



**" EVALUACION DE LA FAGOCITOSIS Y
DIGESTION INTRACELULAR POR LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES DE INDIVIDUOS SANOS
PARA DOS ESPECIES DE ESTAFILOCOCOS
COAGULASA NEGATIVOS "**

TESIS

**QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA**

PRESENTA:

O.C.B. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALES

MONTERREY, N.L.

NOVIEMBRE DE 1990

TM

Z6658

FM

1990

R58



1020071189

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**

TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN

MICROBIOLOGIA MEDICA

PRESENTA:

Q.C.B. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALES

MONTERREY, N.L.

NOVIEMBRE DE 1990

TM
26658
FM
1990
R 58



162848

"EVALUACION DE LA FAGOCITOSIS Y DIGESTION INTRACELULAR
POR LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES DE INDIVIDUOS SANOS
PARA DOS ESPECIES DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS".


PRESIDENTE : DR. MANUEL RODRIGUEZ QUINTANILLA.


SECRETARIO : M. EN C. IRMA ALICIA SALINAS GONZALEZ.


1er. VOCAL : DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA.


2do. VOCAL : DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA.


3er. VOCAL : M. EN C. MA. ALICIA SUAREZ SEMOUR.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL DEPARTAMENTO
DE INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA U.A.N.L.

BAJO LA ASESORIA DE :

DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA

DEDICATORIA.

A DIOS NUESTRO SEÑOR.

POR CONCEDERME LA MARAVILLA DE VIVIR Y PERMITIRME LLEGAR
AL FINAL DE ESTE TAN ANHELADO TRABAJO.

A MI MADRE.

PROFRA. MA. GUADALUPE MORALES DE RIVERA.

(IN MEMORIAM)

POR SU EJEMPLO COMO MADRE Y PROFESIONISTA, POR SU FORTALEZA,
CONSTANCIA Y TENACIDAD EN ALCANZAR SIEMPRE CUALQUIER OBJETIVO
QUE UNO SE PROPONGA REALIZAR.

A MI PADRE.

SR. LUIS ALBERTO RIVERA FLORES.

POR SUS CONSTANTES ESTIMULOS Y DECIRME !VAMOS HIJA, TU PUEDES,
ADELANTE!

A MI ESPOSO.

Q.B.P. JUAN MANUEL ADAME RODRIGUEZ.

POR SU AMOR Y CONFIANZA, POR ACOMPAÑARME EN LOS TIEMPOS DIFICILES,
DUROS Y CANSADOS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL, HACIENDO A VECES CASO
OMISO DE SUS COMPROMISOS, POR AYUDARME A VENCER LOS OBSTACULOS Y
ASI PODER ALCANZAR MI META PROPUESTA.

DEDICATORIA

A MI HIJA.

LYDIA MARCELA ADAME RIVERA.

ORGULLO DE MI VIDA.

A ELLOS DOS.

QUE AUNQUE TODAVIA NO LOS CONOZCO, ME HAN ACOMPAÑADO EN TODO
MOEMENTO DESDE HACE 8 MESES EN LA PARTE FINAL DE LA TESIS.

A MIS HERMANOS.

POR SU CARIÑO Y COMPRENSION.

AGRADECIMIENTOS.

A MI ASESORA.

DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA.

POR SU CONSTANTE ASESORIA, POR ENSEÑARME QUE EL EXITO ES FRUTO
DEL TRABAJO, POR CREER Y CONFIAR EN MI EN QUE LLEGARIA AL TERMI
NO DE ESTE TRABAJO Y CUYA IMAGEN ME MOTIVA A SEGUIRME SUPERANDO.

A G R A D E C I M I E N T O S .

A MIS COASESORES.

DR. JAVIER RAMOS JIMENEZ Y DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA.

POR SUS SUGERENCIAS Y COMENTARIOS Y SU AYUDA INCONDICIONAL
EN LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

AL :

DR. AMADOR FLORES ARECHIGA.

POR SU SIEMPRE APOYO PARA QUE PUDIERA CONSEGUIR MI SUPERACION
PERSONAL Y ACADEMICA.

A G R A D E C I M I E N T O S .

A:

Q.C.B. MAYELA CARMONA PEÑA.
TEC. EN LAB. ANASTACIO TORRES SEGOVIA.
Q.C.B. ISABEL PEREZ RIVERA.
Q.C.B. ERNESTO TORRES LOPEZ.
Q.F.B. MIGUEL A. HERNANDEZ BALBOA.
SECRETARIA. MA. DEL REFUGIO REYES CEDILLO.

POR SU VALIOSA COOPERACION, SIN LA CUAL NO HUBIERA PODIDO REALIZAR ESTE TRABAJO.

,

A:

MIS MAESTROS Y AMIGOS.

POR SUS CONSTANTES ESTIMULOS Y BRINDARME SU APOYO PARA SEGUIR ADELANTE.

A:

TODOS MIS COMPANEROS Y PERSONAL ADMINISTRATIVO DEL DEPTO. DE INMUNOLOGIA, PATOLOGIA CLINICA Y MICROBIOLOGIA QUE DE ALGUNA MANERA COLABORARON CONMIGO DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

I N D I C E .

| | PAGINA. |
|-----------------------------------|---------|
| I.- INTRODUCCION | 10 |
| II.- HIPOTESIS | 15 |
| III.- OBJETIVOS | 16 |
| IV.- MATERIAL Y METODOS | 17 |
| V.- RESULTADOS | 24 |
| VI.- DISCUSION | 48 |
| VII.- CONCLUSIONES | 56 |
| VIII.- RESUMEN | 58 |
| IX.- BIBLIOGRAFIA | 60 |

I N T R O D U C C I O N

Los estafilococos son miembros de la familia Micrococcaceae, (26) son cocos gram positivos, inmóviles, catalasa positivos, aeróbicos y anaeróbicos facultativos y crecen agrupándose comúnmente en racimos irregulares (griego Staphyle:racimos de uvas). (1,2).

El primero en describir al estafilococo en el pus humano, fué Roberto Koch en el año de 1878. Dos años después, Pasteur cultivó a este germen en medio líquido y al año siguiente Ogston mostró que era patógeno para los animales de experimentación como los ratones y cobayos. En 1884, Rosenbach describió dos especies, éstas fueron distinguidas de acuerdo a su patogenicidad para el hombre: las especies de Staphylococcus aureus fueron consideradas como patógenas y las especies de Staphylococcus epidermidis como las especies no patógenas.(1).

Estas especies pueden ser distinguidas por las pruebas de fermentación del manitol y por la producción de la coagulasa. Estas pruebas son positivas para S. aureus y negativas para S. epidermidis. (2).

Las especies de S. aureus causan la mayoría de las infecciones supurativas superficiales, éstas tienden habitualmente a permanecer localizadas en forma de abscesos, diviesos, pústulas, furúnculos y en un gran porcentaje, son causantes de envenenamiento alimentario. Del 20-60% de los seres humanos son portadores de este microorganismo en sus fosas nasales, su capacidad para producir enfermedad no ha disminuido aún con la introducción de los antibióticos, ya que son a menudo resistentes a uno o más de los agentes antimicrobianos. (2,3).

Por otro lado, las especies de estafilococos coagulasa negativos, forman un grupo de bacterias consideradas como saprofiticas para el hombre ya que son parte de la flora normal de la piel. Además, contribuyen significativamente al metabolismo de los productos de desecho de varias sustancias excretadas por la piel y las glándulas, proporcionando las condiciones necesarias que limitan el crecimiento de diversos patógenos. (3).

Actualmente, son reconocidas más de 20 especies de estafilococos coagulasa negativos entre ellas están:

S. epidermidis, S. saprophyticus, S. haemolyticus, S. hominis,
S. capitis, S. cohnii, S. simulans, S. warneri, S. auricularis,
S. sciuri, S. xylosus y otros más. (3).

Ordinariamente, los estafilococos coagulasa negativos son microorganismos de baja virulencia que no suelen ocasionar infecciones en el hombre a menos que exista una alteración de las barreras naturales de las defensas del huésped causadas por cirugía, colocación de catéteres, inserción de prótesis, sondas de plástico intravasculares o de una derivación, o bien, en huéspedes inmunosuprimidos tales como: neonatos prematuros, pacientes con carcinoma o granulocitopenia y aquellos que han recibido transplantes y que están bajo terapia inmunosupresora. (4,5,6,7,8).

