

1. Título práctica de laboratorio:

IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS (GÉNEROS *Staphylococcus* spp. Y *Streptococcus* spp.)

Integrantes:

Código:

2. OBJETIVOS

General

Reconocer las principales características de los géneros *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. y los métodos de identificación en el laboratorio.

Específicos:

- Conocer el fundamento y realizar los procedimientos de laboratorio diseñados para diferenciar las principales especies de *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. patógenos humanos.
- Interpretar los resultados de las pruebas de identificación para especies de *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp.

3. REFERENTES CONCEPTUALES

Los cocos Gram positivos pertenecen a un grupo heterogéneo de bacterias cuya característica común es su forma esférica, su reacción frente a la tinción de Gram y la ausencia de endosporas. Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp, importantes en la clínica por alta prevalencia de aislamiento en muestras clínicas.

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia Staphylococcaceae. Son cocos Gram-positivos agrupados generalmente en forma de racimos de uva, mesófilos y anaerobios facultativos (1). Su distribución es amplia en la naturaleza, son comensales de humanos y animales, haciendo parte de la flora normal de la piel y mucosas del tracto respiratorio superior. La disrupción de la piel o membranas mucosas actúan como puerta de entrada en tejidos subyacentes (2).

Las tres especies más representativas del género *Staphylococcus* son: *S. aureus*, *S. saprophyticus* y

S. epidermidis, siendo generalmente no virulentas las dos últimas especies. Sin embargo *S. epidermidis* puede llegar a ser el agente etiológico de lesiones cutáneas, y enfermedades importantes como la endocarditis, y *S. saprophyticus* agente causal de infecciones del tracto urinario. *S. aureus* por su parte está implicado en la formación de abscesos purulentos y menos frecuentemente en el desarrollo de neumonías, osteomielitis, endocarditis, cistitis, pielonefritis, enteritis y septicemia (1, 2).

Las cepas de *S. aureus* producen una variedad de productos metabólicos, algunos de ellos implicados en su patogenicidad. Dentro del grupo que actúan como factores de virulencia se puede mencionar: La coagulasa (Ayuda a la formación del coágulo), la leucocidina (Lisis leucocitos), las hemolisinas (Lisan hemáties), la enterotoxina (Responsable de la gastroenteritis); y aquellos metabolitos que no tienen una naturaleza tóxica como DNasas, lipasas, gelatinasas y la estafilocinasas, pero que son importantes en funciones propias del metabolismo bacteriano (1-3).

Las principales pruebas de laboratorio para identificar cepas de *Staphylococcus* spp. Son:

- Catalasa: Es una enzima producida por algunas bacterias con el fin de neutralizar los efectos bactericidas del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), principalmente para evitar la formación de radicales tóxicos en las células fagocíticas. La enzima descompone el H_2O_2 en agua y oxígeno, lo cual se evidencia en el laboratorio por la formación rápida de burbujas. La prueba de la catalasa se emplea para diferenciar a cocos Gram positivos pertenecientes a las familias Staphylococcaceae y Micrococcaceae con la Streptococcaceae, siendo los dos primeros positivos. (1).
- Agar salado manitol: Es un medio selectivo para aquellos microorganismos que toleran las sales, tales como los estafilococos. Después de la incubación, las cepas típicas de *S. aureus* que degradan manitol (carbohidrato) muestran un halo amarillo que rodea su crecimiento. Las cepas no fermentadoras no mostrarán cambio de color en el medio (1).
- Prueba de la coagulasa: La producción de coagulasa es indicativa de cepas de *S. aureus*. Esta enzima convierte el fibrinógeno en fibrina, la fibrina forma una malla que rodea las células bacterianas o los tejidos infectados, protegiendo así a los microorganismos de los mecanismos de respuesta inespecíficos del hospedador. En el laboratorio, al poner en contacto una suspensión de *S. aureus* con plasma humano, éste es capaz de coagularlo luego de cuatro horas. Un resultado negativo (no formación de coágulo) es indicativo de una cepa no virulenta (1).
- Test de la DNasa: Generalmente los estafilococos coagulasa positivo también producen la enzima DNasa. Los microorganismos son sembrados en agar DNasa, después de la incubación, la actividad de la DNasa es determinada por la adición de ácido clorhídrico 1 ó 3N. Aquí el ADN hidrolizado presenta transparencia y el ADN polimerizado se precipita tornando el medio a un color opaco. La presencia de halo es indicativa de un resultado positivo y por lo tanto de la habilidad del microorganismo de producir Dnasa (1).
- Sensibilidad a la Novobiocina: Esta prueba es empleada para diferenciar *S. epidermidis* de *S. saprophyticus*. Para ello se requiere la inoculación masiva de los microorganismos a evaluar en agar sangre y la aplicación de un sensidisco de Novobiocina (5ug) en la superficie del agar. Después de la incubación, un diámetro mayor o igual a 16mm indica resistencia, y por tanto confirmación de *S. saprophyticus* (3).

