

MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Tilman Brunker**, Nidia González***, Oscar Prendas**
y Bernal Fernández**

Resumen

Se describe un medio líquido para el enriquecimiento selectivo de estafilococos a base de caldo tripticasa-soya más suficiente cloruro de sodio para llevarlo al 6,5 por ciento.

Se evalúa este caldo salado en cuanto a su eficiencia en el aislamiento de *S. aureus* a partir de la orofaringe de 133 empleados hospitalarios, encontrándose que, cuando se usa este caldo previo a rayar el material sobre agar manitol sal, los estafilococos se aíslan de los portadores en una proporción 57,4 por ciento mayor que cuando se emplea sólo agar manitol sal.

Los autores consideran que la confirmación de estas observaciones obligaría a revisar algunas conclusiones sobre la presencia de estafilococos en humanos. (Rev. Cost. Cienc. Méd., Dic. 1981:2(2):).

Introducción

La necesidad de lograr el aislamiento primario de *Staphylococcus aureus* a partir de cultivos mixtos, en los que estas bacterias pueden constituir tan sólo una fracción muy pequeña de la población total (como en heces), y el poder hacer una pronta y fácil diferenciación entre *S. aureus* y *S. epidermidis*. ha movido a numerosos investigadores a ensayar y proponer una variedad de medios selectivos y diferenciales. Empleando el cloruro de sodio como agente selectivo y el manitol y la gelatina como sustratos diferenciales, Chapman (4, 5, 6) propuso los bien conocidos medios sólidos de aislamiento directo: agar manitol sal, medio *Staphylococcus* No. 110 y agar Chapman-Stone. También, haciendo uso del cloruro de sodio al 10 por ciento, Maitland y Martyn (16) formularon un medio líquido de enriquecimiento selectivo para los estafilococos que se encuentran en material altamente contaminado con flora mixta.

Ludlam (15) propuso un medio sólido con telurito y cloruro de litio como agentes selectivos, el cual ha sido criticado (7, 17) porque inhibe el crecimiento de una proporción significativa de estafilococos coagulasa positivos.

Finegold y Sweeney (10) presentaron un medio base de agar nutritivo con 75 μg por ml de polimixina B como agente selectivo, al cual atribuyen una serie de ventajas sobre los medios desarrollados por Chapman. Este medio fue modificado por Deneke y Blobel (9) reemplazando el caldo nutritivo con infusión de cerebro y corazón y, para darle además el carácter de diferencial, sobre el agar ya solidificado esparcieron una pequeña cantidad de plasma de conejo o de solución de fibrinógeno bovino, lo cual permite observar la capacidad de producción de coagulasa de cada colonia.

* Trabajo financiado en parte por la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica, Proyecto No. 02—07—10—23.

** Departamento de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

*** Laboratorio del Hospital San Francisco de Asís, Caja Costarricense de Seguro Social, Grecia, Costa Rica.

Empleando telurito y glicina, Zebovitz *et al.* (23) formularon un medio sólido selectivo y diferencial, el que luego es modificado por Heeschen *et al.* (13) omitiendo el agar para así obtener un medio líquido de enriquecimiento selectivo. Estos medios de telurito presentan inconvenientes de preparación, de estabilidad y de variabilidad de acción (13, 23).

Aquí describimos y evaluamos un medio líquido de enriquecimiento selectivo para estafilococos, el cual es fácil de preparar, estable y muy eficiente.

Materiales y Métodos

Muestras clínicas. A cada una de 133 personas aparentemente sanas (todas empleados del Hospital de Grecia) se les tomó una muestra de la orofaringe utilizando para ello un hisopo de algodón estéril. Este muestreo se repitió en las mismas personas en dos oportunidades adicionales separadas entre sí por aproximadamente 10 días.

Método de aislamiento directo. Inmediatamente después de obtenida la muestra de la orofaringe se sembró con el hisopo, por rotación, poco más o menos una octava parte de la superficie de un plato con agar manitol sal (Difco B30), procediéndose luego a esparcir el inóculo en toda el área con un asa estéril. Después de 24 horas de incubación a 36°C se procedió a revisar los platos en busca de colonias fermentadoras del manitol, sugestivas de *S. aureus*. A las cepas aisladas se les practicó prueba de catalasa, se les hizo frotis y tinción de Gram, así como la prueba de coagulasa en lámina, empleando plasma de conejo (2).

Método de enriquecimiento selectivo. Asépticamente se quebré el palillo del hisopo recién empleado para inocular los platos por el “método directo” dejando que la parte con el algodón cayera dentro de un tubo de 15 x 125 mm, conteniendo caldo tripticasa-soya (Difco B370—01) al que se le adicioné cloruro de sodio para llevar la concentración de esta sal al 6,5 por ciento (“caldo salado”). Después de incubar a 36°C durante la noche, se mezcló bien el contenido de los tubos de “caldo salado” empleando un hisopo estéril para cada uno y con estos se sembraron los respectivos platos de agar manitol sal, los cuales se trataron como se indicó bajo el “método directo”.