Se ha observado un marcado incremento de la susceptibilidad a la infección por cuerpo extraño causadas por este tipo de -- microorganismos.(4,5,6,7,8). Una probable explicación de esto, es que los estafilococos coagulasa negativos son capaces de adherirse y persistir en superficies de material de plástico. (9,10, 11,12,13,14).

Bayston y Penny (15) observaron, que de las derivaciones ventriculares infectadas se producía una sustancia mucóide que facilitaba la colonización de las superficies plásticas. Estudios sobre la composición química de este material demostraron que está constituida de un 40% de carbohidratos y 27% de proteínas aproximadamente (16), recientemente, se ha detectado que la galactosa y la manosa son los principales carbohidratos presentes

(17). Otros estudios sugieren que especies productoras de este material mucoso llamado glicocalix (slime), tienen mayor virulencia cuando está presente el cuerpo extraño (9,10,11).

Un factor patogénico adicional en las infecciones por estafilococos coagulasa negativos son los cambios erosivos que se manifiestan en la superficie inerte de las válvulas o catéteres, estas alteraciones han sido demostradas después de la adherencia de dichos microorganismos in vitro.(9,10). Estos estudios explican la gran dificultad de la erradicación de este tipo de infecciones sin antes remover el cuerpo extraño.

Se ha reportado que ciertas especies de estafilococos coagulasa negativos, se aíslan más frecuentemente de cuadros clínicos en el humano(4,5,6). Lo que se conoce actualmente es que los mecanismos patogénicos básicos de los microorganismos considerados como saprofiticos, sólo se ponen de manifiesto cuando se produce un rompimiento directo de las barreras naturales de defensa, la presencia de un cuerpo extraño y probablemente al factor de colonización producido por los estafilococos coagulasa negativos.

Por otro lado, el desconocimiento de si poseen mecanismos de evasión de la actividad fagocitaria y bactericida de los leucocitos polimorfonucleares, plantean la problemática de que dicha

resistencia bacteriana sea debida a la producción de substancias que de alguna manera pudieran afectar la fagocitosis o bien la muerte y digestión intracelular y por lo tanto, contribuir a la virulencia de este grupo bacteriano.

H I P O T E S I S

La alta frecuencia de infecciones por cuerpo extraño producidas por Staphylococcus epidermidis, es debido a que este microorganismo es capaz de evadir los mecanismos de la fagocitosis y digestión intracelular por leucocitos polimorfonucleares.

OBJETIVOS

- 1.- Demostrar si los estafilococos coagulasa negativos que más frecuentemente causan patogenicidad para el humano son capaces de resistir la fagocitosis de leucocitos polimorfonucleares obtenidos de individuos sanos en presencia de suero normal y suero inactivado.
- 2.- Demostrar si los estafilococos coagulasa negativos son capaces de resistir la digestión intracelular de leucocitos polimorfonucleares obtenidos de individuos sanos.
- 3.- Demostrar si hay diferencia en los tiempos de generación de las diferentes especies de estafilococos coagulasa negativos que pudieran intervenir en la virulencia.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

1.- ESPECIES BACTERIANAS UTILIZADAS Y SU MARCADO RADIOACTIVO.

Se utilizaron dos especies de estafilococos coagulasa negativos obtenidos del American Type Culture Collection Staphylococcus epidermidis (14990) y Staphylococcus capitis (27840). De un cultivo de 18 horas en agar Casoy de cada uno de estos microorganismos, se tomaron varias colonias y fueron inoculadas en 4.8 ml de caldo Casoy al cuál se agregó 0.2 ml de timidina tritiada (5.0 Ci/mmol). Después de 18 horas de incubación a 37°C, las bacterias fueron cosechadas y lavadas tres veces con solución salina estéril con un pH de 7.2 - 7.4. Posteriormente la suspensión bacteriana se ajustó a una concentración de $1.0 - 3.2 \times 10^6$ por espectrofotometría y confirmado por conteo en placa en el medio de agar Casoy en UFC/ml (18).

11.- OBTENCION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES DE SANGRE VENOSA PERIFERICA DE INDIVIDUOS SANOS.

Se obtuvieron 60 ml de sangre venosa periférica durante dos ocasiones de cinco sujetos sanos del sexo masculino en diferentes tubos estériles, 50 ml de esta sangre se repartieron

en alícuotas de 10 ml en cinco tubos estériles de 16 X 150 mm con heparina (10 unidades de heparina por cada mililitro de sangre) y los 10 ml restantes se colocaron en tubos de 13 X 100 mm para obtener suero fresco de cada uno de estos sujetos sanos.

Los leucocitos polimorfonucleares se obtuvieron por sedimentación en dextran (Sigma No.D-4751 MW: 82000) al 6% en solución salina estéril. A 3 ml de dextran, se mezclaron con 10 ml de sangre venosa periférica heparinizada. Se incubaron en baño maría a 37°C durante 45 minutos y se recolectó el plasma rico en leucocitos con una pipeta pasteur estéril en tubos de centrifuga de 15 ml estériles. Se centrifugaron a 180 g (1200 rpm) durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el botón leucocitario se lavó tres veces con el medio de cultivo comercial RPMI 1640 (Sigma No. R-4130). La población celular se ajustó a una concentración de 1×10^6 células por ml (18).

111.- FUENTES DE OPSONINAS Y OPSONIZACION DE BACTERIAS

Se obtuvieron de 5-10 ml de sangre venosa periférica de veinte donadores voluntarios sanos. Las muestras, se colocaron en tubos estériles, se dejaron coagular y se obtuvo el suero de cada una. Posteriormente se mezclaron los sueros y se guardaron en alícuotas de 2 ml en congelación a -70°C hasta su uso como fuente de opsoninas.

Para la opsonización bacteriana, se utilizó el método propuesto por Verbrugh y cols (18). De cada 2 ml de suero congelado a -70°C , 1 ml se dejó en hielo y 1 ml se inactivó a 56°C por 30 minutos. Para la opsonización de las bacterias, las muestras de suero se diluyeron al 5% en medio de cultivo para células RPMI 1640.

Las bacterias ya ajustadas a una concentración de $1.0 - 3.2 \times 10^6$ UFC/ml, se mezclaron tanto con suero normal como con el inactivado diluidos al 5% con una relación volumen a volumen en matraces Erlenmeyer estériles de 125 ml. Se colocaron en baño maría a 37°C y en agitación durante veinte minutos. Posteriormente las bacterias ya opsonizadas fueron centrifugadas en una ultracentrifuga refrigerada (Beckman L870M) a 5000 g (20000 rpm) durante treinta minutos. Se descartó el sobrenadante y las células bacterianas se resuspendieron a su volumen original con el medio RPMI 1640. La suspensión se mantuvo en hielo hasta su uso.

IV.- DETERMINACION DE LA FAGOCITOSIS.

Para esta determinación se utilizó el método descrito por Verbrugh y cols (18).

1.- En tubos estériles de vidrio se añadieron simultáneamente 0.2 ml de la suspensión de leucocitos y 0.2 ml de la

suspensión de bacterias ($1.0-3.2 \times 10^6$), previamente incubadas con: suero normal, suero inactivado y sin suero (utilizado como control negativo). Cada serie de tubos se incubó en baño maría a 37°C en agitación continua, y se fueron obteniendo las muestras a los siguientes tiempos: 0-3, 15, 30, 60 y 120 minutos. Se colocaron inmediatamente en hielo para su procesamiento.

2.- Las muestras se centrifugaron a 160 g (800 rpm), y el botón celular se lavó dos veces con solución amortiguadora salina fosfatos estéril pH 7.2 - 7.4 para remover las bacterias no adheridas a los leucocitos. Las tres variantes fueron efectuadas por triplicado.

3.- Al botón celular leucocitario se le añadió 3 ml de líquido de centelleo y las cuentas por minuto (cpm) emitidas por las bacterias dentro de los leucocitos se detectaron en un contador de centelleo marca Packard. El porcentaje de la fagocitosis se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Fagocitosis} = \frac{\text{cpm del botón leucocitario en " X " tiempo}}{\text{cpm del botón al tiempo 0}} \times 100$$

V.- DETERMINACION DE LA MUERTE Y DIGESTION INTRACELULAR.

