



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE *Staphylococcus* COAGULASA
NEGATIVA AISLADOS DEL TRACTO GENITAL MASCULINO**

Trabajo de Grado para optar al título de Licenciadas en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Br. Mendoza León Evelin Karelis

C.I. 20.847.878

Br. Suárez Calderón Hanggy Zulay

C.I. 20.849.850

Tutora:

Dra. Judith Velasco Carrillo

Mérida, Mayo 2.018

DEDICATORIA

A Dios, por habernos dado la fortaleza, sabiduría y perseverancia para alcanzar esta meta y así poder culminar nuestra carrera.

A nuestros abuelos y padres, porque ellos siempre estuvieron a nuestro lado brindándonos su apoyo y sus consejos para hacer de nosotras mejores personas, este triunfo es de ustedes.

A nuestros hijos, por ser nuestra gran motivación para ser cada día mejor y que esto sirva como ejemplo de que si se pueden alcanzar las metas.

A nuestros familiares y amigos, por haber estado presentes y apoyándonos cuando el camino se hacía difícil.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por protegernos durante todo nuestro camino y darnos fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda la carrera.

A nuestros abuelos y padres, por habernos proporcionado la mejor educación, lecciones de vida y enseñado que con esfuerzo, trabajo y dedicación todo se consigue.

A nuestros hijos, por impulsarnos a luchar cada día para culminar la carrera y demostrarle que lo imposible es posible de lograr.

A nuestros familiares y amigos, por alentarnos a seguir adelante en la realización de este proyecto de investigación.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, por haber aceptado que seamos parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar esta hermosa profesión, así como también a nuestros profesores por sus conocimientos y apoyo brindado para seguir adelante día a día.

A nuestra tutora, Judith Velasco, por habernos brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también habernos tenido toda la paciencia del mundo para guiarnos durante el desarrollo de la tesis.

A todos aquellos que de una u otra forma nos apoyaron para alcanzar esta meta.

¡Muchas Gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación de la Investigación	6
Objetivos de la Investigación	8
Objetivo General	8
Objetivos Específicos	8
Alcances y Limitaciones de la Investigación	8
CAPÍTULO II. MARCO TÉCNICO	9
Trabajos Previos	10
Antecedentes Históricos	13
Antecedentes Teóricos	17
Género <i>Staphylococcus</i>	17
Características morfológicas	17
Patogenia	18
Identificación	21
Métodos de Diagnóstico Microbiológico	22
Pruebas Bioquímicas	22
Actividad de las fosfatasa	23
L-pirrolidonil-B-naftilamida (PYR)	23
Prueba de la ureasa	23
Susceptibilidad a la novobiocina	24
Ornitina descarboxilasa (ODC)	24
Sistemas Comerciales	24

El Sistema de Galería API	25
Factores de Virulencia	25
Antibióticos	26
β -lactámicos	27
Penicilinas	28
Cefalosporinas	28
Inhibidores de las β -Lactamasas	28
Macrólidos y Lincosamidas	29
Quinolonas	30
Aminoglucósidos	30
Glucopéptidos	30
Resistencia Antimicrobiana	31
Resistencia a las penicilinas por producción de betalactamasa	32
Resistencia a la meticilina (oxacilina): homogénea y heterogénea	33
Resistencia a los macrólidos y a la clindamicina	34
Definición de Términos	36
HIPÓTESIS	37
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
Tipo de Investigación	38
Población y Muestra	38
Sistema de Variables	39
Identificación	39
Cepas bacterianas	39
Reactivación de cepas bacterianas	39
Identificación de los Aislados Clínicos	40
Determinación de la sensibilidad de los aislados clínicos de SCN a los antimicrobianos	42
Detección fenotípica de mecanismos de resistencia bacteriana	43

Mecanismos de Resistencia a Betalactámicos	43
Resistencia a penicilinas por producción de penicilinasa	43
Resistencia a penicilinas estables a penicilinasas (oxacilina/meticilina)	44
Mecanismos de Resistencia a Macrólidos, Lincosaminas y Streptograminas B (MLS _B)	44
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
Resultados	46
Discusión	50
CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
Conclusiones	56
Recomendaciones	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág.
1. Resultado de las pruebas positivas y negativas para el sistema comercial API® STAPH (BioMérieux)	41
2. Ejemplo de la hoja de resultados de un sistema API®	41
3. Técnica de difusión en agar con los discos de eritromicina y clindamicina para la detección fenotípica de resistencia inducible a las Lincosaminas (FenotipoIMLSB).	45

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág.
1. Características generales de algunas de las especies de SCN de importancia clínica.	19
2. Identificación a nivel de especies de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa que causan infecciones del Tracto Genitourinario e Infecciones del Tracto Genital Masculino.	46
3. Antibiotipos obtenidos a partir de los aislados clínicos de SCN en el tracto reproductor masculino frente a los agentes antimicrobianos.	47
4. Perfil de resistencia de los aislados clínicos de SCN en tracto reproductor masculino frente a los agentes antimicrobianos.	48
5. Patrones de susceptibilidad de los aislados clínicos de SCN del tracto reproductor masculino frente a los diferentes agentes antimicrobianos.	49

www.bdigital.ula.ve



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVA (SCN) AISLADOS A PARTIR DEL TRACTO REPRODUCTOR MASCULINO

Trabajo de Grado para optar al título de Licenciadas en Bioanálisis

Autoras: Br. Mendoza León Evelin Karelis.

Br. Suárez Calderón Hanggy Zulay.

Tutora: Dra. Judith Velasco Carrillo.

RESUMEN

Los *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) forman parte de la microbiota habitual del tracto genital masculino, su presencia en semen puede deberse a contaminación o colonización. Esta situación genera incertidumbre sobre la importancia de SCN asociado a la fertilidad y sobre el tratamiento de la infección, lo cual podría empeorar el estado de infertilidad. En este sentido, se consideró relevante identificar a nivel de especie nueve aislados clínicos de SCN de pacientes que acudieron a consulta en el Centro de diagnóstico de infertilidad y enfermedades ginecológicas (CEDIEG) "Dr. Giovanni Vivas-Acevedo" por problemas de fertilidad y determinar su perfil de susceptibilidad frente a los antimicrobianos, con detección fenotípica de mecanismos de resistencia. La identificación se realizó mediante el sistema comercial API Staph (Biomirux®), obteniéndose como resultado cinco especies, entre las que destaca *S. epidermidis* con mayor frecuencia (4/9), seguida de *S. caprae* (2/9), *S. haemolyticus* (1/9), *S. lugdunensis* (1/9) y *S. schleiferi* (1/9). El antibiograma interpretado arrojó nueve antibiotipos, en su mayoría resistentes a la Penicilina (88,8%), cuatro aislados (44,44%) expresaron el gen *mecA* que media la resistencia a la Oxacilina, y solo un aislado (11,1%) expresó resistencia inducible a la Clindamicina (fenotipo iMLS_B). Se concluye que la especie más frecuente asociado a patología en el hombre es *S. epidermidis*, que se debe realizar el antibiograma interpretado para evitar fallas terapéuticas debido a la expresión de mecanismos de resistencia y mantener la vigilancia epidemiológica.

Palabras claves: *Staphylococcus* coagulasa negativa, *S. epidermidis*, Tracto Reproductor, Pruebas de Susceptibilidad.

INTRODUCCIÓN

El grupo de *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) se encuentran entre los microorganismos más frecuentemente aislados en el laboratorio de microbiología. Sin embargo, su significado clínico en muchas situaciones es difícil de establecer, pues pueden ser comensales inofensivos o patógenos invasores. El protagonismo de este grupo de bacterias como patógeno ha ido en aumento y se los ha asociado con el progreso de la tecnología médica (Koneman E. y col., 2008; Tan T. y col., 2006; Aldea Mansilla y col., 2006; Cunha My col., 2006).

Las especies de SCN se han reportado como agentes etiológicos de bacteriemias relacionadas a catéteres, peritonitis asociadas a contaminación del catéter, infecciones en válvulas derivativas ventrículo-atriales o ventrículo-peritoneales, endocarditis de válvulas protésicas y nativas, infecciones asociadas al empleo de otros dispositivos protésicos, abscesos superficiales, infecciones en piel y tejidos blandos, infecciones oftalmológicas post-quirúrgicas e infecciones urinarias (Tan T. y col., 2006; Cunha M. y col., 2006).

El comportamiento de los SCN frente a los diversos agentes antimicrobianos, ha generado una expectativa a nivel mundial, debido al incremento de la resistencia a las penicilinas resistentes a penicilinasas (Oxacilina o Meticilina) y a los glucopéptidos (Dikiema y col., 2001; Taconelli y col., 2001), limitando cada día las opciones terapéuticas empleadas contra estas bacterias.

La infección genital es la principal causa de infertilidad en el mundo, no sólo en patología tubárica, sino que afecta también cada una de las diversas partes de la anatomía genital, tanto masculina como femenina. Varios estudios sugieren que uno o más agentes infecciosos en el tracto genitourinario podrían estar asociados con la infertilidad masculina (Rewy et al., 2002).

Las patologías asociadas a infertilidad masculina son muy variadas, siendo las más frecuentes el varicocele, las infecciones de testículos y vía

seminal y los procesos de autoinmunidad con producción de anticuerpos antiespermáticos (Lozano y col. 2012).

Las infecciones del tracto reproductivo masculino se pueden clasificar en tres tipos: 1) las infecciones de transmisión sexual, 2) las infecciones del tracto urinario, debido a que ambos tractos, genital y urinario, comparten varias porciones anatómicas, y 3) las infecciones asociadas a desequilibrios en la microbiota bacteriana. Un gran número de bacterias puede colonizar el tracto reproductivo masculino y desencadenar procesos infecciosos con múltiples consecuencias. Este tipo de infecciones se caracterizan por ser comunes pero generalmente autolimitadas y en la gran mayoría de los casos asintomáticos, lo que le da el carácter de infección crónica acompañada en algunas ocasiones de inflamación persistente, que puede finalmente generar alteraciones en la fertilidad. Estas alteraciones pueden desarrollarse bien sea por daño directo de la célula espermática o de su nicho, o como vehículo para el ascenso de un gran número de microorganismos en el tracto reproductivo lo que promoverá procesos infecciosos e inflamatorios (Dujle GR, 2000).

Diversos organismos se han identificado en el semen de hombres infértiles donde se destacan *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Neisseria gonorrhoeae*, entre otros. Sin embargo la presencia de *Staphylococcus* o *Streptococcus* sigue generando dudas en relación a la patogenicidad, ya que su presencia en semen puede deberse a contaminación o colonización (Keck y col. 2002). Esta situación genera incertidumbre sobre la importancia de SCN asociado a la infertilidad y sobre el tratamiento de la infección, lo cual podría empeorar el estado de infertilidad. En este sentido, se considera relevante conocer las características fenotípicas de los aislados clínicos de especies del grupo SCN de pacientes que acudieron a consulta en el Centro de diagnóstico de infertilidad y enfermedades ginecológicas CEDIEG “Dr.

Giovanny Vivas-Acevedo” por problemas de fertilidad y determinar su perfil de susceptibilidad frente a los antimicrobianos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Las infecciones del tracto urinario son producidas generalmente por bacterias y en menor proporción por hongos y virus. Estudios recientes han comprobado que un porcentaje de las infecciones del tracto urinario son producidas por bacterias del grupo SCN, posibles causantes de infertilidad en hombres (Pigrau y cols., 2002; Hooton, 2000).

La infertilidad masculina afecta alrededor del 35% al 45% de las parejas, la cual puede deberse a patologías urológicas, congénitas, de función sexual, traumáticas, inmunológicas, genéticas, neurológicas, tumorales, idiopáticas o infecciosas, además se destacan los agentes externos como los ambientales y tóxicos (Teppa & Palacios, 2004).

En relación a la etiología infecciosa, diversos estudios señalan que existen bacterias que tienen efectos deletéreos en el tracto reproductor masculino y que afectan la calidad seminal. En muestras espermáticas de hombres con problemas de infertilidad se han encontrado especies como: *Streptococcus*, *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN), *Staphylococcus aureus*, diferentes especies de coliformes, *Corynebacterium*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Ureaplasma urealyticum*, entre otros (Teppa & Palacios, 2004; Abeysundara y cols., 2013).

Los SCN son microorganismos que forman parte de la microbiota habitual del tracto reproductor masculino, se han aislado frecuentemente en cultivos espermáticos cuando las muestras de semen son pretratadas (remoción de agentes bacteriostáticos), lo cual despierta interés en su estudio para poder precisar si su presencia en cultivos de muestras anormales de semen se debe a contaminación, infección o colonización. (Koneman, 2008).