Para efectos del presente trabajo consideramos como muestras positivas por *S. aureus* aquellas en las que observamos colonias morfológicamente compatibles con las de esta bacteria, que fermentaran el manitol, demostraran contener cocos grampositivos de agrupación característica y, además, dieran positivas las pruebas de catalasa y de coagulasa.

Resultados y Discusión

Al formular un medio líquido para el enriquecimiento selectivo de estafilococos deseamos que fuera fácil de preparar a partir de componentes usuales de medios de cultivo y además, estable y eficaz. Escogimos el cloruro de sodio como agente selectivo por su conocida capacidad para inhibir a muchos tipos de microorganismos y ajustamos su concentración al 6,5 por ciento buscando un equilibrio entre la selectividad y la eficiencia de aislamiento de estafilococos. Busta y Jezeski (1) y otros (20) han demostrado una relación inversa entre la concentración de cloruro de sodio y la obtención de estafilococos fisiológicamente lesionados; también se ha encontrado un efecto adverso de la alta concentración del cloruro de sodio sobre la probabilidad de iniciación del crecimiento por células

de *S. aureus* (12) así como una disminución en la tasa de crecimiento de dicha bacteria frente a concentraciones crecientes de cloruro de sodio (11). Peterson *et al.* (18) determinaron que si bien la concentración alta de esta sal retardaba marcadamente a los saprófitos, también limitaba la población máxima de los estafilococos en cultivo mixto.

El uso de nuestro medio para el enriquecimiento selectivo de estafilococos en las muestras obtenidas de los empleados hospitalarios se tradujo en un aumento marcadamente alto de aislamientos de *S. aureus* (57,4 por ciento) con respecto a lo logrado empleando la técnica de aislamiento directo. En el Cuadro 1 se observa la decidida ventaja que significó en cada uno de los tres experimentos el enriquecimiento de las muestras en "caldo salado" previo al rayado en el mismo medio que utilizamos para el aislamiento directo. Debemos tener presente que el hisopo con la muestra obtenida se usó primero para rayar el plato del método directo y luego para inocular el "caldo salado", dándole así algún beneficio al primero.

CUADRO 1
COMPARACION ENTRE LOS METODOS DIRECTO Y DE ENRIQUECIMIENTO
PREVIO EN EL AISLAMIENTO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
A PARTIR DE 133 PERSONAS APARENTEMENTE SANAS

EXPERIMENTO No.	AISLAMIENTOS				
	Método directo		Método de enriquecimiento		Aumento relativo
	No.	%	No.	%	%
1	75	56,4	116	87,2	54,7
2	74	55,6	124	93,2	67,6
3	84	63,2	127	95,5	51,2
Promedio	77,7	58,4	122,3	92,0	57,4

Nuestros resultados sugieren que, cuando se emplea un hisopo de algodón para transferir por rotación una muestra a la superficie de un medio sólido de aislamiento directo, no todas las unidades formadoras de colonias (UFC) atrapadas por el algodón son transferidas o crecen en la superficie del medio. Nuestro caldo salado permite la proliferación de las UFC atrapadas entre las fibras de algodón y su subsiguiente desprendimiento hace posible recuperarlas luego sobre el medio sólido. Sería deseable demostrar si existe alguna diferencia significativa cuando muestras iguales de estafilococos son esparcidas en un medio de aislamiento directo, en un caso sobre la superficie y en el otro mediante vaciado.

En su revisión sobre portadores sanos de *S. aureus*, Williams (22) señala que en la mayoría de los estudios hechos al respecto en cuanto al aparato respiratorio se ha tornado el camino fácil, muestrear el vestíbulo de la nariz siendo pocos en los que se ha medido la frecuencia de portación en la nasofaringe. Dentro de estos últimos, Vogelsang (21) encontró que un 45 por ciento de los adultos se encontraban colonizados y Laurell y Mellbin (14) hallaron que el 50 por ciento de los niños entre 7 y 14 años albergaban estafilococos en su garganta. Ambos estudios corresponden a países escandinavos. En contraste con estos datos, Campbell (3) encontró en Inglaterra sólo un 4 por ciento de portadores orofaríngeos.

Nosotros optamos por estudiar la presencia de *S. aureus* en la orofaringe de adultos aparentemente sanos, todos empleados hospitalarios, y lo encontramos con una frecuencia del 58 por ciento mediante un método usual de aislamiento directo, cifra que se elevó a un 92 por ciento empleando nuestro "caldo salado" como medio de enriquecimiento selectivo.

Creemos que si se adoptara la práctica del enriquecimiento previo al uso del medio sólido, las cifras (25 a 46 por ciento) obtenidas por diferentes autores (8, 19, 22) para portadores sanos de estafilococos en nariz subirían muy apreciablemente. La confirmación de nuestras observaciones llevaría necesariamente a revisar algunas conclusiones de tantos trabajos en los que la presencia de estafilococos se determinó haciendo uso del aislamiento directo con hisopo sobre la superficie de medios sólidos.