Los géneros *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. y bacterias similares a *Streptococcus* spp. son bacterias Gram positivas que no poseen la enzima catalasa, proliferan generalmente en pares o en cadenas, son nutricionalmente exigentes y anaerobios facultativos. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, pueden formar parte de la microbiota normal humana (Tracto respiratorio alto, tracto intestinal, piel y mucosas), o ser responsables de un gran número de enfermedades infecciosas (1, 2).

La virulencia de los estreptococos se ha asociado con su habilidad de producir una amplia variedad de metabolitos extracelulares, como por ejemplo hemolisinas, leucocidinas (Destruyen fagocitos), toxinas eritrogénicas (Responsable de las erupciones), hialuronidasas (Factores de diseminación e hidrólisis el ácido hialurónico), estreptocinasas (Una fibrinolisisina) y nucleasas (Ribonucleasa y deoxiribonucleasa) (3).

La clasificación de los estreptococos se da bajo diversos principios (1):

- Reacción hemolítica en agar sangre
- Especificidad serológica según sus antígenos de superficie celular (Antígenos de Lancefield)
- Reacciones bioquímicas
- Resistencia a factores químicos y físicos
- Factores ecológicos
- Factores moleculares

Sin embargo, uno de los esquemas más útiles para la clasificación de los *Streptococcus* spp. se basa en la capacidad de producir lisis de los eritrocitos al cultivarse en agar sangre de cordero, siendo (1,3):

- Beta hemólisis: Se presenta como una zona clara, decolorada alrededor de la colonia por la destrucción total de los glóbulos rojos. Los estreptococos beta-hemolíticos están frecuentemente asociados con cepas patógenas.
- Alfa hemólisis: Es una destrucción parcial o incompleta de los glóbulos rojos debido a la acción del peróxido de hidrógeno, reduciendo la hemoglobina alrededor de la colonia y produciendo una coloración verde-marrón. Es característica de *Streptococcus viridans* y *Streptococcus pneumoniae*. *S. viridans* es un microorganismo usualmente no patogénico pero oportunista que puede producir endocarditis subaguda y *S. pneumoniae* es uno de los agentes etiológicos de la neumonía.
- Gamma hemólisis: No se produce hemólisis. Generalmente los estreptococos gamma hemolíticos no son virulentos.

Los *Streptococcus* spp. Alfa, Beta y Gamma hemolíticos pueden clasificarse en 20 grupos, basándose en la presencia de un hapteno antigénico grupo-específico denominado sustancia C, “CLASIFICACIÓN DE LANCEFIELD”, la cual implica a los miembros de los grupos A, B, C y D en procesos infecciosos (3).

Los estreptococos β -hemolíticos que pertenecen al grupo A, son generalmente aislados de la mucosa nasal y faríngea de personas tanto enfermas como sanas y en su mayoría pertenecen a la especie *Streptococcus pyogenes* (2). Pueden causar amigdalitis, bronconeumonía, erisipelas y celulitis; además pueden causar complicaciones como glomerulonefritis y fiebre reumática después de una infección estreptocócica no tratada o no completamente erradicada (3).