Dentro del grupo de los SCN como *S. epidermidis* y *S. capitis* son los principales responsables de las infecciones del tracto reproductor masculino, ya que poseen una serie de factores de virulencia: adherencia, toxinas y polipéptidos implicados en su patogenicidad, como por ejemplo las enterotoxinas, la hemolisina, y las leucocidinas. Existe una importante relación entre la bacteriospermia y el daño a nivel espermático, causando un incremento en espermatozoides no móviles, daño morfológico y vitalidad espermática (Abeysundara y cols., 2013; Galarzo y cols 2015).

Los SCN constituyen un grupo heterogéneo de especies con importancia clínica creciente como patógenos oportunistas. La presencia de estos microorganismos como microbiota habitual de piel y mucosa, hace que sean contaminantes frecuentes en cultivos bacteriológicos, es por esta razón que su aislamiento en muestras habitualmente estériles representa un problema al momento de establecer la importancia etiológica en ciertas infecciones (Ruíz & Guillén, 2006).

La prevalencia de SCN ha sido reportada por varios autores como una de las bacterias más importantes aisladas en muestras de semen. Rodin y cols. (2003) en Estados Unidos describen que uno de los tres aislados bacterianos más comunes en espermocultivos son especies de SCN.

La prueba más importante que se realiza para la identificación de SCN lo constituye la prueba de la coagulasa, la cual es muy práctica y sencilla de realizar en los laboratorios microbiológicos. El diagnóstico de este microorganismo ha evolucionado marcadamente y varios son los métodos que pueden realizarse para tales fines como son: el ensayo de la coagulasa en tubo, ensayo en lámina, el ensayo de la nucleasa termoestable, el empleo de látex, y por último, el desarrollo de sistemas inmunoenzimáticos (ELISA). (Llop A. y col., 2001; Colque-Navarro P. y col., 2000; Haefliger J. y col 2001).

Se han descrito varios esquemas para la identificación a nivel de especie del grupo de SCN, sin embargo, la prueba rápida galería API Staph (Biomerux), que cuenta con 20 sustratos y la lectura de 20 pruebas metabólicas, sigue siendo la más práctica. (Murray y Cols. 2003)

El comportamiento de SCN frente a los diversos agentes antimicrobianos, ha generado una gran expectativa a nivel mundial, debido al incremento de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos tales como la producción de penicilinasas, expresión del gen *mecA* (metecilina/oxacilina) y resistencia inducible a macrólidos, lincosamidas y estreptogaminas B (MLS_B) y a los glucopéptidos (Diekeman, 1997; Taconelli, 2003).

En atención a lo anteriormente expuesto surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son las especies más frecuentes de SCN aisladas del tracto genital masculino asociado a problemas de fertilidad, basadas en sus características fenotípicas y cuál es su patrón de susceptibilidad?

Justificación de la Investigación

Un gran número de bacterias pueden colonizar el tracto reproductivo masculino y desencadenar procesos infecciosos con múltiples consecuencias. Este tipo de infecciones se caracterizan por ser comunes pero generalmente autolimitadas y en la gran mayoría de los casos asintomáticos, lo que le da el carácter de infección crónica acompañada en algunas ocasiones de inflamación persistente, que puede finalmente generar alteraciones en la fertilidad. (Dohle GR, 2003).

La infertilidad masculina y las infecciones del tracto urinario son una entidad médica frecuente que compromete aproximadamente a uno de cada 20 hombres y en la que las infecciones del tracto reproductivo son consideradas como la principal causa etiológica (Lu y cols., 2013). Entre el 5 y el 12% de pacientes atendidos en las clínicas de infertilidad que cursan con procesos inflamatorios relacionados con infecciones, se ha reportado daño en la calidad espermática con reducción de la movilidad, la concentración y la morfología espermática, e incluso se ha encontrado

la presencia de anticuerpos antiespermáticos en el 8% de esta población. (Andrade-Rocha., 2003).

La importancia que ha adquirido el grupo de *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) como agentes de infecciones, ha estimulado el desarrollo de nuevos sistemas capaces de identificar rápidamente esos organismos hasta el nivel de especie. Además de identificar el perfil de susceptibilidad del microorganismo, para la aplicación adecuada del tratamiento.

La correcta identificación a nivel de especie de SCN permite también inferir sobre el perfil de sensibilidad, considerando que aún queda bastante por estandarizar con respecto a los mejores y más simples métodos de detección de resistencia a oxacilina, glucopéptidos, entre otros., y a los puntos de corte de sensibilidad y resistencia en las distintas especies, diferentes de *S. epidermidis* (Pedrari, 1991; Corso, 2004; CLSI, 2017).

Los laboratorios de microbiología deben elaborar y realizar un proceso de identificación normalizado en su actividad diaria, que utilice de forma secuencial o simultánea un conjunto de pruebas cuyo propósito final sea la identificación del microorganismo a nivel de género y especie y que incluya la mayoría de las bacterias desde el punto de vista infeccioso.

La importancia que ha tomado el grupo de *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) como agentes de infecciones genitales, en algunos casos responsables de producir infertilidad ha estimulado a la investigación del siguiente trabajo, que se realizará con la finalidad de estudiar las características fenotípicas de SCN aisladas del tracto reproductor masculino, el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos β -lactámicos (Penicilinasas, gen *mecA* (oxacilina/meticilina), resistencia inducible a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B) (Eritromicina, clindamicina), trimetoprim sulfametoxazol, tetraciclina y ciprofloxacina.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar las características fenotípicas y perfil de susceptibilidad de aislados clínicos de *Staphylococcus* Coagulasa Negativa asociado a infecciones del tracto reproductor masculino relacionadas a fertilidad.

Objetivos Específicos

- Identificar a nivel de especie los aislados clínicos de SCN, mediante el sistema comercial API-Staph.
- Evaluar las infecciones del tracto reproductor masculino ocasionado por SCN relacionado con problemas de fertilidad en el hombre.
- Determinar el patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislados clínicos de SCN mediante el método de difusión en agar con discos (Kirby Bauer).

Determinar de manera fenotípica la expresión de mecanismos de resistencia a los β -lactámicos: síntesis de penicilinasas y expresión del gen *mecA*, además la resistencia inducible a los Macrólidos, Lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B).

Alcances y Limitaciones de la Investigación

De acuerdo a los resultados de esta investigación se podría dilucidar la importancia de los SCN asociado a procesos de infertilidad. Las principales limitaciones para realizar la investigación son la escasez de reactivos y las escasas investigaciones realizadas en Venezuela en

cuanto a SCN en cultivos espermáticos, ya que la mayoría de los especialistas en el área al aislarlos en este tipo de muestra lo consideran como un contaminante y no como agente infeccioso. Sin embargo, estas limitaciones no impiden el inicio y desarrollo de la investigación, por lo tanto, el proyecto es viable.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Maleygua Álvarez, Elsa Velazco, Beatriz Nieves, Evelyn Alviáres, María Araque, Elsa Salazar, Betty Gutiérrez. (2008). Caracterización fenotípica de SCN aisladas de infecciones nosocomiales en neonatos. El estudio comprendió 32 cepas de SCN aisladas de neonatos con infección nosocomial en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Mérida, Venezuela; durante el período diciembre 1997-Abril 1999. El objetivo general de este estudio fue caracterizar fenotípicamente las cepas de SCN. Los resultados muestran que el aislamiento de SCN fue de 47,37%. El 78,1% de las cepas estudiadas se aislaron de neonatos con lactemia. Las especies más frecuentes fueron *S. epidermidis* (6,9%), y *S. warneri* (34,4%). Todas las cepas evaluadas mostraron resistencia a la penicilina y en un 18,8% de ellas mediada por la producción de β -lactamasa. El 68,8% de las cepas fueron resistentes a oxacilina y el 78,1% a gentamicina. La mayoría de las cepas resistentes a oxacilina mostraron valores de CIM g/mL mayores de 0.5 μ g/mL sólo una cepa mostró un calor de CIM \leq 0.25 μ g/mL, y se detectó la presencia de la PBP2a. Ninguna de las cepas fueron hiperproductoras de β -lactamasa. Se observó una excelente actividad de la vancomicina y quinupristin-dalfopristin sobre todas las cepas SCN evaluadas. Debido al papel que tienen los SCN en la UARN del IAHULA, es necesario extremar las medidas de asepsia durante los procedimientos de diagnóstico y terapéuticos invasivos, con el propósito de evitar las infecciones causadas por este grupo de microorganismos.

Erika García, Pahola Ibarra (2012). Comportamiento de SCN en la unidad de cuidados intensivos pediátrica y neonatal del Hospital Militar

Central de Bogotá entre Enero del 2009 y Julio 2011. Las muestras fueron recolectadas en pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos neonatal y pediátrica del hospital militar central, Bogotá, Colombia, con el objetivo de determinar la importancia de los SCN aislados de los pacientes que ingresaron a la unidad de cuidados intensivos neonatal y pediátrica del hospital militar central, revisando su caracterización, comportamiento y perfil de resistencia. El tipo de investigación empleada es experimental para la elaboración del presente estudio. Se revisaron las historias clínicas y se extrajeron los datos, de acuerdo con la variable requerida, finalmente se realizó un análisis estadístico con los datos obtenidos en el programa Microsoft Excel para MAC 2008. Obteniendo como resultado que se identificaron los datos completos de 32 pacientes, 17 se clasificaron como neonatos y 15 como pacientes en edad pediátrica. De los 32 pacientes el 84,3% de los aislados correspondió a *S. epidermidis* los demás se considerarían como colonización-contaminación.

Jennifer Puerta Suárez, Mariluz Giraldo, Angela Cadavid, Walter Carolina Maya (2014). Infecciones bacterianas de tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. Las muestras fueron recolectadas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. El estudio se realizó con el objetivo general de describir las bacterias involucradas en la alteración de la función reproductiva y sus efectos sobre la calidad espermática, así como la capacidad de los espermatozoides para transportar las infecciones y diseminaciones al trato reproductivo femenino. El tipo de investigación empleada para este estudio es documental. Al respecto, clasifican las infecciones bacterianas que afectan el tracto reproductivo masculino en: infecciones de transmisión sexual, del tracto urinario y las asociadas a la microbiota bacteriana. Donde están implicadas una gran variedad de agentes etiológicos como *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Escherichia coli* y los *Staphylococcus coagulasa* negativa. Aún es controversial el efecto de estos gérmenes sobre los parámetros seminales así como la presencia de microbiota en el semen;

su diagnóstico depende de la calidad de la muestra, de la sensibilidad de la técnica de detección y de los factores de riesgo que presente el individuo. Finalmente concluyen que los procesos inflamatorios e infecciosos en el trato reproductivo masculino influyen en la fertilidad, por lo que se requiere profundizar en el estudio de estos procesos, establecer más y mejores métodos diagnósticos y pautas para el autocuidado que disminuyan la propagación de estos agentes patógenos.

Ricardo Lozano Hernández, Judith Velasco, Rodríguez Maythe (2017). Impacto de los *Staphylococcus* coagulasa negativa y otros gérmenes en las formas espermáticas. En este estudio se analizaron 281 muestras de semen pertenecientes a hombres infértiles; estos hombres fueron atendidos en el Centro de Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades ginecológicas "Dr. Giovanni Vivas-Acevedo"(CEDIEG), en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. En este estudio, se compara la morfología del espermatozoide mediante el manual de la OMS y el criterio de David modificado en hombres infértiles, con presencia de SCN y otros gérmenes presentes en diferentes concentraciones. Se observaron en los diferentes grupos con resultados de cultivos negativos, microbiota residente, y otros microorganismos con concentraciones $\geq 10^4$ Ufc/mL incluyendo SCN así como muestras con anticuerpos anti*Chlamydia trachomatis*. Las cabezas alargadas se elevan en dos puntos positivos, como son: grupos de especies bacterianas y en la microbiota del grupo. Los defectos de cola se encuentran en los grupos SCN, *C. trachomatis*, *Enterobacter* spp. y *Enterococcus* spp. Las características de los espermatozoides se analizaron en relación con la concentración bacteriana expresada en Ufc/mL para todos los cultivos positivos independientemente de las especies encontradas. Cuatro grupos fueron categorizados: Negativo, $\leq 10^3$ (Microbiota residente), 10^4 y $\geq 10^5$ Ufc/mL. Los altos valores de células redondas se encontraron en muestras con concentraciones bacterianas iguales a o mayor que 10^4 Ufc/mL ($p \leq 0.005$). Usando el criterio morfológico de David, la microcefalia aumenta cuando las concentraciones bacterianas

están por encima de 10^4 Ufc/mL independientemente de la especie bacteriana ($p \leq 0.05$). Alteraciones principales se observaron en el flagelo anormal ($p \leq 0.05$), defectos de cola: doblez, ausente, enrollado, corto, múltiple ($p \leq 0.05$), irregular y citoplasma residual anormal ($p \leq 0.05$) cuando las concentraciones bacterianas fueron superiores a 10^5 Ufc/mL.