ABSTRACT

A selective enrichment medium for the isolation of S. aureus was prepared by bringing the concentration of sodium chloride in trypticase soy broth to 6.5 per cent.

In order to evaluate our proposed medium, the throats of 133 hospital employees were swabbed on three different opportunities at approximately 10-day intervals and the material was streaked on mannitol salt agar. The same swab was aseptically dropped into a tube of our "salt broth" and, after overnight incubation, the resulting culture was streaked on mannitol salt agar. Through the use of this enrichment medium we were able to obtain an average of 57,4 per cent more isolates of S. aureus than by using only mannitol salt agar.

We feel that once these results have been confirmed and extended, it will be necessary to go over some of the concepts concerning the presence of staphylococci in humans.

Bibliografía

1. Busta, F. F. & Jezeski, J. J. Effects of sodium chloride concentration in an agar medium on growth of heat-shocked *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol* 1963; 11:404—407.
2. Cadness-Graves, B., Williams, R., Harper, C. J. & Miles, A.A. Slide test for coagulase positive staphylococci. *Lancet* 1943; 2:736—738.
3. Campbell, A.C.P. The incidence of pathogenic staphylococci in the throat with special reference to glandular fever. *J. Pathol. Bacteriol.* 1948:60:157—169.
4. Chapman, G. H. The significance of sodium chloride o studies of staphylococci. *J. Bacteriol.* 1945; 50:201 —203.
5. Chapman, G. H. A single culture medium for selective isolation of plasma-coagulating staphylococci and for improved testing of chromogenesis, plasma coagulation, mannitol fermentation, and Stone reaction. *J. Bacteriol.* 1946; 51:409—410.
6. Chapman, G. H. An improved Stone's medium for the isolation and testing of food poisoning staphylococci. *Food Research* 1948; 13:100—105.
7. Chapman, G. H. Comparison of Ludlam's medium with staphylococcus medium 110 for the isolation of staphylococci that clot blood. *J. Bacteriol.* 1949; 58:823.

8. Davis, N. A. & Davis, G. H. G. Ecology of nasal staphylococci. *J. Bacteriol.* 1965; 89:1163-1168.
9. Denecke, A. & Blobel, H. Fibrinogen media for studies on staphylococci. *J. Bacteriol.* 1961; 83:533—537.
10. Finegold, S. M. & Sweeney, E. E. New selective and differential medium for coagulase-positive staphylococci allowing rapid growth and strain differentiation. *J. Bacteriol.* 1961;81:636—641.
11. Genigeorgis, C., Foda, M. S., Mantis, A. & Sadler, W. W. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. *Appl. Microbiol.* 1971; 21:862—866.
12. Genigeorgis, C., Martin, S., Franti, C. E. & Rieman, H. Initiation of staphylococcal growth in laboratory media. *Appl. Microbiol.* 1971; 21:934—939.
13. Heesch, W., Tolle, A. & Zeidler, H, Die selektive Züchtung und Anreicherung koagulasepositiver Staphylokokken und euterpathogener Streptokokken in flüssigen Nährmedien, p. 326—327. In *Merck's Handbook of Microbiology*, Darmstadt, Rep. Federal de Alemania, E. Merck, 1968.
14. Laurell, G. & Mellbin, T. The bacterial flora of the upper respiratory tract and gut of children of nomad Lapps. *Acta Paediat.* 1961; 50:469—483.
15. Ludlam, G. B. A selective medium for the isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated material. *Monthly Bull. of the Ministry of Health* 1949; 8:15 20.
16. Maitland, H. B. & Martyn, C. A selective medium for the isolation of *Staphylococcus* based on the differential inhibiting effect of increased concentration of sodium chloride, *J. Pathol. Bacteriol.* 1948;60:553 -561.
17. McDivitt, M. E. & Hussemann, D. L. Comparison of three media for the isolation of enterotoxigenic micrococci. *Am. J. Public Health*, 1954;44:1455 -1459.
18. Peterson, A. C., Black, J. J. & Gunderson. M. F. Staphylococci in competition. III. Influence of pH and salt on staphylococcal growth in mixed populations. *Appl. Microbiol.* 1964; 12:70-76.
19. Phair, J. P., Watanakunakorn, C. Goldberg, L. & Charlton, J. Ecology of staphylococci in a general medical service. *Appl. Microbiol.* 1972; 24:967—971.
20. Smolka, L. R., Nelson, F. E. & Kelley, L. M. Interaction of pH and NaCl on enumeration of heat-stressed *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 1974: 27:443—447.
21. Vogelsang, T. M. Carriage of phage patterns of pathogenic staphylococci in medical students. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1958; 43:196—210.
22. Williams, R. E. C. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol. Rev.* 1963; 27:56—71.
23. Zebovitz, E., Evans, J. B. & Niven, Jr., C. F. Telluriteglycine agar: A selective plating medium for the quantitative detection of coagulase-positive staphylococci. *J. Bacteriol.* 1955; 70:686—690.