que para aumentar la sensibilidad de esta técnica los plásmidos podrían estudiarse con endonucleasas de restricción o lo que sería más definitivo realizar estudios de hibridación con el DNA plasmídico (Parisi, 1985).

- El poder discriminatorio de esta técnica es pobre en aquellos aislados que carecen de plásmidos o bien presentan únicamente uno o dos. (Maslow, 1993).

A pesar de todos los inconvenientes anteriormente expresados, al valorar los perfiles obtenidos por plasmidotipia junto con los patrones conseguidos por los marcadores fenotípicos, pudimos establecer similitudes o diferencias entre los aislados pertenecientes a un mismo enfermo en 9 (17,3%) de aquellos 19 (36,5%) casos en los que con los patrones de las distintas técnicas fenotípicas no habían podido ser establecidas. Al valorar conjuntamente los patrones de las distintas técnicas de fagotipia junto con los patrones de resistencia a antimicrobianos y de plasmidotipia conseguimos establecer relaciones epidemiológicas en 42 (80,8%) de los casos estudiados. Por lo tanto, pensamos que la plasmidotipia puede ser útil en estudios epidemiológicos de corta duración, tomando la precaución de no realizar sucesivos subcultivos para evitar la pérdida de plásmidos. Al igual que otros autores (Parisi y cols., 1986; Martín de Nicolás y cols., 1995; Ludlam y cols., 1989b) creemos que la combinación de la plasmidotipia con uno o más marcadores fenotípicos puede resultar útil en determinados estudios básicos de caracterización de los ECN, así como para establecer posibles relaciones epidemiológicas en los procesos infecciosos causados por ECN.

#### 5.4.2. ANÁLISIS DEL ADN DE LOS AISLADOS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO

Por último completaremos el estudio de los aislados de ECN mediante el análisis del ADN total digerido con endonucleasas de restricción de corte infrecuente y su electroforesis en campo pulsado, método que ha sido propuesto como un nuevo marcador para realizar estudios epidemiológicos (Allardet-Servent y cols., 1989).

Según Goering (1993) la selección de la enzima apropiada para realizar esta técnica depende de la frecuencia de los lugares de restricción de la enzima presentes en el cromosoma del microorganismo, como las bacterias gram positivas tienen en su ADN un alto contenido en adenina y timina entonces las enzimas de restricción que reconozcan secuencias ricas en guanina y citosina podrían proporcionar un pequeño número de fragmentos de ADN adecuado para el análisis en PFGE. Siguiendo este criterio probamos las enzimas *Sma* I, *Sst* II, *Apa* I y *Pvu* II; y después de analizar los perfiles obtenidos decidimos trabajar con *Sma* I ya que producía un perfil con una fragmentación de un amplio rango de pesos moleculares, con bandas claras y en número adecuado. Enzima que ha sido utilizada en el análisis del ADN de los ECN en PFGE por autores como Vandenesch y cols. (1993), Huebner y cols. (1994) y Linhardt y cols. (1992).

Mediante esta técnica obtuvimos un alto número de perfiles electroforéticos claramente diferentes, 59 perfiles distintos de un total de 114 aislados pertenecientes a 38 casos y nueve perfiles más que presentan ciertas diferencias con respecto a alguno de los anteriores 59 perfiles. Este alto número de perfiles electroforéticos está en consonancia con los numerosos patrones obtenidos con el resto de los marcadores utilizados, dato que indica una gran variabilidad dentro de los ECN y especialmente dentro de la especie *S. epidermidis*, puesto que la mayoría de los aislados que hemos estudiado pertenecían a esta especie. Esta gran variabilidad

también ha sido descrita por Vandenesch y cols. (1993) en su trabajo de marcadores epidemiológicos en ECN.

Al digerir el ADN de los ECN con la endonucleasa *Sma* I encontramos un número de fragmentos de restricción similar al descrito por Tenover y cols. (1995) que variaba desde 3 hasta 21 bandas.

Las críticas que se le pueden hacer a esta técnica es que aunque la pérdida o adquisición de plásmidos normalmente no influyen en el perfil electroforético, si existiera un plásmido de gran tamaño, este podría ser *linealizado por la endonucleasa interfiriendo teóricamente en el perfil* (Vandenesch y cols., 1993). Esto no constituiría un problema dentro de los ECN puesto que, como ya hemos visto, la mayoría de sus plásmidos son pequeños. También la integración de fagos en el cromosoma bacteriano puede ser responsable de pequeñas variaciones en el perfil de restricción del ADN (Lina y cols., 1993). Pero la crítica más importante se debe a la dificultad que conlleva la comparación de geles, puesto que las condiciones electroforéticas influyen en las distancias de migración de los fragmentos de restricción a través del gel, esta dificultad se puede eliminar analizando en un mismo gel el ADN de los aislados que queremos comparar y si ello *no fuera posible analizando en el nuevo gel el ADN cuyo perfil electroforético hemos considerado patrón junto con los ADN del resto de los aislados.*

A la hora de estudiar las posibles relaciones epidemiológicas entre diferentes aislados de un mismo enfermo mediante el análisis de los perfiles de restricción de sus ADN, y aunque conscientes de que la comparación de patrones es un proceso subjetivo que no puede ser reducido a estrictas reglas, siguiendo los criterios de Tenover y cols. (1995) y teniendo en cuenta que aislados estrechamente relacionados presentaban un coeficiente de similitud superior al 80% (Goering 1993), sugerimos 4 tipos de relaciones epidemiológicas:

- Cepas idénticas que presentaban el mismo perfil electroforético con un coeficiente de Sorensen del 100%.

- Cepas relacionadas con perfiles electroforéticos con una diferencia de hasta 3 bandas y un coeficiente de Sorensen inferior al 100% y superior al 80%.
- Cepas posiblemente relacionadas cuyos perfiles eran similares aunque con más de tres bandas de diferencia y un coeficiente de Sorensen entre el 80% y el 69%.
- Cepas distintas cuyos perfiles de restricción eran claramente diferentes y su coeficiente de similitud inferior al 69%.

Los patrones electroforéticos por campo pulsado, por un lado nos permitieron confirmar la valoración realizada en base a los patrones obtenidos por los marcadores anteriormente descritos cuando establecimos las similitudes y diferencias entre aislados de un mismo enfermo, y por otro lado nos permitieron determinar las posibles relaciones epidemiológicas entre los aislados de un mismo paciente en aquellos 10 (19,2%) casos en los que con los patrones de los marcadores no pudieron ser establecidas, debido a una caracterización insuficiente de dichos aislados por problemas de tipabilidad o a dificultades en la interpretación de los resultados. Por lo que basándonos en los criterios anteriormente expuestos con los perfiles de restricción obtenidos por campo pulsado conseguimos determinar en todos los casos si aislados de un mismo paciente eran la misma cepas o cepas distintas. Nosotros al igual que Maslow y cols. (1993) comprobamos que con esta técnica cada aislado no relacionado tiene un único perfil y que como describe Huebner y cols. (1994), cuando digerimos el ADN de los ECN con *Sma* I y realizamos la electroforesis en campo pulsado encontramos una gran variabilidad de perfiles electroforéticos. Además observamos que aislados estrechamente relacionados presentan perfiles de bandas altamente conservados. Al comparar los resultados obtenidos con PFGE con los conseguidos por el resto de los marcadores fenotípicos y genotípicos utilizados en este estudio, la electroforesis en campo pulsado fue la técnica que de una forma más clara y convincente nos permitió establecer las posibles relaciones epidemiológicas en los aislados

estudiados. Por lo tanto, del mismo modo que otros autores (Linhardt y cols., 1992) creemos que PFGE es una técnica muy útil para el análisis epidemiológico de las infecciones nosocomiales por ECN.