Concluyendo

que el predominio de una forma anormal se debe informar en las evaluaciones seminales, incluso con formas normales $\geq 4\%$. La alta concentración de SCN en el semen puede tener un impacto negativo en la celularidad, la morfología de los espermatozoides y probablemente en fertilidad. En el estudio del semen del hombre infértil, sería muy útil describir las alteraciones morfológicas de la cabeza del espermatozoide según lo indicado por el criterio morfológico de David como datos adicionales para identificar la causa de la infertilidad.

www.bdigital.ula.ve

Anecedentes Históricos

Los estafilococos son cocos grampositivos dispuestos en pares, tétradas, cadenas cortas y racimos (del griego *staphyle*, racimo de uvas). Fue Robert Koch en 1878 el primero en describir estafilococos en pus humano. En 1880 Luis Pasteur los cultivó en medio líquido, en 1882 Sir William Ogston demostró su patogenicidad en ratón y cobayo, y en 1884 se produjo el primer intento taxonómico por parte de Rosenbach, quien describió dos especies: *Staphylococcus aureus*, así denominada por el pigmento amarillo-dorado de sus colonias, y *Staphylococcus albus*, que formaba colonias de color blanco-yesoso. En 1930 Julianelle introdujo la primera clasificación basada en las características antigénicas del género y en 1942 Fisk desarrolló un método de tipificación por bacteriófagos. Pero no fue sino hasta fines de la década del 60 y principios del 70 que los trabajos de G. Pulverer comenzaron a mostrar el carácter de patógenos oportunistas de los SCN, y finalmente en la década del 70 los

múltiples trabajos de Wesley E., Kloos y Karl H. Schleifer dieron un vuelco definitivo en esta materia y pusieron orden en la compleja taxonomía de este grupo, al describir las numerosas especies que aún hoy reconocemos (Kloos, 1975; Pulverer, 2003).

Los SCN son un grupo de microorganismos muy heterogéneo y complejo, al que año tras año se van agregando especies nuevas e, inclusive, nuevos fenotipos de especies ya conocidas. Tal es el caso de la primera cepa de *S. epidermidis* anaerobia estricta, descrita por Rowlinson *et al.*, aislada de una infección de prótesis de cadera en cultivo puro, caracterizada bioquímicamente y confirmada por estudios de secuenciación de los genes 16S ARNr y *rpoB*, que codifica la fracción altamente conservada de la subunidad “b” de la ARN polimerasa. La cepa presentó ciertas características bioquímicas muy poco compatibles con una bacteria anaerobia estricta, como ser catalasa positiva, metronidazol y penicilina resistente (Rowlinson *et al.*, 2006).

Las infecciones por SCN continúan siendo un desafío diagnóstico para microbiólogos, clínicos e infectólogos. Son microorganismos que actúan silenciosa y lentamente, pero con firmeza y virulencia. La correcta interpretación de los hallazgos en el laboratorio y la adecuada valoración del cuadro clínico epidemiológico, muchas veces crónico, permiten evitar las consecuencias devastadoras en cuanto a morbilidad y hasta mortalidad en las infecciones más graves. Queda mucho por hacer, por ejemplo, con respecto a la interacción huésped microorganismos o a la identificación y expresión de factores de virulencia, sobre todo en especies diferentes de *S. epidermidis*. Es necesario profundizar en el conocimiento de la biodiversidad entre especies y lograr estandarizar las pruebas de sensibilidad para cada una de ellas con parámetros confiables, formular nuevos y mejores antimicrobianos y prestar especial atención al campo de la prevención.

Se los reconoce primariamente asociados a infecciones nosocomiales con cepas de la propia flora (infecciones endógenas) o provenientes del personal de salud (contaminación exógena) en pacientes

inmunocomprometidos o debilitados y en neonatos, con la excepción de la mayoría de los episodios de endocarditis de válvula protésica que se manifiestan luego del primer año del implante, algunos episodios de peritonitis en diálisis peritoneal y de las infecciones urinarias causadas por *S. saprophyticus*, en mujeres jóvenes sexualmente activas. Por otra parte, las infecciones nosocomiales endógenas o exógenas suelen ser con cepas no solamente resistentes a la meticilina sino multirresistentes. Las especies más frecuentemente involucradas en patología humana son: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, que en conjunto alcanzan hasta el 80% de los casos; el resto se debe a *S. lugdunensis*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis* subsp. *urealyticus*, *S. auricularis*, *S. cohnii* subsp. *urealyticum* y otros. (Mansilla, 2006; Kloos, 1994; Tan, 2006).

Por otra parte, las infecciones del tracto reproductivo masculino se pueden clasificar en tres tipos: 1) las infecciones de transmisión sexual, 2) las infecciones del tracto urinario, debido a que ambos trectos, genital y urinario, comparten varias porciones anatómicas, y 3) las infecciones asociadas a desequilibrios en la microbiota bacteriana. Un gran número de bacterias puede colonizar el tracto reproductivo masculino y desencadenar procesos infecciosos con múltiples consecuencias. Este tipo de infecciones se caracterizan por ser comunes pero generalmente autolimitadas y en la gran mayoría de los casos asintomáticos, lo que le da el carácter de infección crónica acompañada en algunas ocasiones de inflamación persistente, que puede finalmente generar alteraciones en la fertilidad. Estas alteraciones pueden desarrollarse bien sea por daño directo de la célula espermática o de su nicho, o como vehículo para el ascenso de un gran número de microorganismos en el tracto reproductivo femenino lo que promovería procesos infecciosos e inflamatorios como es el caso de la enfermedad inflamatoria pélvica. (Dohle GR. 2003).

Algunos sitios anatómicos presentan un recubrimiento especial con bacterias conocidos como microorganismos saprófitos, los cuales se aprovechan de los nutrientes que les proporciona el hospedero sin

causarle daño alguno; estos microorganismos actúan por inhibición competitiva y ocupación de un sitio anatómico determinado en los cuales generalmente impiden la colonización por otros microorganismos patógenos que puedan alterar la arquitectura e integridad de los epitelios, sin embargo cuando hay alteraciones en el organismo, como las generadas por los cambios hormonales durante el ciclo menstrual femenino o la alteración en la cantidad de microorganismos ocupando un sitio anatómico por la escasez de nutrientes, la relación microorganismo – humano puede tornarse de mutualista a parasitaria, desencadenando en algunas ocasiones procesos infecciosos, como es el caso de la vaginosis bacteriana causada por *Gardnerella vaginalis* debido al desequilibrio en la microbiota de la vagina por una disminución de *Lactobacillus* spp. (Srinivasan et al., 2010). Un ejemplo de esta relación la establecen los cocos grampositivos, los cuales en su mayoría hacen parte de la microbiota normal de la piel y de gran cantidad de sitios anatómicos, entre ellos especialmente los denominados SCN como *S. saprophyticus* y *S. epidermidis*, relacionados ampliamente con infecciones del tracto urinario, pero solo se establecen como importantes durante el diagnóstico cuando el paciente presenta una sintomatología claramente definida o un recuento mayor a 10^5 Ufc/MI en cultivos cuantitativos de orina. Otro coco grampositivo presente en este tipo de infecciones es *S. aureus* el cual se ha relacionado con el aumento en el número de espermatozoides que sufren apoptosis (Bailey, 1973; Villegas, 2005).

La correcta identificación a nivel de especie del grupo SCN permite también inferir sobre el perfil de sensibilidad, considerando que aún queda bastante por estandarizar con respecto a los mejores y más simples métodos de detección de resistencia a oxacilina, glucopéptidos, entre otros., y a los puntos de corte de sensibilidad y resistencia en las distintas especies, diferentes de *S. epidermidis* (Pedrari, 1991; Corso, 2004; CLSI, 2015).

Antecedentes Teóricos

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. En 1880, el cirujano escocés Sir Alexander Ogston, demostró que cocos agrupados en forma de racimos eran la causa de ciertos abscesos piógenos en humanos. Louis Pasteur arribó a una conclusión similar al mismo tiempo, pero en París. En el año 1882, Ogston llamo a estos cocos “*Staphylococcus*”, derivando el nombre de los términos griegos staphile (racimos de uvas) y kokkus (frutillas). Morfológicamente, Ogston propuso este término de manera de poder diferenciarlos de los estreptococos, formadores de cadenas. Ogston, demostró que la inyección a ratones de pus conteniendo estos cocos producía los mismos síntomas observados en humanos (Seija 2006).

Características morfológicas

Los miembros del género *Staphylococcus* son cocos gram positivos cuyo tamaño varía entre 0,5-1,5 μm de diámetro y crecen muy bien en medios no selectivos (agar sangre o agar tripticasa soya); las colonias son circulares, con bordes enteros, opacas y pueden ser blancas, amarillas o anaranjadas. Muchas capas producen hemolisis en agar sangre; estos microorganismos se disponen como cocos individuales, en pares, en tétradas, en cadenas cortas y la tradicional disposición en “racimos de uva”. Los estafilococos son inmóviles, no forman esporas y usualmente son catalasa positiva; normalmente no están encapsulados o tienen formación limitada de cápsula (Acero y cols., 2009).

Otra característica que presenta, es que no coagulan el plasma, por ello se les denomina "coagulasa negativa" o SCN. Algunas especies de SCN son agentes etiológicos frecuentes de infección en el hombre, principalmente *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, así como *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* y *S. haemolyticus*. (Ruíz y cols., 2006).

Estos microorganismos son poco exigentes en sus requerimientos nutricionales, toleran concentraciones elevadas de sal, resisten la desecación y crecen en medios de cultivos convencionales. Las colonias que forman en 24 horas en medios con agar (Ruíz y cols., 2006).

En la actualidad, más de 50 especies y subespecies de estafilococos han sido caracterizadas. El género se divide basándose en su capacidad para coagular el plasma en: coagulasa positiva y coagulasa negativa (Pyorala y cols., 2009).

Patogenia

El grupo de SCN son considerados como microorganismos patógenos oportunistas que se aíslan frecuentemente en cuatro tipos de pacientes: un primer tipo lo constituyen 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 está constituido por pacientes con dispositivos implantados como catéteres, prótesis, derivaciones, entre otros. El tercer grupo lo conforman los pacientes inmunocomprometidos y/o con enfermedad de base y el último grupo por neonatos (Boquete, 1996).

Las especies más frecuentemente involucradas en patología humana ocasionadas por especies de SCN son: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, que en conjunto alcanzan hasta el 80% de los casos; en el resto se encuentran *S. lugdunensis*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis* subsp. *urealyticus*, *S.*

auricularis, *S. cohnii* subsp. *urealyticum* (Pedrari, 2007). En la tabla N° 1, a continuación se describe las características generales de algunas de las especies de SCN de importancia clínica.

Tabla N° 1. Características generales de algunas de las especies de *Staphylococcus* cogulasa negativa de importancia clínica.

Especie	Descripción
<i>S. epidermidis</i>	Forman parte de la microbiota habitual de la piel y de las mucosas, como fosas nasales, oído y axilas. Es un microorganismo poco virulento, y en personas sanas casi nunca causa infecciones; sin embargo, puede comportarse como patógeno en pacientes que tienen disminuidas las defensas, como son aquellos con enfermedades graves y especialmente los pacientes inmunodeprimidos en quienes puede producir sepsis.
<i>S. haemolyticus</i>	Integrante de la microbiota habitual de la piel. Se encuentra también en animales.
<i>S. warneri</i>	Esta especie, que representa aproximadamente el 1% de los estafilococos encontrados normalmente en la piel, en la actualidad, es una causa bien reconocida de bacteriemia relacionada a catéteres y de endocarditis de válvulas naturales.
<i>S. hominis</i>	Esta especie se encuentra en la piel y ha sido aislada como causa de bacteriemia en pacientes cancerosos.