Los estreptococos del grupo B, son generalmente saprófitos del hombre (Pudiendo ser oportunistas). Se ubican generalmente en la rinofaringe, sistema intestinal y urogenital, su hemólisis es predominantemente de tipo Beta y en su mayoría pertenecen a la especie *Streptococcus agalactiae* (2), se han relacionado con fiebre puerperal, meningitis neonatal y endocarditis (3).

Los *Streptococcus* spp. del grupo D pueden ser Alfa, Gamma y en ocasiones Beta hemolíticos. Tradicionalmente han sido divididos en 2 grupos: Los Enterococos (*S. faecalis*, y *S. faecium*) y los No enterococos (*S. equinus* y *S. Bovis*), cuya diferencia se basa en la capacidad de los enterococos de crecer en presencia de cloruro de sodio al 6.5%. Sin embargo, en una reclasificación reciente de los estreptococos, basada en la hibridación de DNA, los enterococos fueron cambiados a un nuevo género, el de: Enterococcus (2), quienes pueden ser agentes etiológicos de infecciones urinarias y son por lo general resistentes a penicilina y vancomicina; los no enterococos tienen una menor importancia clínica (3).

La especie *Streptococcus pneumoniae* no se clasifica de la misma forma que el resto de los estreptococos constituyendo un grupo aparte. Son diplococos Gram positivos frecuentemente lanceolados, que a veces pueden estar organizados en cadenas cortas y poseen una cápsula de polisacáridos. Presenta alfa hemólisis al igual que el *Streptococcus viridans* pero su diferencia se basa en la prueba de sensibilidad a la optoquina, a la cual *Streptococcus pneumoniae* es sensible. Se encuentra en la flora nasofaríngea y orofaríngea normal en el 15% de los niños mayores de 5 años y del 5 al 40% de los adultos. Está implicado en el desarrollo de patologías como la sinusitis, neumonía, otitis, bronquitis y meningitis (1,2).

Los estreptococos del grupo viridans, incluyen varias especies α -hemolíticas y γ -hemolíticas, la mayoría de los cuales constituyen parte de la flora normal de vías respiratorias altas y aparato urogenital. Están implicados en el 30-40% de casos de endocarditis bacteriana subaguda (3).

Dentro de las pruebas de laboratorio disponibles para realizar diferenciación de cepas de *Streptococcus* spp. Encontramos (1):

- Susceptibilidad a la Bacitracina: La sensibilidad a bajas concentraciones del antibiótico bacitracina (0,04U), es un método sencillo para la identificación presuntiva de estreptococos β -hemolíticos de los grupos A y B. Los estreptococos del grupo A son sensibles a la bacitracina y los del grupo B son resistentes. La presencia de halo de inhibición (independientemente del diámetro) alrededor del disco indica sensibilidad. Esta prueba es útil para diferenciar estreptococos β -hemolíticos, ya que muchos estreptococos alfa-hemolíticos (Incluidos los neumococos) son sensibles a la bacitracina.
- Susceptibilidad a la Optoquina: El clorhidrato de etilhidrocupreína (Optoquina) a una concentración menor o igual a 5ug inhibe el desarrollo de *Streptococcus pneumoniae* mientras que

otros estreptococos no son inhibidos o presentan una zona pequeña de inhibición alrededor del disco. Un halo de inhibición de diámetro mayor o igual a 14mm es presuntivo para *Streptococcus pneumoniae*. Las zonas de inhibición inferiores a 14 mm de diámetro deben ser confirmadas por pruebas adicionales para *Streptococcus pneumoniae*, como la prueba de solubilidad en bilis.