### **5.5.- VALORACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIA EN BASE A LOS DATOS MICROBIOLÓGICOS Y CLÍNICOS**

#### **5.5.1.- VALORACIÓN DE LOS CASOS DE BACTERIEMIA EN BASE A LOS DATOS MICROBIOLÓGICOS**

Como hemos visto, el hecho de que los ECN sean microorganismos ubicuos que constituyen el principal componente de la microflora de la piel y mucosas da lugar a que cuando se aísla un ECN en un hemocultivo sea un problema controvertido establecer si es el agente etiológico de la infección o si es un contaminante (Kleeman y cols. 1993). El criterio microbiológico generalmente aceptado con el que presumiblemente se diferencia entre verdadera infección y contaminación se basa en dos parámetros. Por un lado la existencia de un alto número de UFC/ml que se interpretaría como un indicio de infección (Bryan, 1989), siendo éste un parámetro que adquiere especial importancia en el caso de los neonatos de bajo peso a los que sólo se les realiza una extracción. Y por otro lado teniendo en cuenta que es altamente improbable, dada la gran variabilidad intrínseca de los ECN, que aislados no relacionados epidemiológicamente presenten las mismas características fenotípicas y genotípicas (Etienne y cols., 1990; Herwaldt y cols., 1990) se considera evidencia de infección el aislamiento de la misma cepa de ECN en diferentes hemocultivos obtenidos a lo largo del tiempo en un mismo paciente (Etienne y cols., 1990, Jarlöv y cols., 1992). El elevado número de patrones que hemos obtenido por distintos marcadores fenotípicos y genotípicos en el estudio de nuestros aislados apoya la existencia de una variabilidad intrínseca en los ECN, lo que hace que confiemos en el criterio anteriormente expuesto

para determinar la importancia clínica del ECN aislado de hemocultivo.

En la selección de todos los casos estudiados en este trabajo tuvimos en cuenta la dificultad que tiene el determinar si un ECN es el agente causal de una infección o un simple contaminante. Para reducir en lo posible la dificultad de esta valoración elegimos solamente aquellos casos en los que disponíamos de la información clínica del paciente así como de distintos aislados obtenidos de diferentes hemocultivos de un mismo paciente. Además debido a que en algunos casos se habían aislado varios ECN en un largo espacio de tiempo hizo que, para obtener una mejor comprensión de lo que estaba ocurriendo durante el proceso infeccioso, dividiéramos los casos en períodos de tiempo que llamamos episodios, considerando que los hemocultivos pertenecían a episodios distintos cuando transcurría al menos una semana sin hemocultivos positivos.

A causa de que no existe un único método de tipado efectivo que caracterice a los ECN, para poder determinar en los casos estudiados si los ECN aislados eran los agentes causales de las infecciones se les fue caracterizando, como aconsejan diversos autores (Dryden y cols., 1992; Parisi y cols., 1986), con los patrones obtenidos de un conjunto de marcadores epidemiológicos. A todos los aislados se les aplicó tres marcadores fenotípicos (fagotipia, fagotipia inversa y resistencia a antimicrobianos) y uno genotípico (plasmidotipia), pero debido a que en algunos casos la caracterización resultó insuficiente a causa del bajo porcentaje de tipabilidad que ofrecían algunas de estas técnicas y en otros casos resultaba difícil la interpretación de los patrones hizo que se fueran aplicando sucesivamente nuevas técnicas (fagotipia con fagos adicionales, Fisk y PFGE) hasta conseguir una suficiente y clara caracterización de los casos que nos permitiera establecer cual era el ECN responsable de la infección y cual el contaminante.

A la hora de valorar los patrones obtenidos por los distintos marcadores epidemiológicos para establecer si dos cepas eran iguales o distintas nos basamos en los criterios utilizados por otros autores (criterios

que están ampliamente explicados en el apartado 4.12.1 de resultados). De este modo, consideramos que dos cepas eran idénticas si presentaban los mismos patrones por todos los marcadores y cuando aparecían pequeñas diferencias se seguían los siguientes criterios: para valorar diferencias en los patrones de fagotipia seguimos la regla de "las dos diferencias" (Williams y Rippon, 1952); diferencias en los patrones de resistencia a antimicrobianos y perfiles plasmídicos fueron analizadas teniendo en cuenta que tanto la resistencia a antibióticos como la presencia *de plásmidos son dos características inestables sujetas a la presión selectiva hospitalaria* (Mickelsen y cols., 1985, Parisi y cols. 1986); en cuanto a los perfiles electroforéticos obtenidos por campo pulsado nos basamos en que cada aislado no relacionado tiene un único perfil de restricción en PFGE (Maslow y cols., 1993) y analizamos las diferencias en los perfiles siguiendo los criterios de Tenover y cols. (1995) y Goering (1993) encontrando casos con cepas idénticas, relacionadas, posiblemente relacionadas y distintas.

Una vez que consideramos que todos los casos estaban adecuadamente caracterizados, analizamos globalmente el hecho de que con la aplicación sucesiva de los distintos marcadores íbamos obteniendo *nueva información que nos permitiría ir aumentando el número de casos en los que se podían establecer si distintos aislados pertenecientes de un mismo paciente eran o no la misma cepa*. Encontramos que dicha relación epidemiológica se pudo determinar en 16 (30,8%) casos con el análisis de los patrones de las distintas técnicas de fagotipia; cuando añadíamos los patrones de resistencia a antimicrobianos en 17 casos más, lo que hacía un total de 33 (63,5%) casos, era establecida dicha relación; cuando a los anteriores marcadores añadíamos los patrones plasmídicos en 9 casos más, lo que constituía un 42 (80,8%) de los casos, establecíamos las similitudes y diferencias; y cuando por último añadíamos los patrones obtenidos por PFGE las relaciones epidemiológicas quedaban claras en los 10 casos restantes, por lo que en este punto en los 52 (100%) casos se pudo

establecer si los ECN aislados de hemocultivos de un mismo enfermo eran una única cepa o cepas diferentes.

Desde nuestro punto de vista de laboratorio vimos que en los casos de bacteriemias aparecían dos tipos de situaciones: casos con un único episodio y casos con varios episodios.

#### Casos de bacteriemia con un único episodio

Los casos de bacteriemia con un único episodio fueron 45, lo que representa el 87% de los casos, de los cuales en 27 (52%) casos los ECN aislados eran la misma cepa y por lo tanto fueron considerados patógenos. En cinco de los casos (10%) además de cepas idénticas, consideradas como el agente causal de la bacteriemia, se aislaron algunas cepas distintas que fueron consideradas como posibles contaminantes, este hecho de encontrar una cepa de ECN evaluada como significativa junto con otras calificadas como contaminantes no parece ser un hecho inusual y está descrito en otros trabajos (Harstein y cols., 1988; Mickelsen y cols., 1985, Parisi y cols. 1985). En un caso (2%) en el que se aislaron ECN de cinco hemocultivos, tres de los aislados pertenecían a una misma cepa de *S. hominis*, y los otros dos aislados a una misma cepa de *S. epidermidis*; en este caso existe una infección mixta producida por dos especies de ECN, Weinstein y cols. (1983) en su revisión acerca de la significación clínica de hemocultivos positivos en episodios de bacteriemia informa que un 18,4% de los episodios de bacteriemia eran infecciones mixtas y atribuye este alto porcentaje a la gran proporción de pacientes inmunocomprometidos cuyos hemocultivos han estudiado. El hecho de que nuestro porcentaje de infecciones mixtas sea significativamente menor que el de Weinstein y cols. se explica porque mientras Weinstein estudia todos los microorganismos aislados en los hemocultivos, nosotros estudiamos tan solo los ECN. En 12 casos (23%) los ECN aislados de los hemocultivos resultaron ser cepas distintas, y como de la mayoría de los pacientes sólo teníamos dos hemocultivos no pudimos determinar el agente etiológico de la infección pero tampoco podíamos decir rotundamente que los ECN eran

contaminantes, puesto que si hubiéramos tenido más hemocultivos tal vez en algún caso alguno de los ECN aislados hubiera sido considerado con significación clínica.