- 1.- Se procedió a incubar los polimorfonucleares con las bacterias y los sueros de la misma forma que para la fagocitosis y se lavó el botón celular después de centrifugarlo a 160 g (800 rpm). La muerte bacteriana se determinó por el método de Verbrugh y Cols. (18).
- 2.- Al botón celular leucocitario ya lavado se le añadió 1 ml de agua destilada estéril con 0.01% de albúmina sérica bovina (Sigma No.A-7906) para lisis a los leucocitos. Los microorganismos resistentes a la muerte y digestión intracelular fueron liberados y se tomaron 0.1 ml de la suspensión para diluirla en 0.9 ml de solución salina estéril. Las diluciones finales obtenidas fueron 1:10, 1:100, 1:1000 , 1:10000, 1:100000 y 1:1000000.
- 3.- De cada una de las diluciones, se tomaron 20 µl para proceder a cultivar por el método de goteo según Miles y Misra (22). Esta técnica consiste en inocular sobre la superficie del medio fresco de agar Casoy, libre de humedad, tres gotas por separado de cada dilución con pipeta automática en una mitad de la placa de petri con el medio Casoy. Los 20 µl del inóculo (volumen de cada gota) sobre el medio en tales condiciones, quedará circunscrito en un área circular de unos 15 mm y se absor-

verá en 10-15 minutos. A continuación, las placas se incuban en posición invertida a 37°C por 24-48 horas y después de este tiempo, se seleccionan para el recuento las diluciones en donde apaezca un máximo de veinte colonias. Obtener la media del recuento y multiplicar por cincuenta y por la inversa de la dilución correspondiente.

4.- Para obtener el número total de UFC/ml se acepta que, el número de colonias obtenidas corresponde al número de microorganismos capaces de resistir al mecanismo de la muerte y digestión intracelular.

VI.- DETERMINACION DEL TIEMPO DE GENERACION DE CUATRO ESPECIES DE ESTAFILOCOCCOS COAGULASA NEGATIVOS.

Se utilizaron cuatro especies de estafilococos coagulasa negativos obtenidos del ATCC: S. epidermidis (14990), S. capitis (27840), S. saprophyticus (15305) y S. sciuri (29060). El tiempo de generación se efectuó de acuerdo al método propuesto por Grahtree and Hinedill.(23).

Se utilizó un cultivo reciente de 18 horas en caldo de cada especie bacteriana, se inocularon 0.2 ml de cada cultivo en matraces de Erlenmeyer con 100 ml de caldo Casoy, se incubaron en baño maria a 37°C en agitación y se tomaron alícuotas al tiempo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, hasta 24 y 48 horas.

El recuento colonial se determinó por la técnica de goteo de Miles y Misra (22). Cada determinación se realizó por triplicado.

Para calcular el tiempo de generación por cuenta viable se utilizó la siguiente fórmula (23):

$$g = \frac{t \log 2}{\log b - \log a}$$

donde: t = Tiempo (minutos) para n generaciones.

a = No. de bacterias en el inicio de la observación.

b = No. de bacterias después de n generaciores.

R E S U L T A D O S

Los resultados de las experimentos de la fagocitosis se muestran en las gráficas como el promedio de los porcentajes de las 3 variantes utilizadas: fagocitosis sin suero, fagocitosis con suero normal y fagocitosis con suero inactivado en los tiempos utilizados: de 0-3, 15, 30, 60 y 120 minutos. El porcentaje de la fagocitosis fué obtenida de la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de Fagocitosis} = \frac{\text{cpm del botón leucocitario en "X" tiempo.} \times 100}{\text{cpm del botón al tiempo 0.}}$$

En las gráficas 1, 2, 3, 4 y 5 se comparan los resultados de la fagocitosis con las tres variables juntas: sin suero, suero normal y suero inactivado, en cada tiempo experimentado y entre ambas especies bacterianas. Allí se observa que la fagocitosis se presenta desde el tiempo 0-3 minutos para las tres variables, con una tendencia a disminuir a medida que se incrementa el tiempo.

En el eje de las abscisas, se encuentra el tiempo utilizado para ambas especies bacterianas y en presencia de las tres variables y en el eje de las ordenadas el % de la fagocitosis (todos los experimentos se realizaron por triplicado).

En las gráficas 6,7 y 8, se compara la fagocitosis para las dos especies bacterianas, con una variable y su comportamiento entre todos los tiempo estudiados. Aquí los hallazgos importantes fueron que la fagocitosis en presencia de suero inactivado y de suero normal fué mejor para S. epidermidis que para S. capitis.

A continuación se presentan los valores de p de las cinco gráficas, en donde se compara el efecto de la fagocitosis sin suero (control) con la fagocitosis en presencia de suero normal e inactivado y por otro lado la fagocitosis en suero normal con la fagocitosis en suero inactivado para ambas especies bacterianas (existe diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$).

FAGOCITOSIS

bacteria: S. epidermidis.

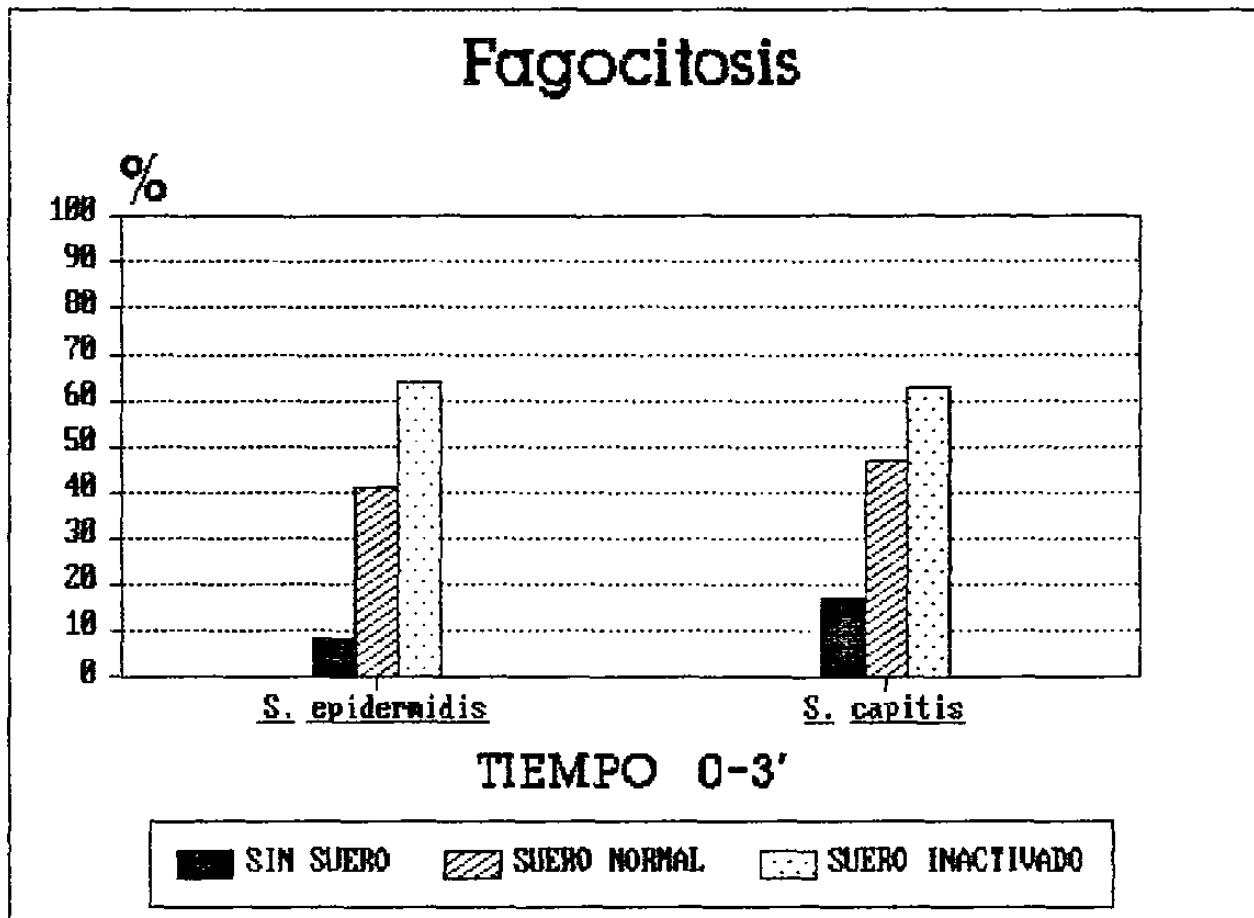
| Tiempo | Sin suero- Suero normal | Sin suero- Suero inactivado | Suero normal- Suero inactivado |
|----------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 0-3 min. | .036 | .006 | .104 |
| 15 min. | .011 | .010 | .240 |
| 30 min. | .017 | .017 | .863 |
| 60 min. | .011 | .010 | .599 |
| 120 min. | .007 | .014 | .257 |