- **Prueba de CAMP:** Los estreptococos del grupo B producen un péptido, denominado sustancia CAMP, que interactúa con la β -hemolisina producida por cepas de *Staphylococcus aureus*, produciendo un sinergismo de la hemólisis que resulta en una forma de flecha. Los otros estreptococos (No grupo B) no producen esta reacción.
- **Agar Bilis Esculina:** Permite la identificación del Género *Enterococcus* spp. Se basa en la capacidad de hidrolizar la esculina para producir dextrosa y esculetina, esta última reacciona con la sal férrica presente en el medio de cultivo y forma un complejo marrón oscuro-negro.
- **Crecimiento en 6,5% de cloruro de sodio:** Esta prueba se basa en la capacidad de los enterococos del grupo D de crecer en altas concentraciones de sales, lo que permite diferenciarlo de los estreptococos del grupo D no enterococos.

4. CONSULTA PREVIA

- ¿Para qué utilizan los estafilococos la proteína coagulasa, In Vivo?
- Explique tres enzimas involucradas en el proceso de patogenicidad de *S. aureus*.
- ¿El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en un medio con altos contenidos de sal, en que le favorece a la bacteria, encuentra alguna relación con su patogenicidad?
- ¿Cómo diferenciaría una cepa perteneciente a la familia Micrococcaceae de una Staphylococcaceae?
- ¿Cuál es la importancia médica de diferenciar entre NO Enterococos y Enterococos?
- Explique el fundamento de la prueba de CAMP, e indique para que se utiliza.
- Los estreptococos son microorganismos exigentes que requieren medios de enriquecimiento para su crecimiento, ¿Cuál es el medio de preferencia para el crecimiento de estos microorganismos y por qué?
- ¿Cuál es la importancia de la bacitracina y optoquina en los microorganismos? ¿Qué función cumplen?
- ¿Cuál es la importancia de la Nobociocina en la identificación de los microorganismos? ¿Qué función cumplen?
- Mencione los Estreptococos patógenos y tres no patógenos.

5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos (Grupo 3 o 4 de estudiantes)	Reactivos
1 caja <i>Staphylococcus aureus</i> 1 caja <i>Staphylococcus saprophyticus</i> 1 caja <i>Streptococcus viridans</i>	20ml Peróxido de hidrógeno H₂O₂ al 3% - Frasco gotero con 20ml decada

• 1 caja <i>Enterococcus faecalis</i> • 1 caja <i>Streptococcus agalactiae</i> • 1 caja <i>Staphylococcus epidermidis</i> • 1 caja de Agar salado Manitol • 1 caja de Agar Dnasa • 3 cajas Agar sangre • 3Tubos de 0,5mL c/u de Plasma humano • 3 tubos de caldo BHI suplementado con 6,5% de NaCl • 3Unid Sensidiscos de Bacitracina • 3Unid Sensidiscos de Optoquina • 3Unid Sensidiscos Novobiocina • 3unid Asas curvas • 1unid Pinzas relojero	colorante de Gram • Frasco gotero con 10mL de Aceite de inmersión
--	--

Materiales que debe traer el estudiante

- Elementos de bioseguridad
- Toallas desechables
- 1 Encendedor
- 1 Lápiz de cera o marcador indeleble Frasco de tinta china negra
- Lápices de colores

6. PROCEDIMIENTO

El laboratorio se dividirá en dos sesiones: Montaje y Lectura.

Se trabajará con las siguientes cepas: Cepa 1- *S. aureus*, Cepa 2- *S. epidermidis*, Cepa 3- *S. saprophyticus*, Cepa 4- *S. pyogenes*, Cepa 5- *S. agalactiae*, Cepa 6- *S. viridans*, Cepa 7- *Enterococcus faecalis*.

MONTAJE:

1. Prueba de la catalasa: Con ayuda de un asa microbiológica tome una pequeña cantidad de bacterias del cultivo primario y llévelas a una lámina portaobjetos que contenga una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, realice una emulsión bacteriana y observe.
2. Prueba de la fermentación de carbohidratos y tolerancia a las sales en Agar Salado Manitol (Para *Staphylococcus* spp.): Divida la placa de agar salado manitol en tres secciones e identifíquelas. Para cada microorganismo, asépticamente inocule haciendo una línea gruesa en forma de zigzag en su respectiva zona de inoculación.
3. Prueba de la DNasa (Para *Staphylococcus* spp.): Divida la placa de agar DNasa, en tres secciones e identifíquelas. Para cada microorganismo, asépticamente haga una línea gruesa de inoculación en su respectiva zona de inoculación. Incube a 37°C en aerobiosis, por 24 a 48 horas. Adicione ácido clorhídrico 1N para revelar los resultados, después de incubar la caja, al cubrir toda la superficie

de la placa de cultivo, deje en reposo 10 minutos y observe la formación o no del halo alrededor del cultivo bacteriano.