#### Casos de bacteriemia con varios episodios

Siete de los casos estudiados (13%) presentaron más de un episodio de bacteriemia. El análisis de la mayoría de estos casos resulta complejo porque la infección se prolonga durante un largo período de tiempo, pero se consigue llegar a conclusiones acerca de lo que está pasando en el *proceso infeccioso gracias a que de cada caso tenemos un gran número de hemocultivos que nos va a facilitar el determinar qué cepa es el agente causal de la bacteriemia*. En estos casos es frecuente encontrar una cepa de ECN dominante, que es considerada patógena, junto con otras cepas que presentan ciertas variaciones y que están relacionadas con la cepa dominante y seguramente juegan un papel infeccioso, y además otras cepas diferentes que podrían ser consideradas contaminantes; hecho que también ha sido descrito por Ryding y cols. (1992). También es frecuente encontrar casos en los que en un episodio una cepa de ECN es la responsable de la bacteriemia mientras que en el episodio siguiente lo es otra cepa distinta. *Como ejemplos más representativos de lo que aquí se ha dicho, vamos a comentar el caso 8 y el caso 42.*

El caso 8 es un paciente varón ingresado en la unidad de cuidados intensivos, con catéter intravenoso y presentó un cuadro de sepsis. Durante los meses de Enero y Febrero se tomaron varios hemocultivos que pertenecen a tres episodios. En el primer episodio se estudiaron 4 hemocultivos de los que se aislaron 4 *S. hominis*, tres de los cuales son idénticos y constituyen la cepa dominante y el otro resulta estar estrechamente relacionado con los anteriores, lo que nos lleva a concluir que en este primer episodio el agente etiológico de la bacteriemia es un *S. hominis*, del segundo episodio solo había un hemocultivo del que se aisló *S. epidermidis*, que en principio podría haber sido considerado como carente de significación clínica pero como en los dos hemocultivos del tercer

episodio se aíslan dos *S. epidermidis*, uno de ellos idéntico al del segundo episodio, ello hace que a éste se le considere patógeno; mientras que el otro que resulta distinto fue considerado como posible contaminante. En este caso como transcurre un mes entre los hemocultivos del primer episodio y los del segundo y tercero, podríamos hablar de una reinfección.

El caso 42 es un paciente varón de un año ingresado en el área de pediatría con una leucemia linfoblástica aguda y durante los meses de Abril, Junio y Julio se estudiaron varios hemocultivos de los que se aislaron ECN. En este caso los clínicos tuvieron dudas acerca de la significación clínica de los ECN que se aislaron en los sucesivos hemocultivos. Con los datos de laboratorio en el primer episodio en el que de dos hemocultivos se aíslan dos cepas de *S. epidermidis* distintas, no pudimos determinar el agente etiológico de la bacteriemia. En el segundo episodio con 4 hemocultivos de los que se aislaron 4 *S. epidermidis* dos de los cuales resultaron idénticos constituyendo la cepa dominante y las otras dos cepas resultaron estar estrechamente relacionadas con la anterior, habiéndose así constatado que en este episodio la bacteriemia fue causada por un ECN. En el tercer episodio encontramos dos cepas de *S. epidermidis* idénticas entre sí y diferentes de las del segundo episodio, por lo tanto la bacteriemia en este momento estaría causada por una cepa distinta de la del episodio anterior. En el cuarto episodio de dos hemocultivos se aislaron dos *S. epidermidis* que resultaron ser la misma cepa e idéntica a la cepa dominante del segundo episodio. Este caso, a pesar de que no se han aislado los dos *S. epidermidis* patógenos en un mismo episodio, parece más un caso de infección mixta, en el que no se han detectado a la vez los dos agentes patógenos, que uno de reinfección ya que es improbable que en el cuarto episodio la reinfección sea producida por la misma cepa que en el segundo existiendo entre medias otro episodio de reinfección por una cepa diferente.

Concluiremos diciendo que la valoración microbiológica del proceso infeccioso es más exacta cuantos más hemocultivos de un mismo paciente podamos analizar y cuantos más datos epidemiológicos del paciente tengamos. Si estas premisas se cumplen la valoración microbiológica va a determinar si los ECN son los agentes etiológicos de las bacteriemias.

#### **5.5.2.- COMPARACIÓN ENTRE LA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA Y CLÍNICA DE LAS BACTERIEMIAS RELACIONADAS CON ECN**

Como hemos visto, en este estudio se ha establecido el carácter patógeno o contaminante de los ECN aislados de hemocultivos en base a dos criterios, por un lado al criterio clínico y por otro lado basándonos en los datos de laboratorio. Al comparar la valoración clínica con nuestra valoración microbiológica encontramos que en 34 casos existe una concordancia entre ambos criterios y en la mayoría de los casos (30) los ECN fueron considerados patógenos por ambos criterios. En seis casos donde el clínico dudaba de la significación clínica de los ECN, los datos de laboratorio identificaron al ECN responsable de la bacteriemia. En tan sólo tres casos existía un desacuerdo entre ambos criterios, donde como era de esperar los ECN fueron considerados contaminantes según el criterio clínico mientras que con los datos de laboratorio se identificó al ECN agente causal de la bacteriemia. Los nueve casos restantes los datos microbiológicos no permitieron establecer si los ECN tenían o no significación clínica.

Resumiendo diremos que los datos microbiológicos permitieron identificar al ECN causante de la bacteriemia en un 75% de los casos estudiados y en tan solo un 7% de los casos existía un desacuerdo entre el criterio clínico y el microbiológico.

## 5.6.- ESQUEMA JERARQUIZADO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS ECN

Para poder establecer qué marcadores epidemiológicos deberíamos utilizar en el estudio de los ECN hay que tener en cuenta tanto las características que tiene cada marcador como el tipo de estudio que se quiere realizar.

En este trabajo hemos debatido ampliamente acerca de las ventajas e inconvenientes que los distintos marcadores epidemiológicos presentaban en el estudio de los ECN, el resumen de la valoración de estos marcadores epidemiológicos queda reflejado en la Tabla 24. Como hemos comprobado, no existe un único método de tipado que pueda por si solo utilizarse en estudios de ECN, entonces es necesario utilizar una combinación de marcadores epidemiológicos para caracterizar a estos microorganismos.

En el caso de los Laboratorios Hospitalarios en los que necesitan un diagnóstico rápido y en los que generalmente se realizan estudios epidemiológicos de corta duración, resultaría útil que junto con las resistencias a antimicrobianos que se realizan de forma rutinaria con objeto de establecer el tratamiento del paciente también se realizará plasmidotipia, ya que con la valoración conjunta de los patrones obtenidos por ambas técnicas se puede determinar en un gran proporción de casos si el ECN es el agente etiológico de la infección nosocomial, a la vez que se detectarían la posible aparición de brotes causados por ECN.

En el caso de los Laboratorios de Referencia, para los trabajos de vigilancia epidemiológica continuada es recomendable utilizar las técnicas de fagotipia y fagotipia inversa junto con la resistencia a antimicrobianos. Los patrones obtenidos por estas técnicas nos caracterizarían los aislados permitiéndonos establecer sus posibles relaciones epidemiológicas de una forma rápida y económica pudiéndose detectar la existencia de brotes, que deberían ser confirmados con los patrones conseguidos por algún marcador

molecular. Según los datos de este trabajo el más adecuado sería la técnica de PFGE que por su discriminación y reproducibilidad daría una información más precisa sobre las relaciones epidemiológicas existentes entre las cepas.