<i>S. simulans</i>	Encontrado en la piel y en la uretra de mujeres sanas. Ha sido identificado como causa de septicemia, osteomielitis y artritis séptica posterior a la reducción de una fractura de peroné. Posee una cápsula que inhibe la fagocitosis <i>in vitro</i> y contribuye a la virulencia <i>in vivo</i> .
<i>S. lugdunensis</i>	Descrito por primera vez en 1988. Se ha relacionado principalmente con endocarditis de válvulas naturales y protésicas, con celulitis de la piel y del tejido subcutáneo, con peritonitis, con prótesis de cadera infectadas y con abscesos mamarios.
<i>S. capitis</i>	Integrante de la microbiota habitual, se encuentra alrededor de las glándulas sebáceas del cuero cabelludo y la fente. Recientemente la especie se ha dividido en dos subespecies, <i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> y <i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> .
<i>S. schleiferi</i>	Ha sido aislada a partir de varias infecciones, entre ellas empiema cerebral, infecciones de heridas, bacteriemia como complicación de una osteítis vertebral, infección de una prótesis de cadera. La especie ha sido dividida en dos subespecies; los aislamientos humanos se denominan <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> y los aislamientos caninos reciben el nombre de <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> .
<i>S. pasteurii</i>	Especie que se encuentra en muestras clínicas humanas y animales y en alimentos todavía no

	han sido asociadas con procesos infecciosos y es fenotípicamente similar a <i>S. warneri</i> .
<i>S. auricularis</i>	Esta especie se encuentra en el conducto auditivo externo de los seres humanos y rara vez ha sido implicada en infecciones.
<i>S. cohnii</i>	Esta especie se ha subdividido en dos subespecies denominadas <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> y <i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i> . Ambos microorganismos pertenecen a la microbiota habitual de la piel.
<i>S. xylosum</i>	Este microorganismo se encuentra tanto en seres humanos como en animales y ha sido implicado como causa de infecciones de las vías urinarias superior e inferior.

Fuente: Orteaga, 2009.

Identificación

Kloos y Schleifer, crearon un esquema mediante el cual los SCN, pueden clasificarse fácilmente en especies gracias a sus características bioquímicas. La caracterización bioquímica se ha simplificado aún más gracias a la comercialización de equipos miniaturizados que facilitan la identificación rápida de los estafilococos. La clasificación en especies podría tener un valor clínico si se pudiese utilizar para su biotipificación o si existiesen asociaciones evidentes entre ciertas especies, infecciones concretas o patrones de sensibilidad a antibióticos específicos (Mandell y cols., 2006).

Todas las especies del género *Staphylococcus* spp., se identifican basándose en caracteres fenotípicos convencionales, pero la mayoría de las que tienen significación clínica en humanos se tipifican e identifican en relación con unas características que tienen una base molecular, tanto fenotípica como genotípica.

Métodos de Diagnóstico Microbiológico

- **Pruebas Bioquímicas**

Todas las especies del género *Staphylococcus* spp. se identifican basándose en caracteres fenotípicos convencionales, pero la mayoría de las que tienen significación clínica en humanos se tipifican e identifican en relación con unas características que tienen una base molecular, tanto fenotípica como genotípica. En algunos laboratorios de microbiología clínica se utilizan actualmente sistemas comerciales para la identificación que llevan incorporadas pruebas bioquímicas, que nos ofrecen los resultados en un máximo de cuatro horas. La mayoría de los SCN involucrados en las infecciones en humanos muestran diferencias bioquímicas poco apreciables. Considerando que la mayor parte de los aislamientos de SCN se identifican como *S. epidermidis*, interesa la diferenciación o patrón bioquímico que los distingan de *S. haemolyticus* (Machado y cols., 2002).

- **Actividad de la fosfatasa**

En los esquemas tradicionales para la identificación de SCN, se informó que la actividad fosfatasa es positiva para cepas de *S. epidermidis* y *S. xylosus* y negativa para otros SCN. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que otras especies de SCN pueden producir enzima fosfatasa (Koneman y cols., 2008).

- **L-pirrolidonil-B-naftilamida (PYR)**

La enzima L-pirroglutamilaminopeptidasa hidroliza el sustrato L-pirrolidonil-B-naftilamida (PYR) para producir una B-naftilamida. Cuando la B-naftilamida se combina con un reactivo cinamaldehído se produce un color rojo brillante (Forbes y cols., 2009). Se utiliza principalmente en la identificación de *Streptococcus pyogenes* y *Enterococcus* spp. También en la diferenciación de *Staphylococcus lugdunensis* de otros SCN (Fernández y cols., 2010).

La identificación bioquímica de *S. lugdunensis* solamente requiere la realización de dos pruebas fundamentales para diferenciarlo del resto de los SCN: la producción de ornitina descarboxilasa (ODC), principal característica siempre presente en esta especie, y la positividad de la prueba de la pirrolidonil arilamidasa (PYR). *S. lugdunensis* produce ácido a partir de trehalosa, manosa, maltosa y sacarosa permite diferenciar esta especie de otras que también son PYR positivas (Cercenado, 2009)

- **Prueba de la ureasa**

Algunos SCN son ureasa positivos, incluidos *S. epidermidis*, *S. intermedius* y la mayoría de las cepas de *S. saprophyticus*. Para esta prueba se puede usar el caldo ureasa común o el cultivo inclinado de agar

urea. Cualquiera de ellos se inocula y se incuba a 35°C durante 18-24 horas (Koneman y cols., 2008).

- **Susceptibilidad a la novobiocina**

La prueba de susceptibilidad a la novobiocina es un método confiable para la identificación presuntiva de *S. saprophyticus* (Koneman y cols., 2008). Aunque otras tres especies estafilocócicas humanas (subespecies de *S. cohnii*, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* y *S. xylosus*) son resistentes a la novobiocina. La prueba se realiza utilizando un disco de novobiocina de 5 µg, las cepas resistentes mostraran una zona de inhibición que mide de 6mm a 12mm; las cepas sensibles mostraran zonas de 16mm a 27mm (Koneman y cols., 2008).

Ornitina descarboxilasa (ODC)

La prueba de la ODC es la más útil para confirmar la identidad de *S. lugdunensis*, porque esta especie es la única ornitina descarboxilasa positiva (Koneman y cols., 2008). Puede ser problemático la identificación de *S. lugdunensis* debido a que puede ser coagulasa positivo en placa pero siempre es coagulasa negativa en las pruebas en tubo. No produce la beta-hemólisis del *S. aureus*, lo que hace que se diferencie de esta especie (Forbes y cols., 2009).

Sistemas Comerciales

Se trata de celdillas aisladas con un sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Cada especie está definida por un código numérico,

resultado de la codificación de las reacciones a las pruebas que se hubieran utilizado. El código numérico se obtiene sumando los valores de las tres pruebas. Los límites inferior y superior del código son 0 y 7 respectivamente. Ante un microorganismo problema, se busca el código numérico y se comprueba a qué bacteria pertenece. Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el mercado son: API (BioMérieux®), Enterotube® (BBL), Oxi/Ferm® Tube (BD), RapID® systems y MicroID (Remel®), Biochemical® ID systems (Microgen), entre otras (Fernández y cols., 2010).

- **El Sistema de Galería API**

Es el más utilizado en la actualidad. De la lectura de las pruebas se va obteniendo una puntuación según que cada prueba sea positiva o negativa, la identificación numérica de un perfil observado se apoya en el cálculo de su proximidad relativa a los distintos taxones de la base de datos y su proximidad al perfil más típico en cada taxón; a continuación, la clasificación de los taxones permite proponer un resultado de identificación. Durante mucho tiempo, el API ha representado la identificación de referencia en el laboratorio. (Gobernado y cols., 2003).

Factores de Virulencia

Los SCN pueden sintetizar enzimas como lipasas, termonucleasas, ADNasas, hemolisinas y algunas exo-enzimas que degradan los tejidos y contribuyen a la persistencia de la infección (Fariña y cols., 2013). Además de su capacidad para adherirse a las superficies, diversos grupos de microorganismos también producen una sustancia polimérica extracelular llamada limo que forma una capa delgada alrededor de las células conocida como biofilm, que se compone de células bacterianas y

una sustancia polimérica extracelular denominada exopolisacárido (EPS), esta sustancia presenta características aniónicas, ya que está compuesto por ácidos urónicos (D-glucorónico, D-galacturónico y ácidos manurónicos) (Oliveira y cols., 2008).

La producción de biopelícula por ciertas cepas de SCN está relacionada con su capacidad de adherencia a biomateriales confiriéndole mayor virulencia, estudios indican que las cepas potencialmente más patógenas de SCN producen este polisacárido (García y cols., 2004). La formación de esta biopelícula posibilita la adherencia a materiales vivos y no vivos, como en el caso de las infecciones hospitalarias en pacientes que utilizan catéteres u otros dispositivos protésicos, la formación de esta película también puede estar influenciada por la interacción de componentes no microbianos que se encuentren en el medio, un ejemplo es la acumulación de los eritrocitos y la fibrina durante la formación de biofilm, otro ejemplo clásico de esta interacción se observa en las válvulas cardíacas naturales, donde las colonias forman la biopelícula a partir de una matriz de plaquetas, fibrina y EPS lo que genera endocarditis infecciosa (Oliveira y cols., 2008).

La capa de biopelícula se convierte en una reserva nutricional, la cual utilizan las bacterias ante escases de nutrientes, también le confiere protección ya que dificulta la acción de los antibióticos porque los mecanismos de adhesión, agregación y coagregación forman una masa o biopelícula que dificulta el acceso de los fármacos, principalmente los hidrófobos (Villafañe, 2008).

Antibióticos

Molécula producida por un organismo vivo ya sea hongos o bacterias, pueden ser sintéticos o semisintéticos capaz de producir la muerte o la detección del crecimiento de bacterias, virus y hongos (Vignoli y Seija, 2008).

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferentes comportamientos farmacocinético y farmacodinámico, que ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo a bajas concentraciones. El objetivo de la antibioterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de los mismos (Vignoli y Seija, 2008).

Dentro de su clasificación tenemos:

www,bdigital.ula.ve

- **β -lactámicos**

Los β -lactámicos actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyendo así la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, actúan impidiendo la síntesis de la pared bacteriana, inhibiendo la síntesis del péptidoglicano que es el componente que le confiere estabilidad y rigidez a la bacteria, protegiéndola de la ruptura osmótica. Los β -lactámicos actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el péptidoglicano (Marín y Gudiol, 2003).

- **Penicilinas**

Es un grupo de antibióticos que es empleado para el tratamiento de infecciones contra cepas sensibles de cocos grampositivos. La meticilina es el grupo de penicilinas semisintéticas resistente a la enzima penicilinas, son eficaces contra *S. aureus* productor de dicha enzima (Mendoza, 2005).

- **Cefalosporinas**

Las cefalosporinas han ascendido a una posición de distinción en el mundo de los antibióticos y ha llegado adquirir gran importancia en el tratamiento de infecciones bacterianas por su relativa baja toxicidad, amplio espectro, actividad bactericida y actividad frente a las β -lactámicas (Zamora y cols. 1998).

Se clasifica en cuatro generaciones en base a su actividad microbiana in vitro, cada cual con su espectro de actividad mayor que la anterior. Se diferencia en su unión a las proteínas, nivel de concentración, vida media en el suero, ruta de excreción y toxicidad (Sussmann, 2013).

- **Inhibidores de las β -Lactamasas**

Resulta de la combinación de penicilinas con inhibidores de las β -lactámicas como lo son el ácido clavulánico, sulbactam y lazobactam. Estos antibióticos son ideales para el tratamiento de infecciones de la piel y tejido blando ocasionado por microorganismos polimicrobianos (Sussmann, 2013).

El sulbactam está químicamente relacionado con el ácido clavulánico y cuando se añade a la penicilina mejora el espectro antibacteriano de dicho antibiótico, siendo efectivo contra una gama de bacterias

gramnegativas y grampositivas incluyendo al *S. aureus* y *S. epidermidis* (Sánchez y cols., 2004).

- **Macrólidos y Lincosamidas**

Vignoli y Seija en el 2008, expresan que el grupo de los macrólidos y lincosamidas está extendiéndose de forma importante durante los últimos años, nuevos derivados se están desarrollando, jugando un papel importante en el tratamiento de infecciones.

Su mecanismo de acción se basa en la unión a la sub-unidad 50S del ARN ribosómico (ARNr) en forma reversible. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del antimicrobiano y determinadas bases del ARNr; esto provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y translocación (Vignoli y Seija, 2008).

Estos antibióticos actúan como bacteriostáticos o bactericidas según las diferentes especies bacterianas, la fase de crecimiento en que se encuentra la bacterias, la densidad de la población bacteriana y la concentración que alcanza el antibiótico en el sitio de infección (Sánchez y cols., 2004).