5. Prueba de la novobiocina (Para *Staphylococcus* spp.): Divida la placa de agar sangre en tres secciones e identifíquelas. Siembre masivamente la bacteria en cuestión, dejando aproximadamente 1mm a cada lado. Luego, en el centro de la superficie de cada zona de siembra ponga un sensidisco de Novobiocina con la ayuda de pinzas estériles.

6. Prueba de la coagulasa en tubo (Para *Staphylococcus* spp.): Tome una colonia o suspensión bacteriana, con ayuda de un asa microbiológica, emulsifique dentro de un tubo que contenga 0.5ml de plasma. Tape e incube el tubo a 37°C durante 4-18 horas, observe los resultados.

7. Producción de hemólisis (Para *Streptococcus* spp. y *Enterococcus faecalis*): Divida una placa de agar sangre en cuatro secciones e identifíquelas con las bacterias entregadas. Asépticamente, haga una estría gruesa para cada microorganismo en su respectiva zona de inoculación, dejando aproximadamente 1cm libre de bacteria en los bordes.

8. Prueba de sensibilidad a bacitracina y optoquina (Para *Streptococcus* spp.): Utilice una placa de agar sangre para la prueba de optoquina y otra para bacitracina. Divida cada placa de agar sangre en tres secciones e identifíquelas con las bacterias entregadas. Inocule las bacterias por siembra masiva y con ayuda de pinzas ponga el sensidisco correspondiente (Bacitracina u optoquina) en el centro de la siembra masiva, deje aproximadamente 1cm libre de bacteria en cada borde. Para *Streptococcus* alfa hemolíticos ponga Optoquina y para Beta hemolíticos Bacitracina.

9. Prueba de tolerancia al cloruro de sodio (Para *Enterococcus faecalis* y *S. viridans*): Inocule el caldo BHI o caldo nutritivo suplementado con 6.5% de NaCl, mezclando generosamente un poco de bacteria.

10. Hidrólisis de Esculina (Para *Enterococcus faecalis* y *S. viridans*): Divida una placa de agar sangre en tres secciones e identifíquelas. Asépticamente, siembre por estría gruesa cada microorganismo en su respectiva zona de inoculación, dejando aproximadamente 1cm libre de bacteria en los bordes.

11. Prueba de CAMP: Siembre una línea en que atraviese la caja de agar sangre por el centro con *S. aureus*, perpendicularmente realice una siembra en línea de *S. agalactiae* dejando un centímetro de separación entre las dos líneas.

Todos los tubos y cajas se deben incubar a 37°C en aerobiosis por 24 a 48 horas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Win W, et. al. Koneman Diagnóstico Microbiológico texto y atlas en color. 6 ED. Chapultepec Morales. Editorial Médica Panamericana. 2013
2. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 26 ED. New York. McGraw-Hill. 2013
3. Cappuccino J and Sherman N. Microbiology: a laboratory manual. 6 ED. San Francisco. Benjamin Cummings. 2001

INFORME DE LABORATORIO

Integrantes:

Código:

TABLA DE RESULTADOS (1.5/5.0)

Con los resultados obtenidos y observaciones durante el desarrollo de la práctica, complete las tablas de resultados (Tabla 1 y 2).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS (2.0/5.0)

Realice un análisis, correlacionando los resultados obtenidos y los conceptos teóricos que soportan la práctica. La discusión de resultados tiene un componente altamente teórico y es necesario que la información que soporte esta sección sea citada y verificada en función de utilizar las referencias pertinentes para el caso.