**TABLA 24: VALORACIÓN DE LOS MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS EN EL ESTUDIO DE LOS ECN**

<b>TÉCNICA</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>INCONVENIENTES</b>
<b>Fagotipia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Buena discriminación</li> <li>- Buena reproducibilidad</li> <li>- Analiza alto nº de cepas</li> <li>- No necesita aparataje</li> <li>- Rápida</li> <li>- Económica</li> <li>- Sencilla</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tipabilidad baja</li> <li>- Mantenimiento de fagos</li> <li>- Sólo Laboratorios Referencia</li> </ul>
<b>Antibiotipia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aceptable reproducibilidad</li> <li>- Aceptable discriminación</li> <li>- Alta tipabilidad</li> <li>- Rápida</li> <li>- Sencilla</li> <li>- Económica</li> <li>- Realizable en Lab. hospitalarios</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inestabilidad</li> <li>- Difícil valoración</li> </ul>
<b>Plasmidotipia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tipabilidad aceptable</li> <li>- Rápida</li> <li>- Sencilla</li> <li>- Económica</li> <li>- Aparataje sencillo</li> <li>- Realizable en Lab. hospitalarios</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Escasa reproducibilidad</li> <li>- Escasa discriminación</li> <li>- Inestabilidad</li> <li>- Difícil valoración</li> <li>- Limitada a cortos estudios</li> </ul>
<b>E. campo pulsado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta tipabilidad</li> <li>- Alta reproducibilidad</li> <li>- Alto poder discriminatorio</li> <li>- Sencilla</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aparataje costoso</li> <li>- No es rápida</li> <li>- Difícil valoración</li> </ul>

---

Para concluir diremos que aunque los ECN son importantes agentes etiológicos de bacteriemias en pacientes que presentan serias enfermedades de base, el establecer si estos microorganismos tienen significación clínica es un problema controvertido, porque son uno de los componentes mayoritarios de la microflora de la piel y mucosas y además no existe un método eficaz de tipado que los caracterice siendo necesaria la utilización de varios marcadores epidemiológicos para conseguir tal fin. Estos inconvenientes dan lugar a que en los estudios epidemiológicos de los ECN *solamente se consigan buenos resultados si se tiene perseverancia y si distintos grupos de profesionales trabajan en equipo realizando las siguientes labores: el personal de enfermería obteniendo muestras de buena calidad, el microbiólogo identificando y caracterizando el microorganismo aislado en la muestra y dando una valoración desde el punto de vista de laboratorio y por último el clínico valorando conjuntamente la clínica con los resultados del microbiólogo.*

**5.- CONCLUSIONES**

A partir de los años 70, los ECN son reconocidos como agentes causales de una variedad de enfermedades, observándose que se ha producido un aumento progresivo de las bacteriemias en las que los ECN son la primera causa de infección. De las diferentes especies estafilocócicas es *S. epidermidis* la que con mayor frecuencia se aísla en las bacteriemias seguido de lejos por *S. haemolyticus* y *S. hominis*.

1. Todas las técnicas de fagotipia analizadas tipificaron un bajo porcentaje de aislados de ECN. La fagotipia con el juego de fagos combinado fue la que mayor porcentaje de tipabilidad proporcionó (34,8%). Esta técnica junto con la fagotipia inversa, fueron las que mayor poder discriminatorio presentaron, y resultaron de poca utilidad en la caracterización de estos microorganismos las técnicas de Fisk y fagotipia con fagos adicionales.
2. Se propone reducir el juego de fagos combinado de 42 a 25 fagos, quedando constituido por los 20 fagos del juego de "Dean y Williams" (ya que nos permite comparar nuestros resultados con los obtenidos en otros países) y los 5 fagos del juego autóctono: 89904, 90319, 90341, 90352 y 90509.
3. A pesar de los inconvenientes que la antibiotipia presenta, este método de tipado resultó ser un marcador reproducible y discriminatorio cuya realización de forma sistemática en los laboratorios hospitalarios puede proporcionar un primer aviso sobre la existencia de cepas relacionadas epidemiológicamente.

4. A pesar de los problemas de reproducibilidad y discriminación, la plasmidotipia puede resultar de utilidad en estudios epidemiológicos de corta duración tomándose la precaución de no realizar sucesivos subcultivos para evitar la pérdida de plásmidos.
5. El PFGE ha sido el marcador que de una forma más clara y convincente nos ha permitido establecer las posibles relaciones epidemiológicas en los aislados estudiados, por lo que creemos que PFGE es una técnica muy útil para el análisis epidemiológico de las infecciones nosocomiales causadas por ECN.
6. Con todos los marcadores utilizados en la tipificación de los ECN hemos obtenido un elevado número de patrones, lo que indica que en los ECN y especialmente en *S. epidermidis* existe una gran variabilidad.
7. Mediante la aplicación sucesiva de los distintos marcadores, se estableció si los ECN tenían o no significación clínica en los casos estudiados. Dicha valoración se realizó en el 30,8% de los casos en base a los patrones obtenidos por las distintas técnicas de fagotipia, en el 63,5% con las técnicas de fagotipia y antibiotipia, en el 80,8% con las técnicas anteriormente citadas junto con plasmidotipia y se llegó al 100% de los casos con los patrones obtenidos por todas las técnicas incluida PFGE.

8. Los distintos ECN aislados de hemocultivos de un mismo enfermo resultaron ser la misma cepa en 39(52) casos, siendo considerados los agentes etiológicos de las bacteriemias. En los 13 casos restantes los aislados presentaban distintos patrones por lo que eran cepas diferentes. En la mayoría de los casos las bacteriemias presentaban un único episodio. Las reinfecciones e infecciones mixtas fueron más frecuentes en aquellos casos de bacteriemias con varios episodios. En tan sólo 3 casos (7%) existió desacuerdo entre el criterio clínico y microbiológico en la valoración de los ECN como agentes etiológicos de las bacteriemias.
  
9. En laboratorios hospitalarios, proponemos como esquema de caracterización de los ECN el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos junto con la plasmidotipia; ya que con ambas técnicas de una forma rápida y sencilla se va a obtener suficiente información para poder evaluar la situación epidemiológica de la infección nosocomial causada por ECN.
  
10. En el Laboratorio de Referencia, en el que se van a desarrollar estudios de vigilancia epidemiológica continuada, es recomendable utilizar junto con los datos de sensibilidad a antimicrobianos proporcionados por el laboratorio hospitalario, las técnicas de fagotipia y fagotipia inversa para establecer relaciones epidemiológicas entre los aislados y detectar brotes que deberían ser confirmados por los patrones conseguidos por PFGE.

**7.- BIBLIOGRAFIA**

- AASEN J.Y., OEDING P. (1971).** "Antigenic studies on *Staphylococcus epidermidis*", A.P.M.I.S., Sect. B. 79:827-834.
- AAVITSLAND P., STUMARK M., LYSTAD A. (1992).** "Hospital-acquired infections in Norway: A national prevalence study survey in 1991". *Scand. J. Infec. Dis.* 24: 477-483.
- ABD-EL-MALEK Y. GIBSON T. (1948).** "Studies in the bacteriology of milk. II. The staphylococci and micrococci of milk". *J. Dairy Res.* 15:249-260
- ABER C., MACKEL D.C. (1981).** "Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms", en Richard E. Dixon (ed.), *Nosocomial Infections*, Yorke Medical Books, pp. 161-167.
- AKATOV A.K., KHATENEVER M.L, DEVRIESE G.M. (1981).** "Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical sources", p.153-161. In J. Jeljaszewicz (ed.), *Staphylococci and staphylococcal infections*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Federal Republic of Germany.
- ALDRIDGE K.E., STRATTON C.W., PATTERSON L.S., EVANS M.E., 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. JOHSON 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.
- ALLARDET-SERVENT A., BOUZIGES N., CARLES-NURIT J., BOURG G., GOUBY A., RAMUZ M. (1989).** "Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections". *J. Clin. Microbiol.* 27:2057-2061.
- ARCHER G.L. (1988).** "Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus epidermidis*". *J. Antimicrob. Chemother.* 21:133-138.

ARCHER G.L., CLIMO M.W. (1994). "Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci". *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2231-2237.