La eritromicina y clindamicina fueron indicados como una alternativa a la penicilina debido a su actividad frente a organismos grampositivos, tales como *Staphylococcus* spp. *Neumococcus* y *Streptococcus*, pero sus efectos gastrointestinales, vida media corta y poca actividad frente a microorganismos gramnegativos han limitado su uso. Cabe destacar que existe una alta tasa de resistencia frente al género *Staphylococcus* (Sánchez y cols., 2004).

- **Quinolonas**

Se trata de un grupo de antimicrobianos que deriva de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo, incluyendo residuos de flúor, que bien sea fluoroquinolonas (Sussamann, 2013).

Serra en el 2008, indica que las quinolonas son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo el ADN girasa o gen topoisomerasa IV, enzima que cataliza el superenrollamiento negativo y procesarlo para el empaquetamiento del ADN cromosómico, asegurando una adecuada división.

- **Aminoglucósidos**

Son un grupo importante de antibióticos que se caracterizan por tener aminoazúcares con uniones glicosídicas. Generalmente este grupo son efectivos frente a los *Staphylococcus* y *S. aureus* o SDR resistentes a metilicina también lo suelen ser a los aminoglucósidos (Sánchez y cols., 2004).

Su principal mecanismo de acción es dirigido a la subunidad ribosómica 30S éstas constituyen el sitio de unión de ARNt al ribosoma donde el aminoglucósido provoca una alteración en la unión codón-anticodón y lectura errónea del código genético, con producción de una proteína anómala, la cual unida a las alteraciones de la membrana producen la muerte bacteriana (Sánchez y cols., 2004).

- **Glucopéptidos**

Carcas describe en el 2009 que son un grupo de antimicrobianos con estructura péptica que presenta un espectro de actividad similar, restringido a las bacterias grampositivas aerobias y anaerobias. En las dos últimas décadas han adquirido una mayor importancia en él, la

combinación trimetropim-sulfametoxazol es sinérgica frente a un gran número de bacterias (Dagán y Fox, 2012).

Resistencia Antimicrobiana

En relación a la terapia antimicrobiana empleada, la meticilina es un agente antimicrobiano de primera elección para el tratamiento de infecciones estafilocócicas. Sin embargo, se conoce muy bien la resistencia a este agente antimicrobiano por este género, la cual está mediada por el gen *mecA*, responsable de la síntesis de la proteína 2a de unión a la penicilina (PBP2a). Esta proteína, no se une bien a las penicilinas ni a las penicilinas resistentes a penicilinasas. Lo cual permite, que la célula complete la formación de la pared celular (Forbes, 2009).

Un aspecto importante a destacar es que la especie *S. epidermidis* ha desarrollado resistencia a la meticilina en forma paralela a la resistencia de *S. aureus* a este agente antimicrobiano, pero mostrando tasas mucho más elevadas que esta última especie, y observándose un incremento importante en los últimos 20 años. Mientras que a inicio de los años 80 la especie *S. epidermidis* reveló tasas de resistencia a la meticilina del 20%, en 1999 éstas se elevaron a un 80%. Ésta es la razón por la cual en la actualidad, se considera que la vancomicina es el tratamiento de elección para infecciones causadas por este microorganismo (Breña y cols., 2009).

El gen *mecA*, presenta una alta similitud en *S. aureus* y SCN resistentes a meticilina y está ausente en aislamientos de estafilococos sensibles a este agente antimicrobiano. Entre los SCN, la resistencia a meticilina se expresa principalmente en *S. haemolyticus* con resistencia heterogénea a vancomicina, dificultando una terapia exitosa en pacientes neonatos, neutropénicos y de cuidados intensivos. Diversos estudios han demostrado que las infecciones por SCN, son causadas por tipos moleculares predominantes, los cuales están ampliamente distribuidos en

los hospitales, surgiendo contaminación cruzada en su diseminación. (Castro y cols., 2006).

Para identificar *in vitro* las cepas de *S. aureus* que poseen una resistencia inducible a la clindamicina, existe un método de laboratorio conocido como test de difusión de doble disco (D-test). Este método consiste en colocar en un cultivo de *S. aureus*, un disco de clindamicina y uno de eritromicina a una distancia de 15 mm. Aquellas cepas con resistencia inducible a clindamicina forman una letra D en la zona circular de inhibición alrededor del disco de clindamicina hacia el lado que enfrenta al disco de eritromicina. El D-test es un método que ha demostrado una sensibilidad y especificidad cercana al 100% al ser comparado con el estudio de genotipificación, el cual constituye el estándar de oro para la identificación de las cepas que presentan resistencia inducible a clindamicina (CLSI., 2017).

Sin embargo, la Daptomicina se ha demostrado muy activa frente a las cepas de SCN procedentes de pacientes con bacteriemia, además se ha comprobado que su actividad no se ve afectada por la resistencia a otros agentes antimicrobianos como Oxacilina, Linezolid, Ciprofloxacina, Gentamicina y Teicoplanina (Picazzo y cols., 2010).

- **Resistencia a las penicilinas por producción de betalactamasa**

Las betalactamasas son enzimas bacterianas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo betalactámico de las penicilinas, cefalosporinas y otros antimicrobianos betalactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. En el caso concreto de los estafilococos, la betalactamasa producida es una penicilinasas que hidroliza exclusivamente las penicilinas. El fenotipo de resistencia a la penicilina mediado por betalactamasa implica resistencia a todas las penicilinas

excepto las semisintéticas, como la oxacilina y la cloxacilina.(Pallarés R. y cols., 1995)

Actualmente este mecanismo de resistencia es muy frecuente tanto en *S. aureus* como en las diferentes especies de SCN y su diseminación es mundial. La resistencia de los estafilococos a las penicilinas puede detectarse mediante la prueba de nitrocefin, pero también mediante la técnica de difusión con disco o por dilución en caldo o en agar. Para la detección de cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina es más adecuado utilizar un disco de 10 unidades de penicilina que un disco de 10 µg de ampicilina. Asimismo, el disco de penicilina se debe utilizar para determinar la sensibilidad a todas las penicilinas lábiles a la acción de la penicilinasa, como ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina. En resumen, las cepas de estafilococos que son resistentes a la penicilina pero sensibles a la oxacilina producen penicilinasa, lo que implica resistencia a todas las penicilinas pero no a las penicilinas semisintéticas (oxacilina, meticilina, cloxacilina, nafcilina) que poseen una estructura molecular que les protege frente a la acción de esta betalactamasa. Asimismo, estas cepas son sensibles a las combinaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa, a las cefalosporinas y a las carbapenemas.(Herrero JE., 2007).

- **Resistencia a la meticilina (oxacilina): homogénea y heterogénea.**

El fenotipo de resistencia a la meticilina (y a la oxacilina) es mucho más frecuente entre las diferentes especies de SCN (con la excepción de *S. lugdunensis* y *S. saprophyticus*) que en *S. aureus*. Esta resistencia se debe a la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a, que posee baja afinidad por los betalactámicos.

La resistencia a la meticilina implica resistencia a todos los betalactámicos, incluyendo penicilinas, combinaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemos.(Liñares J., y cols 2007)

La resistencia a la meticilina (oxacilina, meticilina, cloxacilina, nafcilina) en estafilococos se debe a la adquisición de ADN exógeno que codifica la producción de una proteína fijadora de penicilina (PBP) supernumeraria, de baja afinidad por los betalactámicos y que no se inhibe por estos antimicrobianos. *S. aureus* normalmente contiene 4 PBPs, de las cuales las PBPs 1, 2 y 3 son esenciales. La PBP de baja afinidad denominada PBP2a o PBP2', de 78 kDa, está codificada por el gen cromosómico *mecA*. La expresión fenotípica de la resistencia mediada por el gen *mecA* es compleja y se afecta por diferentes factores como la temperatura, el pH, la osmolaridad, la presencia de secuencias cromosómicas reguladoras y de otros genes cromosómicos no relacionados.(Herrero JE., 2007).

El cefoxitin es un marcador alternativo de la presencia de *mecA*, ya que es un inductor más potente del sistema regulatorio de *mecA* que las penicilinas y por ello mejora la expresión de este gen y en consecuencia, mejora también la detección de la resistencia a la meticilina. La utilización del disco de cefoxitin es especialmente útil y de preferencia sobre el disco de oxacilina para detectar la resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA* en las cepas heterorresistentes y se debe utilizar siempre en cepas de SCN.(Liñares J., y cols 2007).

- **Resistencia a los macrólidos y a la clindamicina**

Los macrólidos, junto con las lincosamidas y las estreptograminas B (MLSB) son tres grupos de antimicrobianos de estructuras químicas diferentes pero con mecanismos de acción similares. En los estafilococos, la resistencia a los macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina, midecamicina) puede asociarse a diferentes fenotipos de sensibilidad o de

resistencia a las lincosamidas (clindamicina) que se pueden identificar en el laboratorio mediante el método de difusión con discos de eritromicina y clindamicina o mediante dilución en caldo utilizando una combinación de ambos antimicrobianos. Los fenotipos que se observan mediante difusión con discos son: 1) resistencia a la eritromicina y a la clindamicina; 2) resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina pero con un achatamiento del halo de la clindamicina en la proximidad de la eritromicina (Dtest positivo); 3) resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina sin achatamiento del halo (D-test negativo). En el primer caso se trata de resistencia constitutiva a la eritromicina y a la clindamicina (fenotipo cMLSB), en el segundo de resistencia constitutiva de expresión inducible (fenotipo iMLSB) y en el tercero de resistencia a la eritromicina mediada por una bomba de expulsión activa (fenotipo MSB).

***Staphylococcus coagulasa negativa* relacionada con infecciones del tracto reproductor masculino**

Un gran número de bacterias puede colonizar el tracto reproductor masculino y desencadenar procesos infecciosos con múltiples consecuencias. Estas infecciones son clasificadas en tres grupos: infecciones de transmisión sexual, del tracto urinario y las asociadas a la microbiota bacteriana. Algunos sitios anatómicos presentan un recubrimiento especial con bacterias conocidos como microorganismos saprófitos, los cuales se aprovechan de los nutrientes que les proporciona el hospedero sin causarle daño alguno. Estos microorganismos actúan por inhibición competitiva y ocupación de un sitio anatómico determinado, en los cuales generalmente impiden la colonización por otros microorganismos patógenos que puedan alterar la arquitectura e integridad de los epitelios (Puerta Suárez y cols., 2014).

Definición de Términos

Pareja Infértil

Es aquella que no es capaz de concebir tras un año de relaciones sexuales frecuentes y no protegidas (Amorós, 2011).

Bacteriospermia

Se define como la presencia de bacterias en el semen (Rosa, 2000).

Semen

Es un conjunto de fluidos aportados por las distintas glándulas que conforman los órganos reproductores y sexuales del hombre. La secreción por parte de las glándulas de Cowper aportan cerca de 0,1 mL a 0,2 mL, las vesículas seminales aportan entre 1,5 mL y 2 mL y la próstata contribuye con 0,5 mL (Cataño y cols., 2006).

www.bdigital.ula.ve

HIPÓTESIS

Los denominados *Staphylococcus* coagulasa negativos como *S. saprophyticus* y *S. epidermidis*, relacionados ampliamente con infecciones del tracto urinario, pero solo se establecen como importantes durante el diagnóstico cuando el paciente presenta una sintomatología claramente definida (Bailey, 1973) o un recuento mayor a 10^5 Ufc/mL en cultivos cuantitativos de orina. Otro coco grampositivo presente en este tipo de infecciones es *Staphylococcus aureus* el cual se ha relacionado con el aumento en el número de espermatozoides que sufren apoptosis (Villegas y cols., 2005).

De tal manera existe diversidad en las especies de SCN responsables de las infecciones del tracto reproductor masculino asociado a problemas de fertilidad, con diferentes patrones de susceptibilidad.

www,bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de Investigación

La investigación es de tipo exploratoria y analítica, ya que se identificará a nivel de especie los aislados clínicos y se determinará el patrón de susceptibilidad de cada especie previamente identificada.

Población y Muestra

www.bdigital.ula.ve

Para el presente trabajo de investigación se tomarán en cuenta 9 cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa aisladas de muestras de semen de pacientes que asistieron a consulta en el Centro de Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Ginecológicas (CEDIEG) “Dr. Giovanni Vivas-Acevedo”, con la finalidad de realizar su identificación a nivel de especie y determinar su perfil de susceptibilidad frente a los antimicrobianos con detección fenotípica de mecanismos de resistencia, siendo la presente investigación de tipo exploratoria, caracterizada por presentar un diseño documental.