FAGOCITOSIS

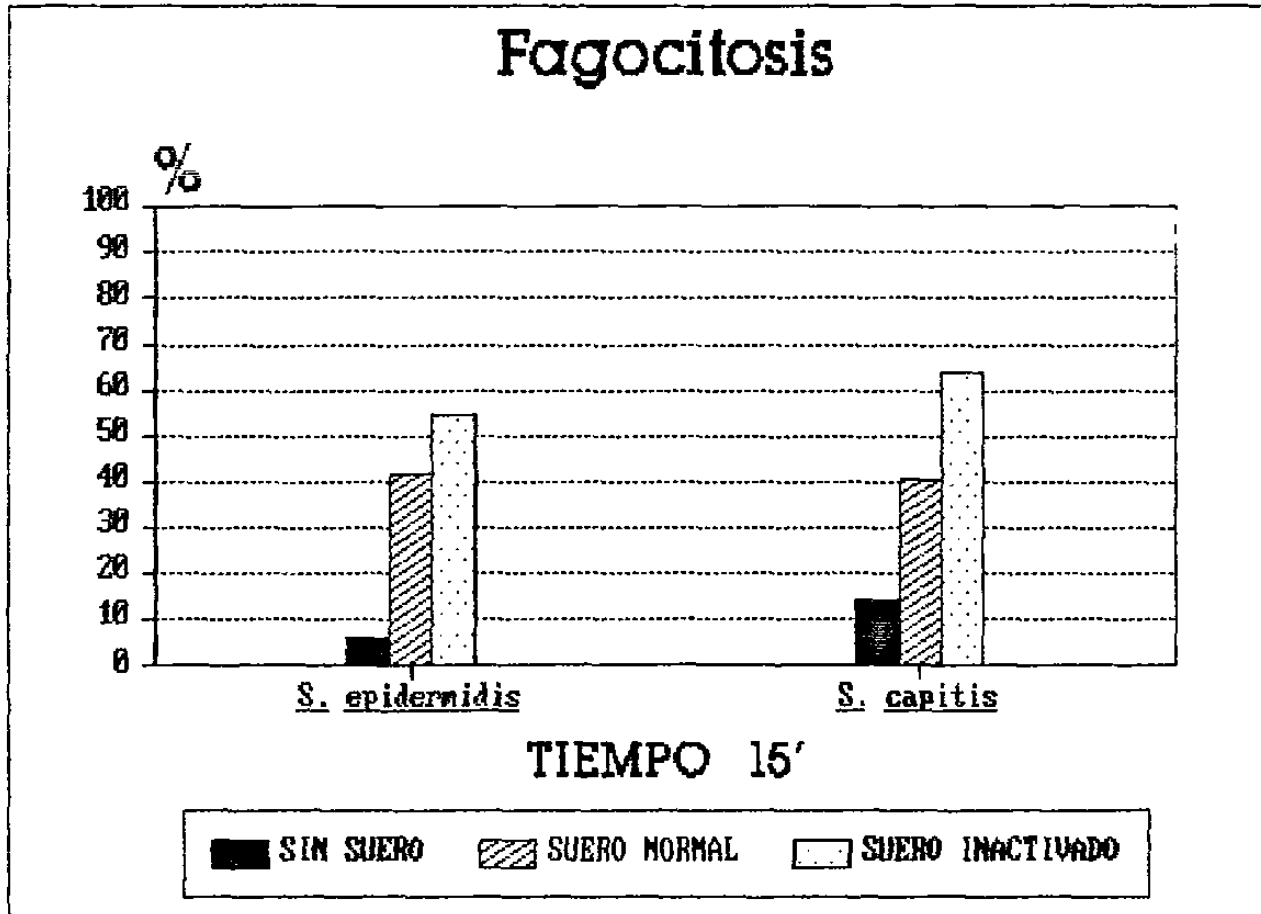
bacteria: S. capitis.

| Tiempo | Sin suero- | Sin suero- | Suero normal- |
|----------|--------------|------------------|------------------|
| | Suero normal | Suero inactivado | Suero inactivado |
| 0-3 min. | .008 | .017 | .399 |
| 15 min. | .003 | .003 | .080 |
| 30 min. | .028 | .005 | .015 |
| 60 min. | .093 | .010 | .063 |
| 120 min. | .154 | .059 | .937 |

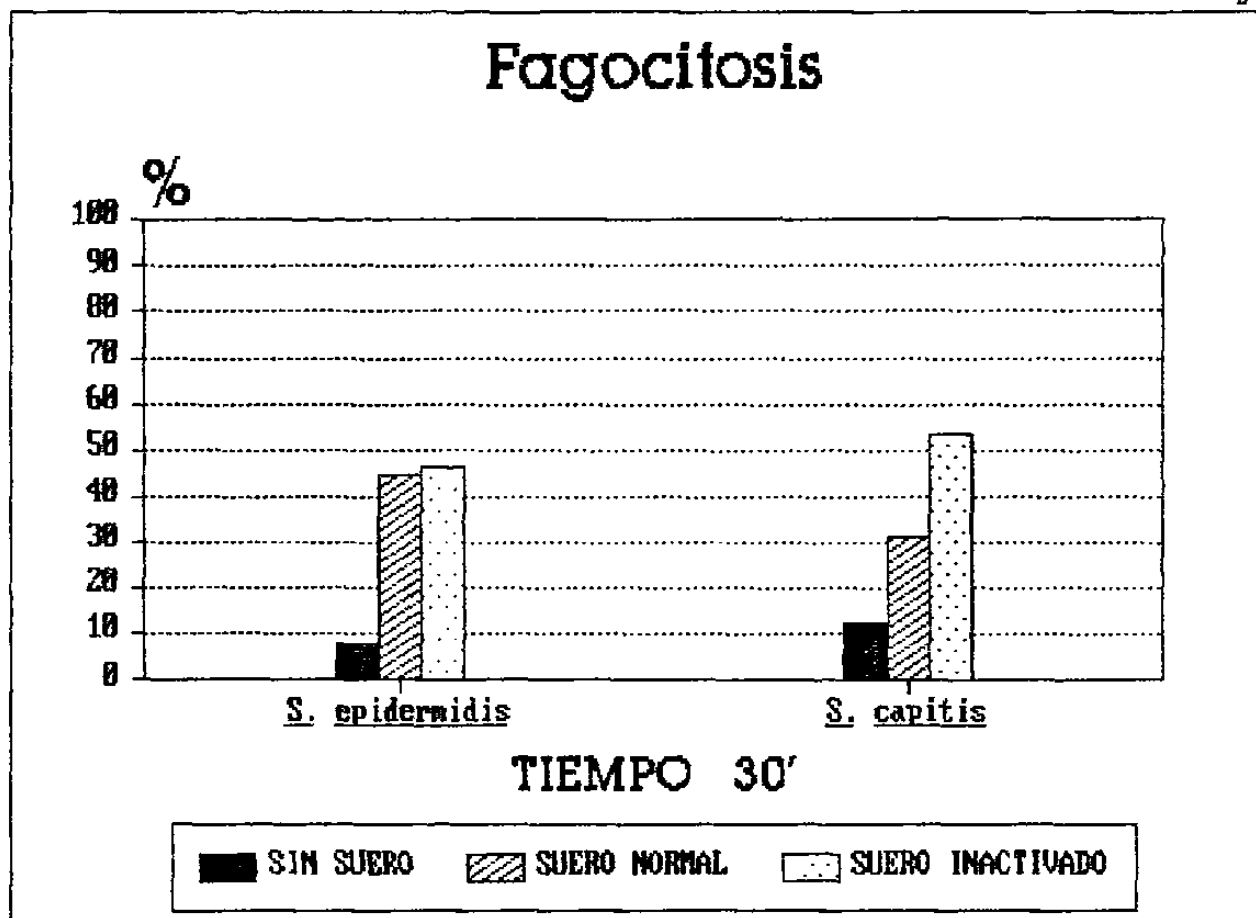
En las gráficas 1 a la 5, se observa una diferencia significativa para S. epidermidis entre los experimentos sin suero y suero normal y con el suero inactivado, en todos los tiempos. No se encontró diferencia en la fagocitosis entre el suero normal y el suero inactivado para S. capitis solamente se observó desde 0-3 hasta los 30 min en ausencia de suero (control) y suero normal y de 0-3 hasta 60 min en la fagocitosis sin suero (control) y suero inactivado. No se encontró diferencia significativa entre la fagocitosis con el suero normal y el inactivado para ambas especies bacterianas, exceptuando el tiempo 30 min. para S. capitis.