ARCHER G.L., DIETRICK D.R., JOHNSTON J.L. (1985). "Molecular epidemiology of transmissible gentamicin resistance among coagulase-negative staphylococci in a cardiac surgery unit". *J. Infect. Dis.* 151:243-251.

ARCHER G.L., KARCHMER A.W., VISHNIAVSKY N., 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., TENENBAUM M.J. (1980). "Antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis* in patients undergoing cardiac surgery". *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:269-272.

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

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

BAIRD-PARKER A.C. (1963). "A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical test". *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.

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

BARRITT M.M. (1936). "The intensification of the voges-proskauer reaction by the addition of  $\alpha$ -naphthol". *J. Pathol. Bacteriol.* 42:441.

BARRY A.L., LACHICA R.V.F., ATCHINSON F.W. (1973). "Identificación of *S. aureus* by simultaneous use of the tube coagulase and thermonuclease test". *Appl Microbiol.* 25:426-497.

- BAUMGART S., HALL S.E., CAMPOS J.M., POLIN R.A. (1983). "Sepsis with coagulase-negative staphylococci in critically ill newborns". *Am. J. Dis. Child.* 137:461-463.
- 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 de., 1948; 7ª ed., 1957; 8ª ed., 1974; 9ª ed., 1994.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, (1986), vol 2, P.H.A. Sneath (ed), The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- BERNARDER S., HAMBREAU S., MYBÄCK, NYSTRÖM B., SUNDELÖF B. (1978). "Prevalence of hospital-associated infection in five swedish hospitals in november 1975. *Scand. J. Infec. Dis.* 10:66-70.
- BIALKOWSKA-HOBRAZANSKA H., JASKOT D., HAMMERBERG O. (1990). "Evaluation of restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal DNA and plasmid profile analysis for characterization of multiresistant coagulase-negative staphylococci in bacteremic neonates". *J. Clin. Microbiol.* 28:269-275.
- BIRNBOIM H.C., DOLY J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucl. Acids. Res.* 7:1513-1523.
- BLAIR J.E., 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., ATHERTON J.M. (1975). "Efficacy of phage-typing epidemiologically related *S. epidermidis* strains". *J. Clin. Microb.* 2:318-321.
- 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.
- BRANDT L., SWAHN B. (1960). "Subacute bacterial endocarditis due to coagulase-negative *Staphylococcus albus*". *Acta Med. Scand.* 166:125-132.

- BRYAN CH.S. (1989). "Clinical implications of positive blood cultures". Clin. Microb. Rev. 2:329-353.
- CANTOR C.R., SMITH C.L., MATHEW M. (1988). "Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules". Ann. Rev. Biophys. Chem. 17:287-304.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. (1977). "National nosocomial infections study. United States 1975-1976". M.M.W.R., 26:377-383.
- CLARKE A.M. (1979). "Prophylactic antibiotics for total hip arthroplasty-the significance of *Staphylococcus epidermidis*". J. Antimicrob. Chemother. 5:493-502.
- CLARK W.M., LUBS H.A. (1915). "The differentiation of bacteria of the colon-aerogenes family by the use of indicators. J. Infect. Dis. 17:160.
- COOKSEY R., BALDWIN J.N. (1985). "Relatedness of tetracycline resistance plasmids among species of coagulase-negative staphylococci". Antimicrob. Agents. Chemother. 27:234-238.
- COSTAS M., COOKSON B.D., TALSANIA H.G., OWEN R.J. (1989). "Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of methicillin-resistant strains of *S. aureus*". J. Clin. Microbiol. 27:2574-2581.
- CHESNEAU O., MORVAN A., GRIMONT F., LABISCHINSKI H., EL SOLH N. (1993). "*Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens". Int. J. Syst. Bacteriol. 43:237-244.
- CHRISTENSEN W.B. (1946). "Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types". J. Bacteriol. 52:461.
- CHRISTENSEN G.D., PARISI J.T., BISNO, A.L., SIMPSON W.A., BEACHEY, E.H. (1983). "Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci", J. Clin. Microbiol., 18:258-269.

CHU G., VOLLRATH D., DAVIS R.W. (1986). "Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields". *Science*, 234:1582-5.

DAVISON A.L., BADDLLEY J. (1963). "The distribution of teichoic acids in staphylococci". *J. Gen. Microbiol.*, 32:271-276.

DEAN B.A., WILLIAMS R.E.O., HALL F., CORSE J. (1973). "Phagetyping of coagulase-negative staphylococci and micrococci". *J. Hyg.*, 71:261-270.

DE LA FUENTE R., SUAREZ G., SCHLEIFER K.H. (1985). "*Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobis* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35:99-102.

DE SAXE M.J., NOTLEY C.M. (1978). "Experiences with the typing of coagulase-negative staphylococci and micrococci". *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiolog. Hyg., I. Abt. Orig. A.* 241:46-59.

DE SAXE M.J., CREES-MORRIS J.A., MARPLES R.R., 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

DEVRIESE L.A., HAJEK V., OEDING P., MEYER S.A., 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-BALZ R., SCHLEIFER K.H. (1983). "*Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus caprae*, two new *Staphylococcus* species from animals". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33:480-486.

DÍAZ M.D., SÁNCHEZ-CARRILLO C., BOUZA E. (1994). "Evolución de la resistencia a antimicrobianos de *Staphylococcus* aislados en hospitales españoles. Tercer estudio." *Revis. Clin. Españ.* 194:814-820.

- DIXON R.E. (1987). "Cost of nosocomial infections and benefits of infection control programs". Prevention and control of nosocomial infections, Wenzel R.P. (ed.), the Williams and Wilkins Co., Baltimore pp 19-25.
- DOWSETT E.G., PETTS D.N., BAKER S.L., DE SAXE M.J., COE A.E., NAIDOO J., 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.
- DRYDEN M.S., TALSANIA H.G., MARTIN S., CUNNINGAM M., RICHARDSON, J.F. COOKSON B., MARPLES R.R. PHILLIPS I. (1992). "Evaluation of methods for typing coagulase-negative staphylococci". *J. Med. Microb.* 37:109-117.
- EMORI T.G., GAYNES R.P. (1993). "An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory". *Clin. Microbiol. Rev.* 6:438-442.
- EPINE. (1992). "Prevalencia de las infecciones nosocomiales en los hospitales españoles". Sociedad española de higiene y medicina preventiva hospitalarias.
- EPINCAT GRUPO DE TRABAJO. (1990). "Prevalencia de las infecciones nosocomiales en Cataluña. (I). Infecciones y factores de riesgo. *Med. Clín.(Barc).* 95:41-52.
- ETIENNE J. RENAUD F., BES M., BRUN Y., GREENLAND T.B., FRENEY J., FLEURETTE J. (1990). "Instability of characteristics amongst coagulase-negative staphylococci causing endocarditis". *J. Med. Microbiol.* 32:115-122.
- EVANS J.B., BRADFORD W.L.Jr., NIVEN C.F. (1955). "Comments concerning the taxonomy of the genera *Micrococcus* y *Staphylococcus*". *Inter. Bull. Bacteriol. Nomen. Tax.* 5:61-66.
- FALKOW S. (1958). "Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of *Salmonella* and *Shigellae*". *Amer. J. Clin. Pathol.* 29:598.
- FISK R.T. (1942). "Studies on staphylococci II. Identification of *S.aureus* strains by means of bacteriophage". *J. Infect. Dis.* 71:161-165.

FLEURETTE J., BRUN Y., BES M., COULET M., FOREY (1987). "Infections caused by coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*", p. 195-208. In G. Pulverer, P.G. Quie, and G. Peters (ed.), Pathogenicity and clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Federal Republic of Germany.

FRENEY J., BRUN Y., BES M., MEUGNEIR H., GRIMONT F., GRIMONT P.A.D., NERVI C., 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.

FRIDHANDLER I., GILL P., MARTINEZ L., VAS I.S. (1978). "Comparison of invasive and non-invasive strains of *Staphylococcus epidermidis* by phage typing". Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I. Abt. Orig. A, 241:136-139.