Sistema de Variables

Las variables que guardan relación con el objeto de esta investigación son las siguientes: variable dependiente (VD): especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa, variable independiente (VI): SCN.

Estas variables se relacionan con la línea de investigación, por corresponder a los núcleos semánticos del problema y permiten la verificación del fenómeno de estudio en la unidad de investigación.

Identificación

Cepas bacterianas

Se identificaron a nivel de especie 9 cepas de SCN, aisladas de pacientes que asistieron a la consulta en el Centro de Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Ginecológicas (CEDIG) "Dr. Giovanni Vivas Acevedo", con problemas de infertilidad, durante el período enero 2015 – diciembre 2016. Como cepa de referencia se utilizó *S. aureus* ATCC 25923.

Reactivación de las cepas bacterianas

Las cepas de SCN se reactivaron en caldo infusión cerebro corazón (BHI de sus siglas en inglés), a partir del agar conservación descrito por (Weng-Alemán y cols. 2003), el cual se encontraba a temperatura ambiente. Los caldos BHI inoculados con cada cepa se incubaron a 37 °C durante 24 horas, luego se sembraron en agar manitol salado para verificar pureza, posteriormente se mantuvieron en agar tripticasa soya (TS) para realizar todas las pruebas.

Identificación de los aislados clínicos

La identificación de los aislados clínicos se realizó empleando el sistema comercial **API® STAPH** (BioMérieux). El sistema miniaturizado API® STAPH es un método rápido que permite la identificación a nivel de especie de miembros del género *Staphylococcus*, a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas con sustratos deshidratados contenidos en microtubos individuales en una tira comercial.

El **API®STAPH** consta de 20 microtubos, la cubeta 0 es el control negativo, incluye la producción de ácido a partir de: D-glucosa, D-trehalosa, D-manitol, D-manosa, xilosa, maltosa, lactosa, sucrosa, N-acetilglucosamina, D-raffinosa, D-fructosa, D-melibiosa, xilitol y metilglucosamina; reducción de nitrato, fosfatasa alcalina, arginina dihidrolasa, ureasa y producción de acetoina.

La inoculación de los microtubos y las condiciones de incubación y lectura se realizaron según las instrucciones del fabricante, las cuales se describen a continuación: Cada microtubo del sistema se inoculó con una suspensión de cada aislado clínico de SCN (cultivo fresco) en solución salina al 0,85%, con una turbidez equiparable al Patrón de Mac Farland Nº 0,5 ($1,5 \times 10^8$ Ufc/mL). En algunos casos estos microtubos se llenaron completamente con la suspensión, mientras que en otros se requirió del añadido de parafina líquida estéril, que proporcionó las condiciones anaeróbicas necesarias. Previo a la inoculación, al envase donde se colocó la galería se le adicionó agua para proporcionar la humedad requerida. La galería se incubó a 37 °C durante 24 horas.

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el

Período de incubación reaccionaron con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollaron en los mismos una coloración que pudo aparecer en forma espontánea ó con el agregado del reactivo para su

revelado. La interpretación de los resultados se basó en la observación de las coloraciones desarrolladas, ésta se llevó a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores. De acuerdo a esa interpretación se logró establecer un resultado positivo (+) o negativo (-) como se observa en la Fig. 1.

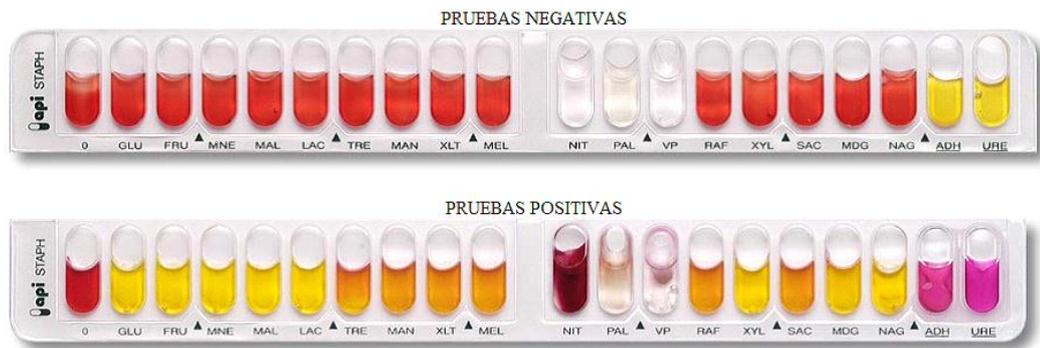


Fig. 1. Resultado de las pruebas positivas y negativas para el sistema comercial API® STAPH (BioMérieux).

Después del periodo de incubación y comparar, con la carta de colores, los resultados obtenidos en cada microtubo se colocan en la hoja de resultados que suministra el fabricante (Fig. 2).

Fig. 2. Ejemplo de la hoja de resultados de un sistema API®.

Los datos así obtenidos pueden transformarse en un código de 7 dígitos denominado “perfil numérico” que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignados previamente en la planilla. El código obtenido se corresponderá a un determinado género o especie de acuerdo a la información contenida en las bases de

datos suministradas por el fabricante y que pueden encontrarse disponibles en forma impresa y/o electrónica.

Determinación de la sensibilidad de los aislados clínicos de SCN a los antimicrobianos

La sensibilidad de los aislados clínicos de SCN frente a los antimicrobianos se realizó por el método de difusión en agar con discos conocido como Kirby Bauer. A partir de un cultivo fresco se preparó una suspensión de cada bacteria en solución salina al 0,85%, con una turbidez equiparable al Patrón de Mac Farland N° 0,5 ($1,5 \times 10^8$ Ufc/mL). Posteriormente con un hisopo estéril se impregnó con la suspensión y se sembró en la superficie de una placa de Petri con agar Mueller Hinton (Himedia®), sobre el cual se colocaron los discos comerciales impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incubaron durante 16-18 horas a 35-37°C.

Durante la incubación el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir el microorganismo en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco se expresó en mm y se comparó con los parámetros establecidos por el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio 2017 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI de sus siglas en inglés), para establecer la categoría de sensibilidad como: sensible, intermedio o resistente (S, I, o R).

Se utilizaron los siguientes agentes antimicrobianos: penicilina 10U (BBL®), cefoxitin 30µg (Difco®), eritromicina 15µg (Oxoid®), clindamicina 2µg (BBL®), ciprofloxacina 5µg (BBL®), moxifloxacina 5µg (BBL®), amikacina 30µg (Difco®), gentamicina 10µg (BBL®), netilmicina 30µg (Difco®), kanamicina 30µg (Difco®), tobramicina 10µg (Difco®), tetraciclina 30µg (BBL®), rifampicina 5µg (BBL®), linezolid 30µg (BBL®)

cloranfenicol 30µg (BBL®) y trimetoprim-sulfametoxazol 1,25/23,75µg (BBL®).

Detección fenotípica de mecanismos de resistencia bacteriana

Mecanismos de Resistencia a Betalactámicos

Se realizó la detección fenotípica de mecanismos de resistencia de los aislados clínicos de SCN frente a los antibióticos betalactámicos:

- **Resistencia a penicilinas por producción de penicilinasas.**

Para la detección de esta Betalactamasa (Penicilinasas) se utilizó el disco de Penicilina y la interpretación de la sensibilidad se realizó de acuerdo a lo descrito en el CLSI 2017: halos de inhibición ≤ 28 mm = Resistente. El fenotipo de resistencia a la penicilina mediado por betalactamasa en *Staphylococcus* implica resistencia a todas las penicilinas lábiles a la acción de la penicilinasas (ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina) excepto a las isoxazolilpenicilinas: oxacilina y meticilina (Morossi y col 2012).

- **Resistencia a penicilinas estables a penicilinasas (oxacilina/meticilina).**

La resistencia de *Staphylococcus* a la Oxacilina/Meticilinasas debe a la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a, supernumeraria, que posee baja afinidad por todos los betalactámicos y por tanto implica resistencia a todos estos compuestos (Morossi y col 2012). La detección fenotípica de este mecanismo de resistencia se realizó utilizando el disco de Cefoxitin, el cual es un marcador de la presencia del gen *mecA* ya que es un compuesto inductor del sistema regulador de dicho gen y la interpretación del resultado se efectuó de acuerdo a lo establecido por el CLSI 2017:

S. aureus y *S. lugdunensis* halos de inhibición de ≤ 21 mm Resistente
SCN halos de inhibición de ≤ 24 mm Resistente

Este resultado se extrapoló a la sensibilidad de los SCN frente a la Oxacilina/Meticilina.

Mecanismos de Resistencia a Macrólidos, Lincosaminas y Streptograminas B (MLS_B)

Los macrólidos, las lincosamidas y las estreptograminas B (MLS_B) son tres familias diferentes de antimicrobianos que poseen mecanismos y sitios de acción similares (subunidad 50S del ribosoma bacteriano). Los *Staphylococcus* pueden expresar mecanismos de resistencia frente a este grupo de antimicrobianos por modificaciones en la diana ARNr 23S debidas a la acción de metilasas codificadas por los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, con resistencia cruzada de alto nivel a todos los antimicrobianos del grupo MLS_B. La resistencia puede ser constitutiva fenotipo cMLS_B o resistencia inducible a las Lincosaminas (Clindamicina) por la Eritromicina, fenotipo iMLS_B.

Para determinar la resistencia inducible a las Lincosaminas (Clindamicina) de los aislados clínicos de SCN, se empleó el método de difusión en agar con los discos de eritromicina y clindamicina a una distancia de borde a borde de 15 – 20 mm, conocida como D-test, la prueba se interpretó como positiva cuando se observó la distorsión del halo de inhibición de la clindamicina en forma de D (Fig. 3).

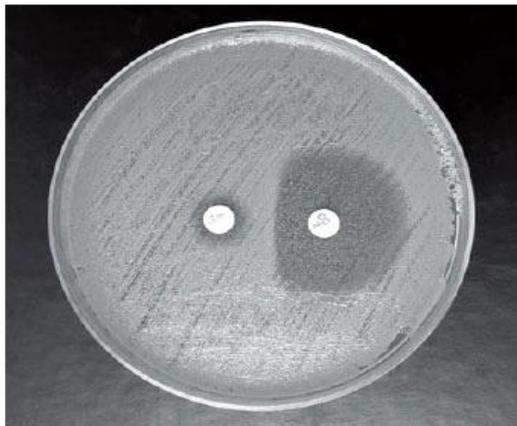


Figura 1. Imagen de D test (+) en muestra de SAMR.

Fig. 3. Técnica de difusión en agar con los discos de eritromicina y clindamicina para la detección fenotípica de resistencia inducible a las Lincosaminas (FenotipoIMLS_B).

[www,bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

En la tabla 2 se describe la identificación a nivel de especie de los nueve aislados clínicos de SCN empleando el sistema comercial API® STAPH (BioMérieux). La especie aislada con mayor frecuencia fue *S. epidermidis* (4/9), seguido de *S. caprae* (2/9), *S. haemolyticus* (1/9), *S. lugdunensis* (1/9) y *S. schleiferi* (1/9).

Tabla 2. Identificación a nivel de especie de *Staphylococcus* coagulasa negativa aislados del tracto genital masculino

Códigos	Especies
173-15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
898-15	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
3538-15	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
3983-15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
4780-15	<i>Staphylococcus caprae</i>
692-16	<i>Staphylococcus caprae</i>
698-16	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
1781-16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
1792-16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

La susceptibilidad de los nueve aislados clínicos de SCN a los antimicrobianos se describen en la tabla 3, tomando en cuenta los marcadores de resistencia a los antimicrobianos los resultados revelaron ocho antibiogramas. Sólo la especie *S. schleiferi* (3538-15) fue sensible a todos los antimicrobianos incluidos en este estudio (Tabla 3).

Tabla 3. Antibiotipos obtenidos a partir de los aislados de SCN del tracto reproductor masculino frente a los agentes antimicrobianos.

Código	Especie	Resistencia
Aislados clínicos		
373-15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	P, E, K, TE
898-15	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	P, CIP, MXF, SXT
3538-15	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	
3983-15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	P, TB, E
4780-15	<i>Staphylococcus caprae</i>	E
692-16	<i>Staphylococcus caprae</i>	P, O
698-16	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	P, E, K, TB, CIP
1781-16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	P, O, E, CC, K, TB, CIP, MXF, TE
1792-16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	P, E, TE
Cepa de referencia		
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	

Penicilina (P); Oxacilina (O); Eritromicina (E); Clindamicina (C), Kanamicina (K); Tobramicina (TB); Ciprofloxacina (CIP); Moxifloxacina (MXF); Tetraciclina (TE); Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)

El análisis de los resultados de sensibilidad por especie (Tabla 4) se observa que los cuatro aislados de *S. epidermidis* fueron resistentes a la penicilina y a la eritromicina.