CONCLUSIONES (1.0/5.0)

Presente la conclusión en forma de un único párrafo en el que se incluya los hallazgos de la práctica con su respectiva justificación teórica, y las habilidades personales adquiridas durante el desarrollo del laboratorio como aporte al ejercicio profesional.

BIBLIOGRAFÍA (0.5/5.0)

Ingrese la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con la norma Vancouver

Tabla 1. Resultados para *Staphylococcus* spp.

Identificación de la bacteria:		
PRUEBA	RESULTADO	
Prueba de la catalasa	POSITIVA	NEGATIVA
Prueba de la Dnasa	POSITIVA	NEGATIVA
Prueba de la coagulasa	POSITIVA	NEGATIVA
Sensidisco de noboviocina	SENSIBLE	RESISTENTE
Degradación de Manitol	POSITIVA	NEGATIVA
Posible microorganismo identificado:		
Observaciones:		

Identificación de la bacteria:		
PRUEBA	RESULTADO	
Prueba de la catalasa	POSITIVA	NEGATIVA
Prueba de la Dnasa	POSITIVA	NEGATIVA
Prueba de la coagulasa	POSITIVA	NEGATIVA
Sensidisco de noboviocina	SENSIBLE	RESISTENTE
Degradación de Manitol	POSITIVA	NEGATIVA
Posible microorganismo identificado:		
Observaciones:		

Identificación de la bacteria:		
PRUEBA	RESULTADO	
Prueba de la catalasa	POSITIVA	NEGATIVA
Prueba de la Dnasa	POSITIVA	NEGATIVA
Prueba de la coagulasa	POSITIVA	NEGATIVA
Sensidisco de noboviocina	SENSIBLE	RESISTENTE
Degradación de Manitol	POSITIVA	NEGATIVA
Posible microorganismo identificado:		
Observaciones:		

Tabla 2. Resultados para *Streptococcus* spp.

Identificación de la bacteria:			
PRUEBA	RESULTADO		
Prueba de la catalasa	POSITIVA	NEGATIVA	
Tipo de Hemólisis	ALFA	GAMMA	BETA
Crecimiento en NaCl	POSITIVO	NEGATIVO	
Bacitracina	SENSIBLE	RESISTENTE	
Optoquina	SENSIBLE	RESISTENTE	
Hidrólisis de esculina	POSITIVO	NEGATIVO	
Posible microorganismo identificado:			
Observaciones:			

Identificación de la bacteria:			
PRUEBA	RESULTADO		
Prueba de la catalasa	POSITIVA	NEGATIVA	
Tipo de Hemólisis	ALFA	GAMMA	BETA
Crecimiento en NaCl	POSITIVO	NEGATIVO	
Bacitracina	SENSIBLE	RESISTENTE	
Optoquina	SENSIBLE	RESISTENTE	
Hidrólisis de esculina	POSITIVO	NEGATIVO	
Posible microorganismo identificado:			
Observaciones:			

Identificación de la bacteria:			
PRUEBA	RESULTADO		
Prueba de la catalasa	POSITIVA	NEGATIVA	
Tipo de Hemólisis	ALFA	GAMMA	BETA
Crecimiento en NaCl	POSITIVO	NEGATIVO	
Bacitracina	SENSIBLE	RESISTENTE	
Optoquina	SENSIBLE	RESISTENTE	
Hidrólisis de esculina	POSITIVO	NEGATIVO	
Posible microorganismo identificado:			
Observaciones:			

Identificación de la bacteria:			
PRUEBA	RESULTADO		
Prueba de la catalasa	POSITIVA	NEGATIVA	
Tipo de Hemólisis	ALFA	GAMMA	BETA
Crecimiento en NaCl	POSITIVO	NEGATIVO	
Bacitracina	SENSIBLE	RESISTENTE	
Optoquina	SENSIBLE	RESISTENTE	
Hidrólisis de esculina	POSITIVO	NEGATIVO	
Posible microorganismo identificado:			
Observaciones:			