GABELISH C., STEFFE R., HARBOUR C., STUBBS E., VICKERY A. 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.

GALLAGHER D.J.A., MONTGOMERIE J.Z. and NORTH J.D.K. (1965). "Acute infections of the urinary tract and the urethral syndrome in general practice". Br. Med. J. 1:622.

GASTON M.A., DUFF P.S., NAIDOO J. Y COLS. (1988). "Evaluation of electrophoresis methods for typing methicillin-resistant *S. aureus*". J. Med. Microbiol. 26:189-197.

GIBSON T. (1967). "The status of the genus *Micrococcus*". Int. J. Syst. Bacteriol., 17:231-233.

GIGER O., CHARILAOU C.C., 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.

GOERING R.V. (1993). "Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis". Infect. Contr. Hosp. Epidem. 14:595-600.

GOETZ M.B., MULLIGAN M.E., KWOK R., O'BRIEN H., CABALLES C., GARCÍA J.P. (1992). "Management and epidemiologic analyses of an outbreak due to methicillin-resistant *S. aureus*". *Am. J. Med.* 92:607-614.

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.

GRIMONT F., GRIMONT P.A.D. (1986). "Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur*, 137B:165-75.

HAJEK V. (1976). "*Staphylococcus intermedius* a new species isolated from animals". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26:401-408.

HAJEK V., DEVRIESE L.A., MORDARSKI M., GOODFELLOW M., PULVERER G. 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.

HAJEK V., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H., SPRINGER N., ZITZELSBERGER W., KROPENSTEDT R.M., KOCUR M. (1992). "*Staphylococcus muscae*, a new species isolated from flies". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:97-101.

HALEY R.W., HOOTON T.M., CULVER D.H., QUADE D., SCHATMAN R.H., SCHABERG D.R., SHAH B.V. 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. 45-46.

HALL R.T., HALL S.L., BARNES W.G. IZUEGBU J., ROGOLSKY M., ZOBAS I. (1987). "Characteristics of coagulase-negative staphylococci from infants with bacteriemia". *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:377-383.

HARSTEIN A.I., VALVANO M.A., MORTHLAND V.H., FUSCH P.C., POTTER S.A., CROSA J.H. (1988). "Antimicrobial susceptibility and plasmid profile analysis as identity test for multiple blood isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B.* 95:283-292

HERWALDT L.A., BOYKEN L.D., PFALLER M.A. (1990). "Biotyping of coagulase-negative staphylococci: 108 isolates from nosocomial bloodstream infections". *Diag. Microb. Infect. Dis.* 13:461-466.

HILL L.R. (1959). "The Adansonian classification of the staphylococci". *J. Gen. Microbiol.*, 20:277-283.

HOLT R.J. (1971). "The colonization of ventriculoatrial shunts by coagulase-negative staphylococci", p.81-87. In. M. Finland, W. Marget, and K. Bartmann (ed.), *Bacterial infections: changes in their causative agents, trends and possible basis*. Springer-Verlag, Stuttgart, Germany.

HORAN T.C., GAYNES R.P., MARTONE W.J., JARVIS W.R., EMORI T.G. (1992). "CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections". *Am. J. Infect. Control* 20:206-213.

HOVIG B., LYSTAD A., OPSION H. (1981). "A prevalence survey of infections among hospitalized patient in Norway. *NIPH Annals.*, 4:49-60.

HUEBNER J., PIER G.B., MASLOW J.N., MULLE E., SHIRO H., PARENT M., KROPEC A., ARBEIT R.D., GOLDMANN A. (1994). "Endemic nosocomial transmission of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia isolates in a neonatal intensive care unit over 10 years". *The Journ. of Infect. Dis.* 169:526-531.

HUCKER G.J. (1948). "Genus I *Micrococcus*", in R.S. Breed, E.G.D. Murray y A.D. Hitchens (eds), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6 ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 235-246.

HUNTER PR. (1990). "Reproductibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods". *J. Clin. Microbiol.*, 28:1903-1905.

HUGHES J.M., CULVER D.H., WHITE J.W., JARVIS W.R., MORGAN W.M., MUNN V.P., MOSSER J.L., 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., JONES C. (1986). "Comparison of 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., MITOSUOKA T. (1989). "*Staphylococcus felis*, a new species from clinical specimens from cats". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39:373-377.
- IGIMI S., TAKAHASHI E., 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
- IZARD N.C., HACHLER H., GREHN M., KAYSER F.H. (1992). "Ribotyping of coagulase-negative staphylococci with special emphasis on intraspecific typing of *Staphylococcus epidermidis*". *J. Clin. Microbiol.* 30:817-23.
- JARLØV J.O., HANSE J.E.S., ROSDAHL V.T., ESPERSEN F. (1992). "The typing of *Staphylococcus epidermidis* by a lectin-binding assay. *J. Med. Microbiol.* 37:195-200.
- JEPSEN O.P., MORTENSEN N. (1980). "Prevalence of nosocomial infections and infection control in Denmark". *J. Hosp. Infec.* 70:960-970.
- JONES R.N., BARRY A.L., GARDINER R.Y., PACKER R.R. (1989). "The prevalence of staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins. A retrospective and prospective national surveillance trial of isolates from 40 medical centers". *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12:385-394.
- KARCHMER A.W., ARCHER G.L., DISMUKES W.E. (1983). "*Staphylococcus epidermidis* causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guide to therapy. *Ann. Intern. Med.* 98:447-455.
- KILPPER-BÄLZ R., SCHLEIFER K.H. (1981). "Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* Foubert and Douglas to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) comb. nov." *Zentralbl. Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene, I. Abteilung, Originalarbeiten*, 2:324-331.

- KLEEMAN K.T., BANNERMAN T.L., KLOOS W.E. (1993). "Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures". *J. Clin. Microbiol.* 31:1318-1321.
- KLESIUS P.H. 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., BANNERMAN T.L. (1994). "Update on clinical significance of coagulase-negative Staphylococci". *Clin. Microb. Rev.*, 7:117-140.
- KLOOS W.E., SCHLEIFER K.H. (1975a). "Isolation and characterization of staphylococci from skin. II. Description of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25:62-79.
- KLOOS W.E., 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. (1983). "*Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33:9-14.
- KLOOS W.E., SCHLEIFER K.H. (1986). "Genus IV *Staphylococcus*". *Bergey's manual of determinative bacteriology*, vol 2, P.H.A. Sneath (ed). The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- KLOOS W.E., SCHLEIFER K.H., SMITH R.F. (1976). "Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies". *Int J. Syst. Bacteriol.* 26:22-37.
- KLOOS W.E., WOLFSHOHL I.F. (1982). "Identification of *Staphylococcus* species with API STAPH-IDENT System". *J. Clin. Microbiol.* 16:509-516.

- KOONTZ F., PFALLER M. (1989). "Coagulase-negative staphylococci: why and when to do what". Clin. Microb. Newsl. 11:125-128.
- KRAUS E.S., SPECTOR D.A. (1983). "Characteristics and sequelae of peritonitis in diabetics and nondiabetics receiving chronic intermittent peritoneal dialysis". Medicine 62:52-57.
- LEIGHTON P.M., LITTLE J.A. (1986). "Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from urinary tract infections". Am. J. Clin. Pathol. 85:92-95.
- LI, W.H. (1981). "Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1085-1089.
- LINA B., BES M., VANDENESCH F., GREENLAND T., ETIENNE J., FLEURETTE J. (1993). "Role of bacteriophages in genomic variability of related coagulase-negative staphylococci" FEMS Microbiol. Letters 109:273-278.
- LINA B., VANDENESCH F., ETIENNE J. (1992). "Comparison of coagulase-negative staphylococci by pulsed-field gel electrophoresis". FEMS Microbiol. Letters. 92:133-138
- LINDWELL O.M. (1959). "Apparatus for phage-typing of *S. aureus*". Mth Bull Minist. Hlth 108:195-204.
- LINHARDT F., ZIEBUHR W., MEYER P., WITTE W., HACKER J. (1992). "Pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments as a tool for the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* y coagulase-negative staphylococci". FEMS Microb. letters. 181-186
- LORIAN V., ZAK O., SUTER J., BREUCHER C. (1985) "Staphylococci "in vivo" and "in vitro". Diag. Microb. Infect. Dis. 3: 433-444.
- LUDLAM H.A., NOBLE W.C., MARPLES R.R., PHILLIPS I. (1989b). "The evaluation of a typing scheme for coagulase-negative staphylococci suitable for epidemiological studies", J. Med. Microbiol. 30:161-165.