Tabla 4. Perfil de resistencia de los aislados clínicos de SCN en tracto reproductor masculino frente a los agentes antimicrobianos

Agente antimicrobiano	S. <i>epidermidis</i> (n=4)	S. <i>caprae</i> (n=2)	S. <i>lugdunensis</i> (n=1)	S. <i>haemolyticus</i> (n=1)	S. <i>schleiferi</i> (n=1)
Penicilina	4(100%)	0(0%)	1(100%)	1(100%)	0(0%)
Oxacilina	1(25%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Eritromicina	4(100%)	1(50%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)
Clindamicina	1(25%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Ciprofloxacina	1(25%)	0(0%)	1(100%)	1(100%)	0(0%)
Moxifloxacina	1(25%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)
Gentamicina	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Amikacina	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Kanamicina	2(50%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)
Netilmicina	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Tobramicina	2(50%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)
Tetraciclina	3(75%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Trimetoprim-Sulfametoxazol	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)
Rifampicina	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Linezolid	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Cloranfenicol	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)

En relación a la sensibilidad de los aislados clínicos de SCN frente a los antibióticos β -Lactámicos se puede observar que un 88.8% fue resistente a la penicilina y solo un 22.2% de las cepas resistentes a la Oxacilina (Tabla 5).

El comportamiento de los aislados clínicos de SCN frente a los antibióticos cuyo mecanismo de resistencia es inhibir la síntesis proteica, el más efectivo fue clindamicina, observándose un caso de resistencia inducible a las lincosamidas, Dtest+ (*S. epidermidis* 1781-16), le sigue tetraciclina con un 33.3% de resistencia y por último se encuentra eritromicina con un 66.6% de resistencia (Tabla 5).

En cuanto a las quinolonas (ciprofloxacina y moxifloxacina) hubo una sensibilidad de 77.7% (Tabla 5).

Tabla 5. Susceptibilidad de los aislados clínicos de SCN del tracto reproductor masculino frente a los diferentes agentes antimicrobianos.

Agente Antimicrobiano	Número	Porcentaje
Penicilina	8/9	88.8%
Oxacilina	2/9	22.2%
Eritromicina	6/9	66.6%
Clindamicina	1/9	11.1%
Ciprofloxacina	3/9	33.3%
Moxifloxacina	2/9	22.2%
Gentamicina	0/9	0%
Amikacina	0/9	0%
Netilmicina	0/9	0%
Kanamicina	4/9	44.4%
Tobramicina	3/9	33.3%
Tetraciclina	3/9	33.3%
Trimetoprim-Sulfametoxazol	1/9	11.1%
Rifampicina	0/9	0%
Linezolid	0/9	0%
Cloranfenicol	0/9	0%

Discusión

Algunas especies de SCN forman parte de la microbiota habitual de la uretra anterior masculina, por ello aún se discute su importancia como patógeno asociado a problemas de infertilidad. En tal sentido, en el presente estudio se seleccionaron de manera aleatoria nueve cepas de SCN aisladas de muestras de semen de pacientes que acudieron al CEDIEG por problemas de fertilidad, con la finalidad de realizar su identificación a nivel de especie, empleando el método comercial miniaturizado API® STAPH. La identificación arrojó cinco especies siendo *S. epidermidis* la más frecuente, este resultado es consistente con lo reportado en la literatura, al respecto Álvarez y col 2008, en un estudio realizado en el Servicio de alto riesgo neonatal del IAHULA Mérida, Venezuela, observaron que las especies más frecuentes de SCN fueron *S. epidermidis* 16,9% y *S. warneri* 34,4%.

Por otra parte, Fariña y col 2013 incluyeron en un estudio aislados identificados como SCN mediante la prueba de coagulasa en tubo, provenientes de muestras clínicas de pacientes hospitalizados o ambulatorios del Laboratorio San Roque de Asunción-Paraguay, desde marzo del año 2009 hasta julio de 2011 y que fueron considerados clínicamente significativos. Sus resultados señalan a *S. epidermidis* como la especie más frecuente con 40,6%, seguido de *S. haemolyticus* 20,3% y *S. lugdunensis* 16,6%.

La patogenicidad de los SCN varía entre las diferentes especies, está relacionada con la capacidad de ciertas cepas de expresar adhesinas, formar biopelículas, sintetizar enzimas como lipasas, ADNasas, termonucleasas, hemolisinas y demás exo-enzimas que degradan los tejidos y contribuyen a la persistencia de la infección (Pfaller y Herwaldt 1998, Ribeiro de Souza y col 2006, Oliveira y Cunha 2008, Becker y col 2014). Al respecto, Fariña y col. 2013, además determinaron la expresión de varios factores de virulencia en los aislados clínicos de SCN como la

producción de biopelícula, hemolisinas, lipasas, lecitinasas, ADNAsas. Con los siguientes resultados: El 73,1% de *S. epidermidis*, 53,8% de *S. haemolyticus* y 40% de *S. lugdunensis* fueron productores de biopelícula. La producción de lipasa y lecitinasa fue de 53,8% para *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* de 61,5 y 46,2%, respectivamente. *S. lugdunensis* sólo fue positiva para la producción de lipasa en 60% y ningún aislado produjo lecitinasa. La nucleasa de tipo ADNasa se detectó en 100% de las cepas de *S. haemolyticus* y de *S. lugdunensis*. Finalmente sugieren que la identificación a nivel de especie sea una práctica habitual en los laboratorios de rutina de microbiología clínica, incluso los que no cuentan con equipos automatizados de identificación, para ayudar a valorar a esta bacteria en su justa medida.

En este orden de ideas Lozano y col. 2018 evaluaron el impacto de *S. epidermidis* en el tracto reproductor masculino del ratón. Evaluaron los parámetros espermáticos e histológicos de testículos de ratón después de haber sido inoculados con una suspensión de *S. epidermidis*. Se seleccionaron 12 ratones machos a un grupo experimental (n=6) se le inoculó cada testículo con 0,1 mL de la suspensión bacteriana y al grupo control (n=6) con 0,1 mL de SSF. Los animales fueron sacrificados a las tres semanas, los testículos fueron removidos, se pesaron y se procesaron histológicamente. Se determinó la concentración, la movilidad y la morfología espermática en espermatozoides epididimarios. En los ratones infectados la concentración y la movilidad espermática no se alteraron, y el análisis citomorfológico demostró la presencia de formas anormales: amorfa, forma de banana con tendencia a la pérdida de la forma normal (de gancho). En el epitelio germinal se observó vacuolización con leve desprendimiento del mismo. A nivel intersticial se observó leve hipertrofia en las células de Leydig. Estos hallazgos sugieren considerar el impacto de estos microorganismos en la calidad seminal aun en ausencia de leucocitos, porque el predominio de células redondas y el aumento de formas globosas pueden ser indicadores de daño oxidativo en la espermatogénesis. El papel patogénico que puede ejercer SCN

dependerá de su concentración y de la susceptibilidad de cada hospedero.

Lozano y col. 2017 evaluaron el impacto de los SCN y otros microorganismos en la forma de los espermatozoides, sus resultados señalan a este grupo de microorganismos como uno de los más frecuentes en 281 muestras de semen de hombres analizadas. Asociaron la presencia de SCN en cultivos puros con contajes superiores a 10^4 Ufc/mL y el impacto negativo en la celularidad: células redondas y cabezas pequeñas de los espermatozoides y posiblemente en la fertilidad. Estos hallazgos resaltan la importancia de identificar a nivel de especie los aislados clínicos de SCN, con la finalidad de profundizar en el conocimiento de cada especie de este importante grupo bacteriano.

S. caprae la segunda especie con mayor frecuencia identificada en este estudio es considerada comensal de la piel y de la mama en glándulas de cabra, mayormente es aislada en la leche de cabra. Sorprendentemente, esta especie también viene siendo reportado como un patógeno humano adquirido en el hospital, principalmente en piel o en infecciones óseas y articulares (Seng y col., 2014).

La otra especie identificada fue *S. lugdunensis*, se ha reportado con frecuencias que oscilan entre 3 y 6% (De Paulis y cols., 2003; Lorio y cols., 2007). Cada vez se reporta con mayor incidencia y se la ha asociado a un amplio espectro de infecciones, principalmente de piel y tejidos blandos, como celulitis y abscesos subcutáneos. Además, ha sido reportada como causa de endocarditis, artritis, infecciones de prótesis, osteomielitis, infección urinaria y de heridas, en los que se describe la naturaleza agresiva de esta bacteria, considerada más virulenta que otras especies de SCN (Mateo y cols., 2005; Fariña y col 2013). El incremento de infecciones debidas a *S. lugdunensis* puede deberse tanto a un mejor conocimiento de sus características, o a un mayor índice de sospecha; sin embargo, es posible que su incidencia siga aún subestimada e incluida dentro del grupo de los SCN no identificados, o identificado como *S.*

aureus, debido a que comparte con este último, la capacidad de producir coagulasa ligada y la similitud de sus colonias.

S. schleiferi que si bien no es frecuente, comparte con *S. lugdunensis* la capacidad de producir coagulasa unida a infecciones similares a las de *S. aureus*, por lo tanto en algunos casos puede pasar desapercibida (Herbert., 1991).

La amenaza emergente de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram positivas como los SCN se ha observado a nivel mundial y el manejo de esta resistencia a múltiples antimicrobianos implica un costo mayor en la salud, especialmente en los países subdesarrollados, donde no existen lineamientos apropiados para el empleo de los antimicrobianos y, por consiguiente, es frecuente la aparición de bacterias multirresistentes a los antibióticos. Estas cepas son altamente transmisibles y se diseminan rápidamente, debido a esto, se requiere tomar medidas de prevención y control a nivel hospitalario (Sandrea L, cols., 2007).

En cuanto a la susceptibilidad y resistencia a los agentes antimicrobianos se correlaciona con lo descrito en la literatura ya que, actualmente más del 99% de los aislados de SCN son productores de β -lactamasa y por ello son resistentes a penicilina (Álvares, Velazco E., 2008). La resistencia a oxacilina se observa con mayor frecuencia en las diferentes especies de SCN, que en *S. aureus*. Esta resistencia se debe a la expresión del gen *meca* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a, que posee baja afinidad por los β -lactámicos (Lowy y cols., 2003). Más del 70% de los aislamientos de SCN a nivel mundial son resistentes a oxacilina, en forma adicional estas cepas tienden a ser resistentes a otros agentes antimicrobianos (Castillo y cols., 2013). Por lo tanto, la detección de la resistencia a las penicilinas resistentes a penicilinasas (oxacilina, meticilina), en especies de *Staphylococcus* es indispensable, para evitar la administración innecesaria de glucopéptidos (Vancomicina), aunque los resultados de esta investigación no se

correlacionan con la literatura ya que solo el 22,22% de las cepas mostraron resistencia a oxacilina/meticilina.

La resistencia a los antimicrobianos entre los estafilococos frente a los antibióticos betalactámicos es un problema creciente. Esto ha llevado a un renovado interés en el uso de macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS_B antibióticos) para tratar infecciones por *Staphylococcus*. La resistencia a macrólidos se describió por primera vez como problema clínico con *S. aureus* a mediados de los años cincuenta, poco después del desarrollo de la eritromicina. Desde entonces, la resistencia de los estafilococos (*S. aureus* y SCN) oscila entre 1 al 25% o más, especialmente en cepas resistentes a oxacilina/meticilina (Lewis y cols., 2000)

En cuanto al mecanismo de resistencia inducible a clindamicina se convierte en una parte imprescindible de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana rutinaria para todos los aislados clínicos, debido a que la no detección de esta resistencia puede conducir a que la terapia con clindamicina sea un fracaso clínico (Shouval y cols., 2011). En este estudio, se encontró una baja tasa de resistencia inducible a clindamicina, obteniéndose solo un caso de D-test positivo fenotipo iMLS_B, representando la clindamicina una alternativa terapéutica.

En los laboratorios de microbiología clínica, en la mayoría de los casos se estudia la sensibilidad de los estafilococos a la gentamicina, amikacina y tobramicina, puesto que éstos son los de mayor utilización en la práctica clínica. La resistencia a este grupo de antibióticos se debe a la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, las cuales son codificadas por genes localizados en plásmidos o transposones, por lo tanto, la adquisición o la pérdida de resistencia puede ocurrir mucho más rápido que con otros antibióticos (Berger et al., 2002). En este estudio todas las aislados clínicos de SCN fueron sensibles a la gentamicina, netilmicina, y amikacina, por lo tanto estos antibióticos son buena opción para ser utilizados como tratamiento de elección. Además el 40% y 30%

de las cepas mostraron resistencia a kanamicina y tobramicina respectivamente.