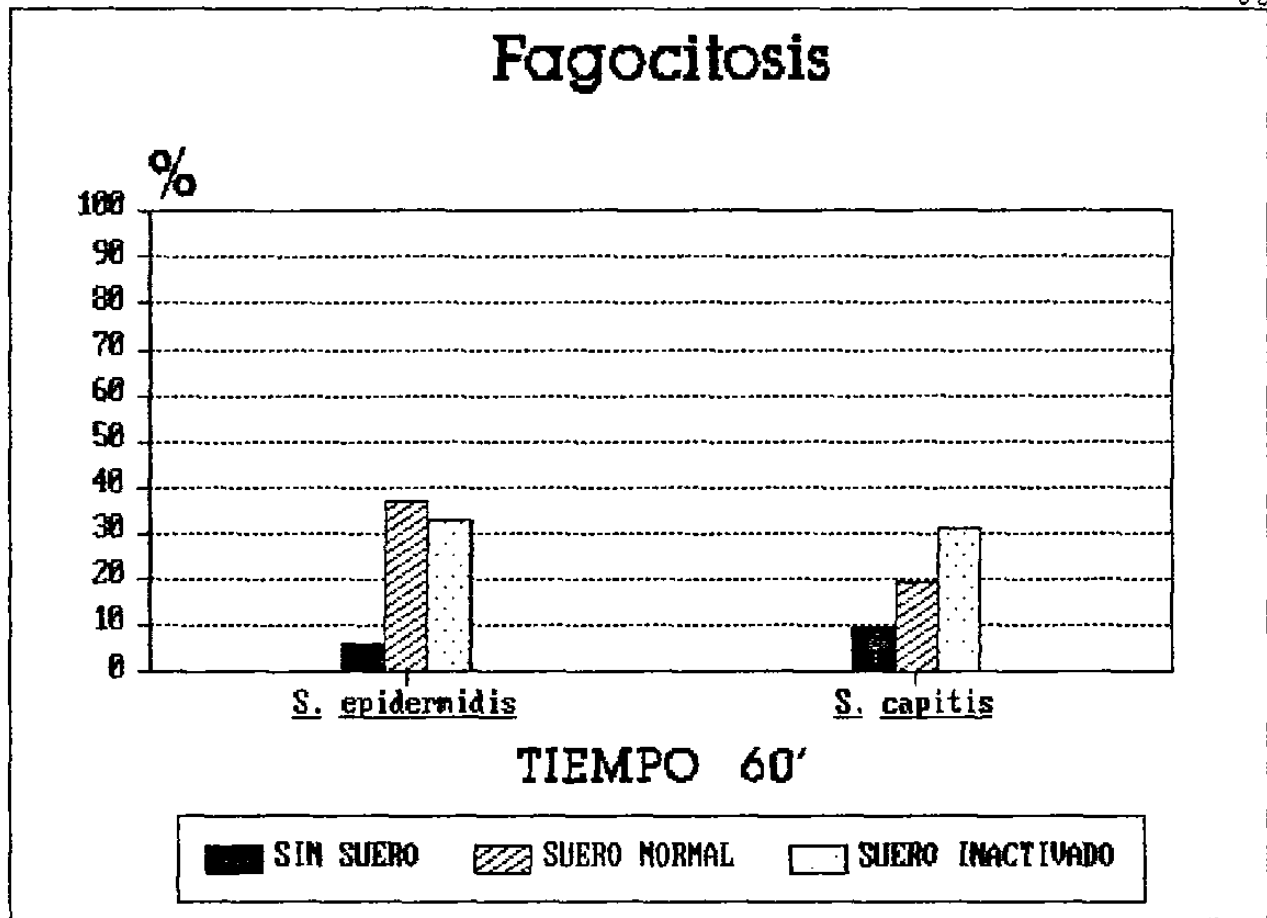
Gráfica 1.- Comparación del efecto del suero normal y el suero inactivado en la fagocitosis de *S. epidermidis* y *S. capitis* al tiempo 0-3 minutos.



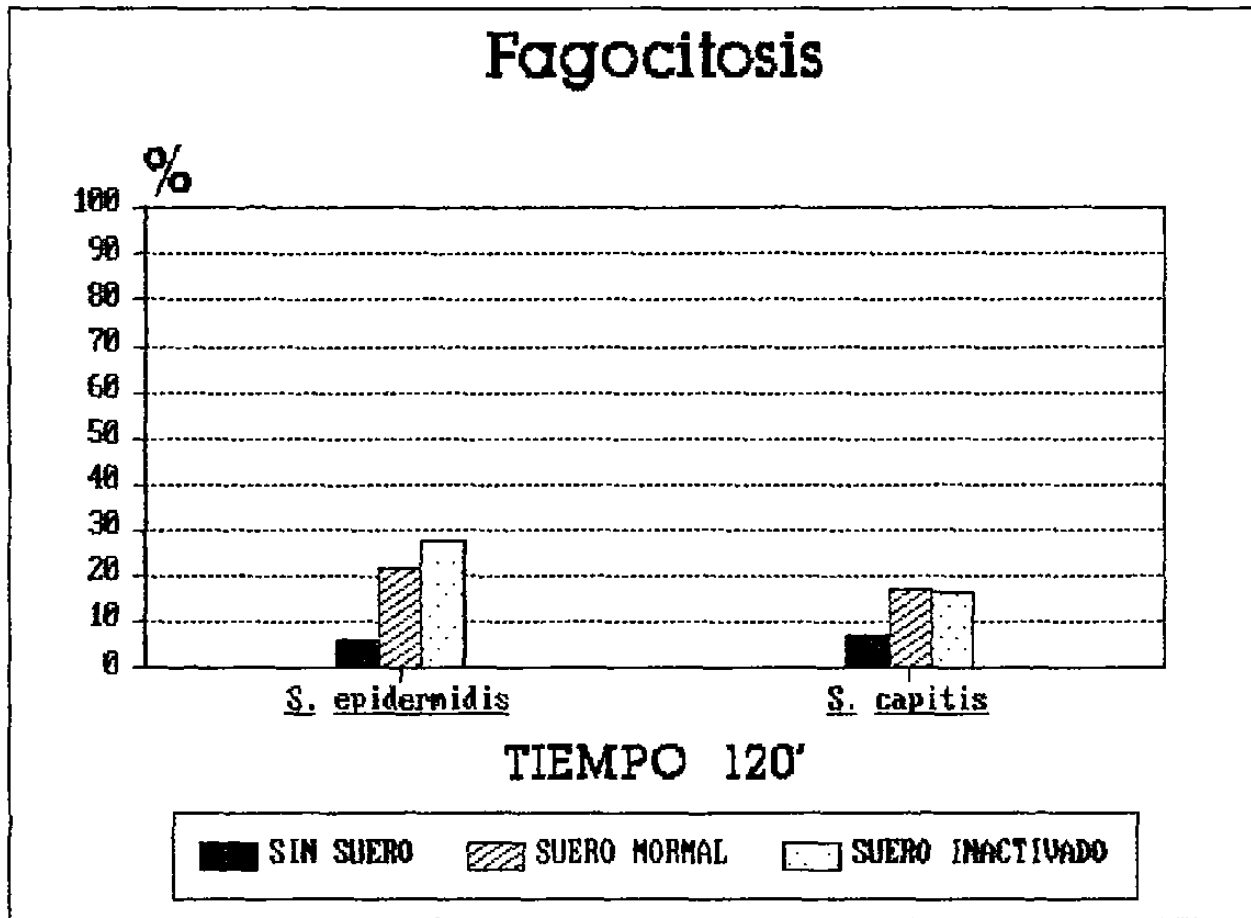
Gráfica No.2.- Comparación del efecto del suero normal y el suero inactivado en la fagocitosis de *S. epidermidis* y *S. capitis* al tiempo de 15 minutos.