LUDLAM H.A., NOBLE W.C., MARPLES R.R., BAYSTON R., PHILLIPS, I. (1989a). "The epidemiology of peritonitis caused by coagulase-negative staphylococci in continuous ambulatory peritoneal dialysis", *J. Med. Microbiol.* 30:167-174.

MABECK C.E. (1969). "Significance of coagulase-negative staphylococcal bacteriuria". *Lancet* ii:1150-1152.

MARPLES R.R., HONE R., NOTLEY C.M., RICHARDSON J., 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.

MARTÍN M.A., PFALLER M.A., WENZEL R.P. (1989). "Coagulase-negative staphylococcal bacteremia". *Ann. Inter. Med.* 110:9-16.

MARTÍN DE NICOLÁS M.M., VINDEL A., SAEZ-NIETO J.A. (1990). Development of a new set of phages as an epidemiological marker in *Staphylococcus epidermidis* causing nosocomial infections. *Epidemiol. Infect.* 104:111-118.

MARTIN DE NICOLAS M.M., VINDEL A., SAEZ-NIETO J.A. (1995). "Epidemiological typing of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci". *J. Hosp. Infect.* 29:35-43.

MASLOW J.N., MULLIGAN M.E., ARBEIT R.D. (1993). "Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms". *Clin. Infect. Dis.* 17:153-64.

MAYON-WHITE R.T., DUCEL G., KERESLIDZE T., TIKHOMROV E. (1988) "An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection. *J. Hosp. Infect.* 11(suppl):43-48

MCLAWS M.L., GOLD J., KING K., IRWIG L.M., BERRY G. (1988). "The prevalence of nosocomial and community-acquired infections in Australian hospitals". *Med. J. Aust.* 149:585-590.

MEERS P.D., AYLIFFE G.A.J., EMMERSON A.M., LEIGH D.A., MAYON-WHITE, R.T., MACKINTOSH C.A., STRONGE J.L. (1981). "Report on national survey of infections in hospitals, 1980". J. Hosp. Infect. 2(suppl): 1-53.

MERTENS R., KEGELS G., y STROOBANT A. et al. (1987). "The national prevalence survey of nosocomial infections in Belgium, 1984". J. Hosp. Infect. 11:328-334.

MICKELSEN P.A., FLORDE J.J., GORDON K.P., HARGISS C., McCLURE J., SCHOENKNECHT F.D., CONDIE F., TENOVER F.C., TOMPKINS L.S. (1985). "Instability of antibiotic resistance in a strain of *S. epidermidis* isolated from a outbreak of prosthetic valve endocarditis". J. Infect. Dis. 152:50-58.

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. (1986). Dirección General de Planificación. (1986). "Encuesta epidemiológica de prevalencia en un punto de la infección hospitalaria y uso clínico de antimicrobianos en España. Análisis descriptivo de resultados". Madrid 1986; 35 págs.

MØLLER V. (1955). "Simplified test for some amino acid decarboxylases and for the arginine-dehydrolasa system". Acta Pathol. Microbiol. Scand. 36:158.

MORO M.L., STAZI M.A., MARASCA D., GRECO D., ZAMPIERI A. (1986). "National prevalence survey of hospital-acquired infections in Italy, 1983. J. Hosp. Infect. 8: 72-85.

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., 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.

MULLIGAN M.E., KWOK R.Y., CITRON D.M. JOHN J.F., SMITH P.B. (1988). "Immunoblots, antimicrobial resistance, and bacteriophage typing of oxacillin-resistant *S. aureus*". J. Clin. Microbiol 26:2395-2401.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (1993). "Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Document M7-A3. Villanova, Ca.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM. 1991. "Nosocomial infection rates for interhospital comparison: limitations and possible solutions". *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12:609-621.

NEUMEISTER B., KASTNER S., CONRAD S., KLOTZ G., BARTMANN P. (1995). "Characterization of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial infections in preterm infants". *Eur. J. Clin. Micro. Infect. Dis.*, 14:856-863.

OGSTON A. (1880). "Über Abscesse". *Arch. Klin. Chir.*, 25:588-600.

PALEY D., MOSELEY C.F., ARMSTRONG P., PROBER C.G. (1986). "Primary osteomyelitis caused by coagulase-negative staphylococci". *J. Pediatr. Orthop.* 6:622-626.

PARISI J.T. (1985). "Coagulase-negative staphylococci and epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*". *Microbiol. Rev.* 49:126-139.

PARISI J.T., LAMPSON B.C., HOOVER D.L., KHAN J.A. (1986). "Comparison of epidemiologic markers for *Staphylococcus epidermidis*". *J. Clin. Microb.* 24:56-60.

PARISI J.T., HECHT D.W. (1980). "Plasmid profiles in epidemiologic studies of infections by *Staphylococcus epidermidis*". *J. Infect. Dis.* 141: 637-643.

PATRICK C.C. (1990). "Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance". *J. Pediatr.*, 116:497-507.

PEREIRA A.T. (1962). "Coagulase-negative strains of *Staphylococcus* possessing antigen 51 as agents of urinary infection". *J. Clin. Pathol.* 15:252-259.

PFALLER M.A., HERWALDT L.A. (1988). "Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci". *Clin. Microbiol. Newsl.*, 11:137-142.

PILLET J., ORTA B. (1954). "Recherches sur la composition antigenique des staphylocoques non pathogenes. I. Mise en evidence d'agglutinogenes specifiques et d'un agglutinogene common 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., 3:261-264.

PLANES A.M. (1990). "Técnicas de hemocultivo". Lab 2000, 25:5-8.

PULVERER G. (1985). "On the pathogenicity of coagulase-negative staphylococci", p. 1-9. In J. Jeljaszewics (ed.), The staphylococci: proceedings of V International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.

PULVERER G., PILLICH J. (1967). "Coagulase-negative Staphylokokken (*Staphylococcus albus*) als Krankheitserreger". Dtsch. Med. Wochenschr. 92:1141-1145.

PULVERER G. 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., HAKLOVA M. (1976). "Phage-typing set for the species *staphylococcus albus*". Zentrabl. Bakteriol. Hyg. Mikrobiol., I. Abt. Orig. A. 5:153-157.

PULVERER G., PILLICH J., KLEIN A. (1975). "New bacteriophages of *Staphylococcus epidermidis*". J. Infect. Dis. 132:524-531.

PULVERER G., PILLICH J., 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.

QUENON J.L., GOTTOT S., DUNETON P., CARLET J., REGNIER B., DESHONS J., BRÜCKNER G. (1992). "First national prevalence study of hospital acquired infections in France". ICAAC, Anaheim, USA; October 11-14.