Debido a la baja resistencia a las fluoroquinolonas observada en el presente estudio, Ciprofloxacina 33.3% y Moxifloxacina 22.2%, las mismas representan una buena opción terapéutica para tratar las infecciones por SCN.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

El análisis de la identificación y los antibiogramas de los aislados clínicos de SCN sometidos a esta investigación y la detección fenotípica de mecanismos de resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos utilizados de primera línea para tratar las infecciones ocasionadas por este grupo bacteriano, permiten concluir lo siguiente:

- El sistema comercial API® STAPH (BioMérieux) permitió identificar todos los aislados clínicos de tracto reproductor en acahuales, siendo la especie más frecuente *S. epidermidis* (4/9), seguido de *S. caprae* (2/9) y el resto de los aislados clínicos: *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus* y *S. scheeleiferi*.
- La mayoría de los aislados clínicos de SCN fueron resistentes a la Penicilina por la presencia de la penicilinasa (88,8%) y en el caso de *S. epidermidis* fue del 100%.
- Solo un aislado de *S. epidermidis* y uno de *S. caprae* fue resistente a la oxacilina (44,4%) mediada por la expresión del gen *mecA*.
- Solo un aislado de *S. epidermidis* (11.1%) expresó resistencia inducible a la clindamicina, D test positivo, fenotipo iMLS_B.
- Los diferentes antibiogramas (8) observados en el presente estudio permiten inferir que las cepas de SCN que circulaban en los pacientes que asistieron a consulta en el CEDIEG por fertilidad durante el período 2015-2016 son diferentes clones.

- Como la patogenicidad de los SCN varía con la especie, es fundamental que los laboratorios clínicos identifiquen a nivel de especie este grupo bacteriano, para realmente conocer su importancia clínica-epidemiológica.
- La interpretación de las pruebas de susceptibilidad de acuerdo al CLSI 2017 en el género *Staphylococcus* depende en algunos casos de la especie, esta afirmación resalta la importancia de la identificación a nivel de especie de los SCN.
- Cuando se realice el antibiograma de debe realizar de manera rutinaria la detección fenotípica de mecanismos de resistencia bacteriana en el género *Staphylococcus*, con la finalidad de evitar fallas terapéuticas en el tratamiento de las infecciones ocasionadas por estos microorganismos frente a los antimicrobianos utilizados de primera línea (betalátamicos, macrólidos y lincosaminas).

www.bdigital.ula.ve

RECOMENDACIONES

- Realizar el estudio con mayor número de aislados clínicos de SCN.
- Investigas la expresión de factores de virulencia en aislados clínicos de SCN.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeyundara PK, Dissanayake D, Wijesinghe PS, Perera R, Nishad A. Efficacy of two sperm preparation techniques in reducing non-specific bacterial species from human semen. *Journal of human reproductive sciences*. 2013; 6 (2): 152-7.

Álvarez M, Velazco E, Nieves B, Alviárez E, Araque M, Sa la zar E, et al. Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa aisladas de una unidad de alto riesgo neonatal. *Kasmera* 2008; 36: 7 – 16.

Andrade-Rocha FT. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. *Urol Int* 2003;71(4):377-81. 21.

Amorós EF. Consentimiento a la reproducción. Crisis de pareja y disposición de embriones: Atelier Libros; 2011.

Bailey RR. Significance of coagulase-negative *Staphylococcus* in urine. *J Infect Dis* 1973;127(2):179-82.

Berger-Bächli B. Resistance mechanisms of Gram positive bacteria. *Int J Med Microbiol*. 2002; 292: 27- 35.

Cataño J RS, Díaz J, Samacá Y, Wilde T. *Urología Práctica*. Javeriana PU, editor 2006.

Cercenado E. *Staphylococcus lugdunensis*: un estafilococo coagulasa negativo diferente de los demás. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27 (3): 139-42. 23.

Cortes J, Leal A, Montañez A, Buitrago G, Castillo J, Guzman, L. Frequency of microorganisms isolated in patients with bacteremia in intensive care units in Colombia and their resistance profiles. *Braz J Infect Dis.* 2013; 17: 346- 52.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

Dagan R., Fox B. (2012). Trimetropim Sulfametoxazol. *Clínica Carmillot*, 7-12.

De Paulis A, Predari S, Chazarreta C, Santoianni J. Five-test simple scheme for species-level identification of clinical significant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1219-24.

Dohle GR. Inflammatory-associated obstructions of the male reproductive tract. *Andrologia* 2003;35(5):321-4.

Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:315-6.

Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillen R, et al. *Staphylococcus coagulasa-negativa* clínicamente significativas. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista chilena de microbiología* 2013;30(5) 480-8.

Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in

Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2003; 41:4740-4.

Galarzo Pardo S, Cano Chaves MA, Puerta Suárez J, Giraldo M, Myorga B, Cadavid AP, et al. Efecto de los factores solubles de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus epidermidis* sobre la funcionalidad espermática. Revista Chilena de obstetricia y ginecología. 2015; 80 (4); 316-23.

Goldstein, F.W., Coutrot, A., Sieffer, A., Acar, J.F. Percentages and distribution of teicoplanin- and vancomycin-resistant strains among coagulase-negative staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 899-900.

Hébert G A. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. J Clin Microbiol 1990; 23: 1425-31.

Hooton TM. Pathogenesis of urinary tract infections: An update. J Antimicrob Chemother 2000; 46 (Suppl. S1): 1-7.

Howes DS, Henry SM. Urinary Tract Infection, Female. 2005. Emedicine: <http://www.emedicine.com/EMERG/topic626.htm>

Koneman EW, Allen S. Koneman Diagnostico Microbiológico/ Microbiological diagnosis: Texto y atlas en color/ text and color atlas: Ed. Médica Panamericana; 2008.

Klingenberg A, Rønnestad A, Anderson T, Abraham sen J, Zorman A, Villaruz T, et al. Persistent strains of coagulase negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. Clin Microbiol Infect. 2007; 13: 1100–1111.

La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Salmeri M, Morgia G, Favilla V, et al. Microbiological investigation in male infertility: a practical overview. *J Med Microbiol* 2014;63:1-4.

Levin TP, Suh B, Axelrod P, Truant AL, Fekete T. Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: Report of a clinical failure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1222-4.

Lewis M, Gales A, Sader H, Pfaller M, Jones R. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated for Latin 60 American patients with a diagnosis of pneumonia: results from the SENTRY. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000;37:63-74.

Lorio N L, Ferreira R B, Schuenck R P, Malvar K L, Brillhante A P, Nunes AP, et al. Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2564-9.

Lowy F. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003; 111: 1265- 1273.

Lozano Hernandez R., Vivas Acevedo G., De Vera Mgm. *Mycoplasma* y anticuerpos anti *Chlamydiae* en semen de hombres infértiles y su relación con la calidad seminal y los marcadores de glándulas sexuales accesorias. *Investigación clínica* 2012,53(2).

Lu Y, Bhushan S, Tchatalbachev S, Marconi M, Bergmann M, Weidner W, et al. Necrosis is the dominant cell death pathway in uropathogenic *Escherichia coli* elicited epididymo-orchitis and is responsible for damage of rat testis. *PLoS One* 2013;8(1):e52919.

Marín M., Gudiol T. (2003) Anticibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecciosas y Bacteriología Clínica, 21, (1), 42-55.

Mateo M, Maestre J R, Aguilar L, Cafini F, Puente P, Sánchez P, et al. Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to susceptibility and identification, of 17 clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 287-91.

Mendoza, N. (2005). Actualidades Farmacológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 45-50.

Morosini MI et al / Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30(6):325–332. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos.

Nabón A. Staphylococcus aureus resiste te a beta lactámicos en infecciones detectadas en la comunidad. Salud Militar. 2006; 28(1). Disponible en: <http://www.dnsffaa.gub.uy/revista/Volumen28/Staphylococcus%20aureus.pdf>. Acceso 12 de septiembre 2017.

OMS. Infecciones de transmisión sexual. Nota descriptiva N°110 de agosto de 2011. 2011; Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es/>. Acceso 12 de septiembre de 2017.

Lea T, Mao L, Bath N, Prestage G, Zablotska I, de Wit J, et al. Injecting drug use among gay and bisexual men in Sydney: prevalence and associations with sexual risk practices and HIV and hepatitis C infection. AIDS Behav 2013;17(4):1344-51.

Lozano Hernandez R, Vivas Acevedo G, de Vers MGM. Mycoplasma y anticuerpos anti-*Chlamydia* en semen de hombres infértiles y su relación con la calidad seminal y los marcadores de glándulas sexuales accesorias. *Investigación clínica* 2012;53(2).

Murray P., Baron E., Tenover J., Tenover F. Manual of Clinical Microbiology. 8th Edition. (2003). American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Pigrau C, Horcajada JC, Cartón JA, Pujol M, Mensa J. *Infección urinaria. Protocolos Clínicos SEIMC 2002*. www.seimc.org/protocolos/clínicos/proto4.htm.

Puerta Suárez J, Giraldo M, Cadavid AP, Candina Maya E. Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*. 2011;79(3)209-7.

Rivas K., Rivas M., y Dávila F. (2002). Cefalosporinas de la primera a la cuarta generación. *Revista de la Facultad de Medicina*, 25, (2), 30-35.

Rosa DJ. *Introducción a la ciencia de los animales de laboratorio* 2000.

Ruiz VA, Guillen SM. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*: Ed Medica Panamericana. 2006.

Rybar R, Prinosilova P, Kopecka V, Hlavicova J, Veznik Z, Zajicova A, et al. The effect of bacterial contamination of semen on sperm chromatin integrity and standard semen parameters in men from infertile couples. *Andrologia* 2012;44Suppl 1:410-8.

Sánchez L., Saenz E., y Pancorbo J. (2004). Antibióticos sistemáticos en dermatología. *Dermatología Peruana*, 14, (1), 7-20.

Sandrea L, Paz A, Piña E. Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de hemocultivos en un Hospital Universitario de Venezuela. *Kasmera* 2007;35(1):15-25.

Seng P, Barbe M, Pinelli PO, Gouriet F, Drancourt M, Minebois A, Cellier N, Lechiche C, Asencio G, Lavigne JP, Sotto A, Stein A. 2014. *Staphylococcus caprae* bone and joint infections: a re-emerging infection? *Clin Microbiol Infect* 20:O1052–O1058.

Sussmann O. (2013). Resistencia Bacteriana. Unidad de Infectología Hospital Universitario San Ignacio. Bogotá, Colombia. 6-13.

Shouval D, Samra Z, Shalit I, Livni G, Bilvasky E, Ofir O. et al. Inducible clindamycin resistance among methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients. *Isr Med Assoc J.* 2011; 13(10):605-608.

Stamen A, Schreder, Marcus A Krupp, Lawrence M Tierney Jr., Stephen J Mcphee. Diagnóstico clínico y tratamiento. 32ª ed. Manual Moderno. 2000: 634-638.

Taconelli E, Tumbarello M, Donati K, Bettio M, Spanu T. and Leone F. Glycopeptide resistance among coagulase -negative *Staphylococci* that cause bacteremia: Epidemiological and clinical findings from case -control study. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1628-1635.

Tan TY, Ng SY, Ng WX. Clinical significance of coagulasenegative staphylococci recovered from nonsterile sites. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3413-4.

Teppa-Garron Ad, Palacios-Torres A. (Current evaluation of male infertility). *Investigación clínica.* 2004; 45 (4): 355-70.

Villegas J, Schulz M, Soto L, Sanchez R. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis* 2005; 10(1):105-10.

Weng-Alemán, Z., Álvarez M., I., Díaz R., O.E., & Rodríguez S., M. (2003). Recobrado de *Salmonella* sp. conservada por método simple a temperatura ambiente. *VacciMonitor*, 12(3), 5-10.

Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

Wikler, M.A. Cockerill, F R., Bush, K., Dudley, D. W., Ferraro, M. J., Swenson., J M., Hindler. 2009. Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con disco. Norma aprobada Decima edición. Instituto de Estandares Clinicos y de Laboratorio. 29(1): 41.

Zamora R., Areu A., y Gundian L (1998). Cefalosporinas. *Acta Médica*. 8, (1), 40-47.

[www,bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)