Gráfica No.3.Comparación del efecto del suero normal y el suero inactivado en la fagocitosis de *S. epidermidis* y *S. capitis* a los 30 minutos.



Gráfica No. 4.- Comparación del efecto del suero normal y el suero inactivado en la fagocitosis de *S. epidermidis* y *S. capitis* en el tiempo de 60 minutos.



Gráfica No. 5. Comparación del efeto del suero normal y el suero inactivado en la fagocitosis de *S. epidermidis* y *S. capitis* a los 120 minutos.

En las gráficas 6, 7 y 8 se comparan los resultados entre las dos bacterias en todos los tiempos estudiados (desde 0-3 hasta 120 min.) para analizar su comportamiento con cada una de las condiciones experimentales utilizadas sin suero, suero normal y suero inactivado.

En el eje de las abscisas, se encuentran los tiempos utilizados en el estudio: 0-3, 15, 30, 60 y 120 minutos y en el eje de las ordenadas el promedio de los porcentajes de la fagocitosis (todos los experimentos se efectuaron por triplicado).

Los valores de p en las gráficas 6, 7 y 8 se presentan a continuación:

SIN SUERO

| TIEMPO | | | | |
|-----------------------|-------------|----------|----------|-----------|
| Bacteria | [0-3]'a 15' | 15'- 30' | 30'- 60' | 60'- 120' |
| <u>S. epidermidis</u> | .036 | .372 | .069 | .118 |
| <u>S. capitis</u> | .138 | .303 | .268 | .162 |

SUERO NORMAL

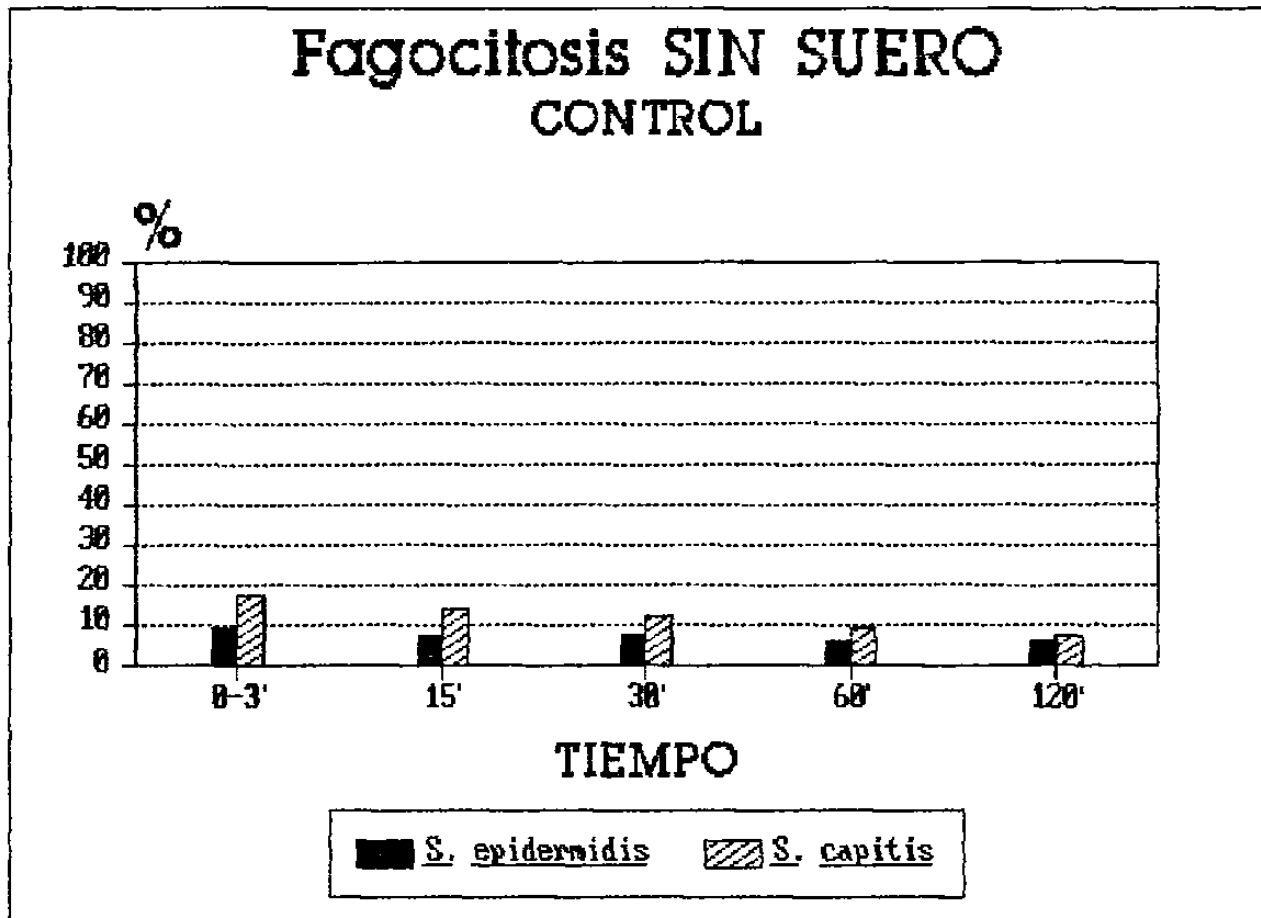
| TIEMPO | | | | |
|-----------------------|-------------|----------|----------|-----------|
| Bacteria | [0-3]'a 15' | 15'- 30' | 30 - 60' | 60'- 120' |
| <u>S. epidermidis</u> | .856 | .222 | .388 | .078 |
| <u>S. capitis</u> | .258 | .023 | .056 | .004 |