- RICHARDSON J.F., MARPLES R.R. (1987). "Phage typability of coagulase-negative staphylococci in relation to antibiotic resistance". Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hygiene. I. Abteilung. Originalien. 16:235-246.
- RYDING J., ESPERSEN F., JARLØ J.O., ROSDAHL V.T. (1992). "Coagulase-negative staphylococci in a newborn with a cardiac vascular prosthesis". APMIS 100:246-248.
- RÖMLING U., GROTHUES D., HEUER T., TÜMMLER B. (1992). "Physical genome analysis of bacteria". Electrophoresis 13:626-631.
- ROSDAHL V.T., GRAHRN-HANSEN B., MØLLER J.H., KJAELDGAARD P. (1990). "Phage-typing of coagulase-negative staphylococci. Factors influencing typability". APMIS 98:299-304.
- ROSEMBACH F.J. (1884). Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Bergmann ed, Weisbaden. P.:1-122.
- RUPP M.E., GORDON L.A. (1994). "Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress". Clin. Inf. Dis. 19:231-245.
- SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N.A. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 230:1530-4.
- SCHAEFLER S. (1972). "Polyfunctional penicillinase plasmide in *Staphylococcus epidermidis*: bacteriophage restriction and modification mutants". J. Bacteriol. 112:697-706.
- SCHLEIFER K.H., 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., KLIPPER-BÄLZ R., 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., FISCHER U., FALLER A.H., ENDL J. (1982). "Identification of *Micrococcus candidus* ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of *Micrococcus caseolyticus* ATCC 29750 as members of a new species, *Staphylococcus caseolyticus*". Int. J. Syst. Bacteriol. 32:15-20.

SCHLEIFER K.H., KLOOS W.E. (1975a). "Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended description of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosum*". Int. J. Syst. Bacteriol., 25:50-61.

SCHLEIFER K.H., KLOOS W.E. (1975b). "A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci". J. Clin. Microbiol., 1:337-338.

SCHWARTZ D.C., CANTOR C.R. (1984). "Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis". Cell. 37:67-75.

SELANDER R.K., MUSSER J.M., CAUGANT D.A., GILMOUR M.N., WHITTAM T.S. (1986). "Population genetics of pathogenic bacteria". Microb. Pathog. 3:1-7.

SKERMAN V.B.D., Mc GOWAN V., SNEATH P.H.A. (1980). "Approved list of bacterial names". Int. J. Syst. Bacteriol., 30:225-240.

SKULNICK M. Y COLS. (1987). Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., abstr. n° c 103, p 340.

SMITH D.T., CONANT N.F., WILLET H.P. (1968). Zinsser Microbiology, 14 th ed., New York: Appleton-Century-Crofts, pp:169-170.

SMITH I.M., BEALS P.D., KINGSBURY K.R., HASENCLEVER N.F. (1958). "Observations on *Staphylococcus albus* septicemia in mice and men". Arch. Intern. Med. 103:375-388.

SMITH D.J., KAPLAN R.L., LANDAU W., TRENHOLME G.M. (1982). "Speciation and antibiotic susceptibility patterns of coagulase-negative staphylococci". Eur. J. Clin. Microbiol. 1:228-232.

SOMPOLINSKY D. (1953). "De Límpetigo 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., MALEK Z. (1985). "Encapsulation and capsular types in isolates of *S. aureus* from different sources and relationship to phage types". J. Clin. Microb. 22:828-834.

SOUTHERN E.M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.

SRAMOVA H., BARTONOVA A., BOLEK S., et al. (1984). "National prevalence survey of hospital-acquired infections in Czechoslovakia". J. Hosp. Infect. 11:328-334.

STEPHENSON J.R., CROOK S.J., TABAQCHALI S. (1986). "New methods for typing *S. aureus* resistant to methicillin based on sulphur-35 methionine labelled protein: its applications to an outbreak". Br. Med. J. 293:581-583.

STRUELENS M.J., DEPLANO A., MAAS A., SERRUYS E. (1990). "Plasmid profile, biotype and antibiotic resistance markers for the study of an outbreak of coagulase-negative staphylococci", en 2nd International Meeting on Bacterial Epidemiological Markers. Ascent Ltd., Atenas, p. 79.

SWANSTROM M., ADAMS., M.H. (1951). "Agar layer method for production of high titer phage stocks". Proc Soc. Exp. Biol. Med. 7:372-275.

TALBOT M.W., PARISI J.T. (1976). "Phage typing of *Staphylococcus epidermidis*". J. Clin. Microbiol. 3:519-523.

TANASUPAWAT S., HASHIMOTO Y., EZAKI T., KOZAKI M., KOMAGATAK (1992). "*Staphylococcus piscifermentans* sp. nov., from fermented fish in Thailand". Int. J. Syst. Bacteriol. 42:577-581.

TENOVER F.C., ARBEIT R.D., GOERING R.V., MICKELSEN P.A., MURRAY B.E., PERSING D.H., SWAMINATHA B. (1995) "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field electrophoresis: criteria for bacterial strain typing". J. clin. Microbiol. 1995:2233-2239.

- VALENTINE C.R., YANDLE S.H., MARIK F.J., EBRIGHT J.R., DAWSON M.S. (1988). "Evaluation of the variety of plasmid profiles in *Staphylococcus 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. WINKLER K.C. (1969). "Bacteriophage typing of coagulase-negative staphylococci". *J. Microbiol. Serol.* 35:232.
- VAN DENESCH F., LINA B., LEBEAU CH. GREENLAND T.B., ETIENNE J. (1993). "Epidemiological markers of coagulase-negative staphylococci". *Intens. Care Med.* 19:311-315
- VARALDO P.E., KILPPER-BÄLZ R., BIAVASCO F., SATTA G., SCHLEIFER K.H. (1988). "*Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38:436-439.
- VEACH L.A., PFALLER M.A., BARRET M., KOONTZ F.P., WENZEL R. (1990). "Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection". *J. Clin. Microb.* 28:2064-2068.
- VERHOEF J., VAN BOVEN C.P.A., WINKLER K.C. (1971). "Characters of phages from coagulase-negative staphylococci". *J. Med. Microbiol.* 4:413-424.
- VERHOEF J., VAN BOVEN C.P.A., WINKLER K.C. (1972). "Phagotyping of coagulase-negative staphylococci". *J. Med. Microbiol.* 5:9-19.
- WATTS J.L., OWENS W.E., NICKERSON S.C. (1986). "Evaluation of the Minitack gram-positive set for identification of staphylococci isolated from the bovine mammary gland". *J. Clin. Microbiol.* 23:873-875.

WEBSTER J., HUBNER R., COLE E., BRUCE J., BANNERMAN T., BALLARD D., KLOOS W. (1993). "The *Staphylococcus sciuri* species group described by *EcoRI* fragments containing ribosomal RNA sequences, with recognition of *Staphylococcus vitulus*" Microbiol. 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

WEINSTEIN M.P., RELLER L.B., MURPHY J.R., LICHTENSTEIN K.A. (1983). "The clinical significance of positive blood cultures: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I". Lab. and Epidem. Obser. 5:35-39.

WHITTAM T.S., OCHMAN H., SELANDER R.K. (1983). "Multilocus genetic structure in natural populations of *E. coli*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1751-1194.

WILSON T.S., STUART R.D. (1965). "*Staphylococcus albus* in wound infection and in septicemia". Can. Med. Assoc. J. 93:8-16.

WILLIAMS R.E.O., RIPPON J.E. (1952). "Bacteriophage typing of *S. aureus*". J. Hyg. Camb. 50:320-353.

WINSLOW C-E.A., ROTHBERG N., PARSONS E-I. (1920). "Notes on the classification of the white and orange staphylococci". J. Bacteriol., 5:145-168.

WINSLOW C-E.A., WINSLOW A.R. (1908). The sistematic relationships of the Coccaceae". John Wiley, Nueva York.

WOESE C.R. (1987). "Bacterial evolution". Microbiological Reviews. 51:221-71.

YOUNG L.S., MARTIN W.J., MEYER R.D., WEINSTEIN R.J., ANDERSON E.T. (1977). "Gram-negative bacteremia: microbiologic, immunologic and therapeutic considerations". Ann. Inter. Med. 86:456-471.

ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA J., GASZEWSKA-MASTALARZ A., LIS B., GAMIAN A., MORDARSKI M. (1995). "*Staphylococcus pulveri* sp. nov., isolated from human and animal specimens". Int. J. Syst. Bacteriol. 45:169-172.