SUERO INACTIVADO

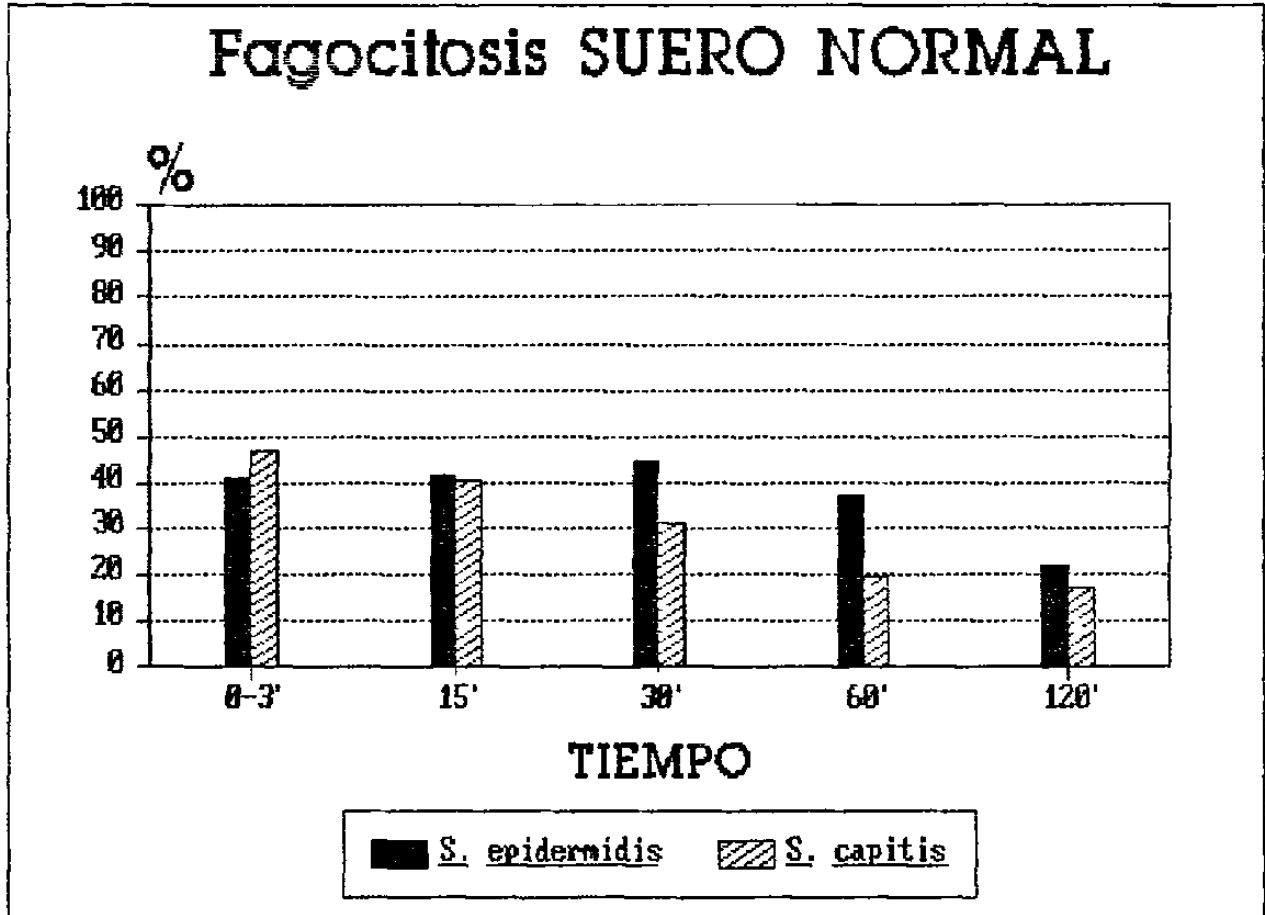
| Bacteria | TIEMPO | | | |
|-----------------------|--------------|-----------|-----------|------------|
| | [0-3]' a 15' | 15' - 30' | 30' - 60' | 60' - 120' |
| <u>S. epidermidis</u> | .058 | .018 | .009 | .008 |
| <u>S. capitis</u> | .854 | .571 | .009 | .006 |

En la gráfica No. 6 en donde se presentan los valores de p para los resultados de los experimentos para ambas bacterias en presencia de la fagocitosis sin suero (control) no se observa diferencia significativa.

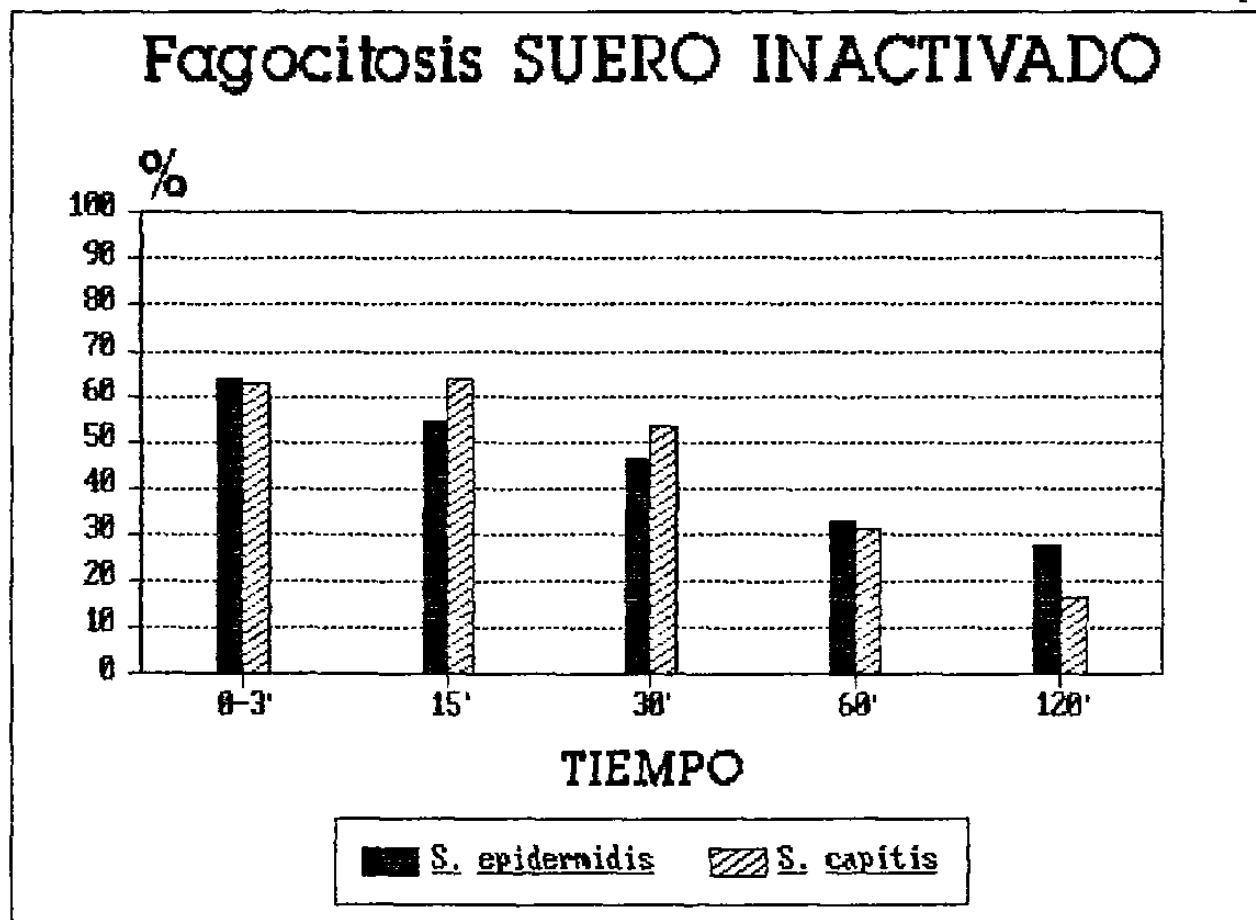
En cambio, en presencia de suero normal se observó solo diferencia significativa para S. capitis a partir del tiempo 15 min. Por otro lado, en presencia de suero inactivado se observó diferencia significativa para ambas bacterias: S. epidermidis a partir de 15 - 30' y S. capitis a partir de 30 - 60'.



Gráfica No. 6 .- Fagocitosis de los polimorfonucleares para *S. epidermidis* y *S. capitis* en solución salina. Se utilizó como control de la fagocitosis sin agentes opsonizantes.



Gráfica No.7.- Fagocitosis de los leucocitos polimorfonucleares para *S. epidermidis* y *S. capitis* en presencia de suero con opsoninas.



Gráfica No. 8.- Fagocitosis de los leucocitos polimorfonucleares para *S. epidermidis* y *S. capitis* efectuada en presencia de suero inactivado.

Los resultados de los experimentos de muerte y digestión intracelular son expresados en unidades formadoras de colonias--- (UFC) en papel semilogarítmico, graficando en el eje de las -- abscisas el tiempo utilizado y en el eje de las ordenadas las -- unidades formadoras de colonias por mililitro. Se presentan los resultados de cada especie bacteriana y con las tres variantes utilizadas: digestión intracelular en ausencia de suero, en presencia de suero normal y en presencia de suero inactivado. -- Las unidades formadoras de colonias indican el número de bacterias que resistieron a la muerte intracelular.

En las gráficas 9 y 10 se presentan los resultados de la digestión intracelular con las tres variantes para cada bacteria en los tiempos 0-3, 15, 30, 60 y 120 minutos. Posteriormente en las gráficas 11, 12 y 13 se comparan los resultados en forma independiente de la digestión intracelular en ausencia de suero (gráfica 11), con suero normal (gráfica 12) y con suero inactivado (gráfica 13) entre ambas especies bacterianas. -- (Todos los experimentos se realizaron por triplicado).

Se puede observar en las gráficas 9 y 10 una disminución de las unidades formadoras de colonias por mililitro para ambas bacterias a los tres minutos mostrando mayor efectividad la digestión en presencia de suero normal.

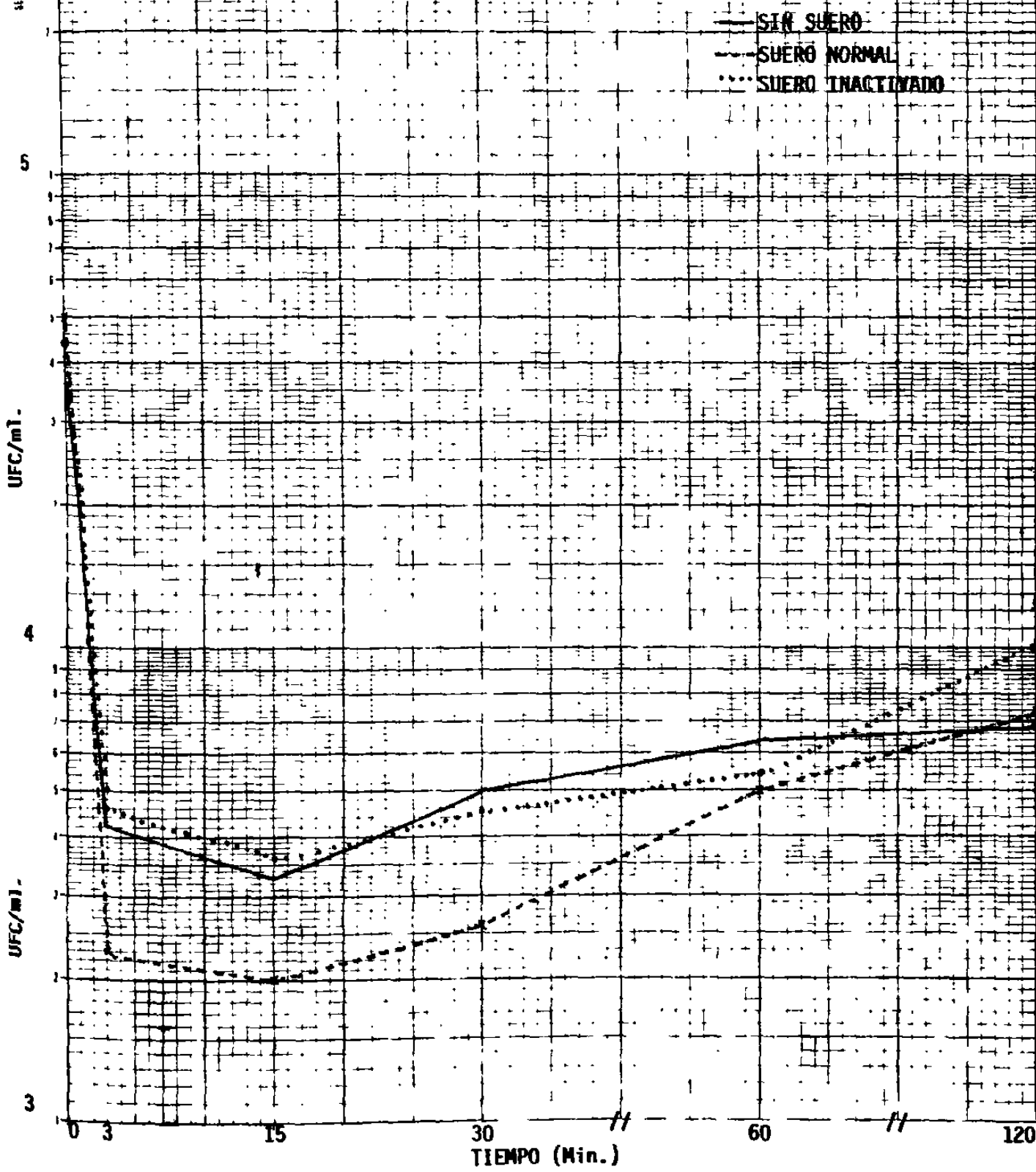
Comparando el comportamiento entre ambas especies con cada

una de las variantes (gráficas 11,12 y 13) se observa que fuè similar, mostrando S. capitis una mayor resistencia a la muerte intracelular en el tiempo estudiado (2 horas).

GRAFICA No. 19

MUERTE Y DIGESTION INTRACELULAR

S. epidermidis



227 1349
SERV. NAC. DE INVEST. CIENT. Y TECNOL. (S. A. 3 DIVISION)

GRAFICA No. 10

MUERTE Y DIGESTION INTRACELULAR
S. capitis

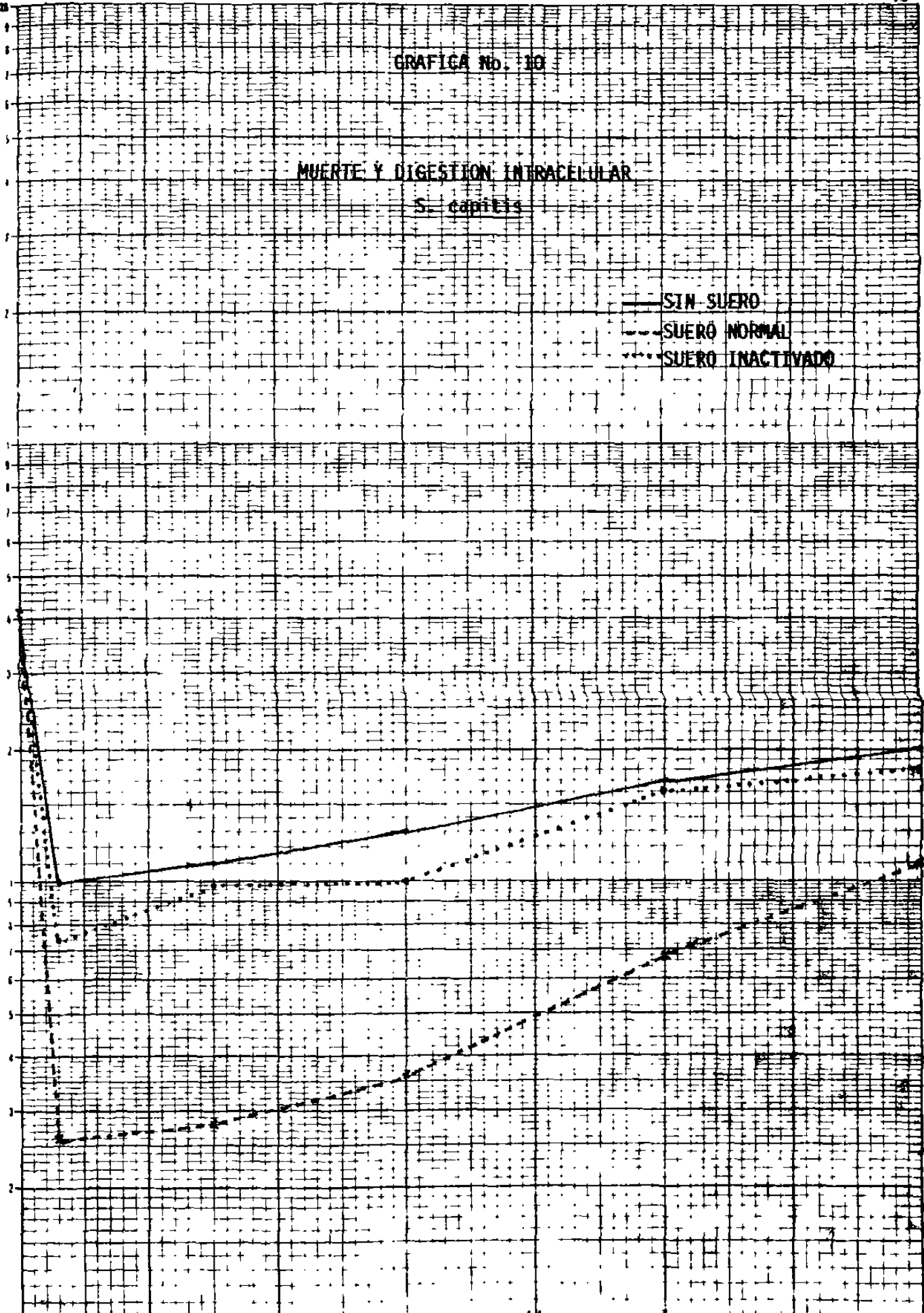
— SIN SUERO
 - - - SUERO NORMAL
 ···· SUERO INACTIVADO

5

4

3

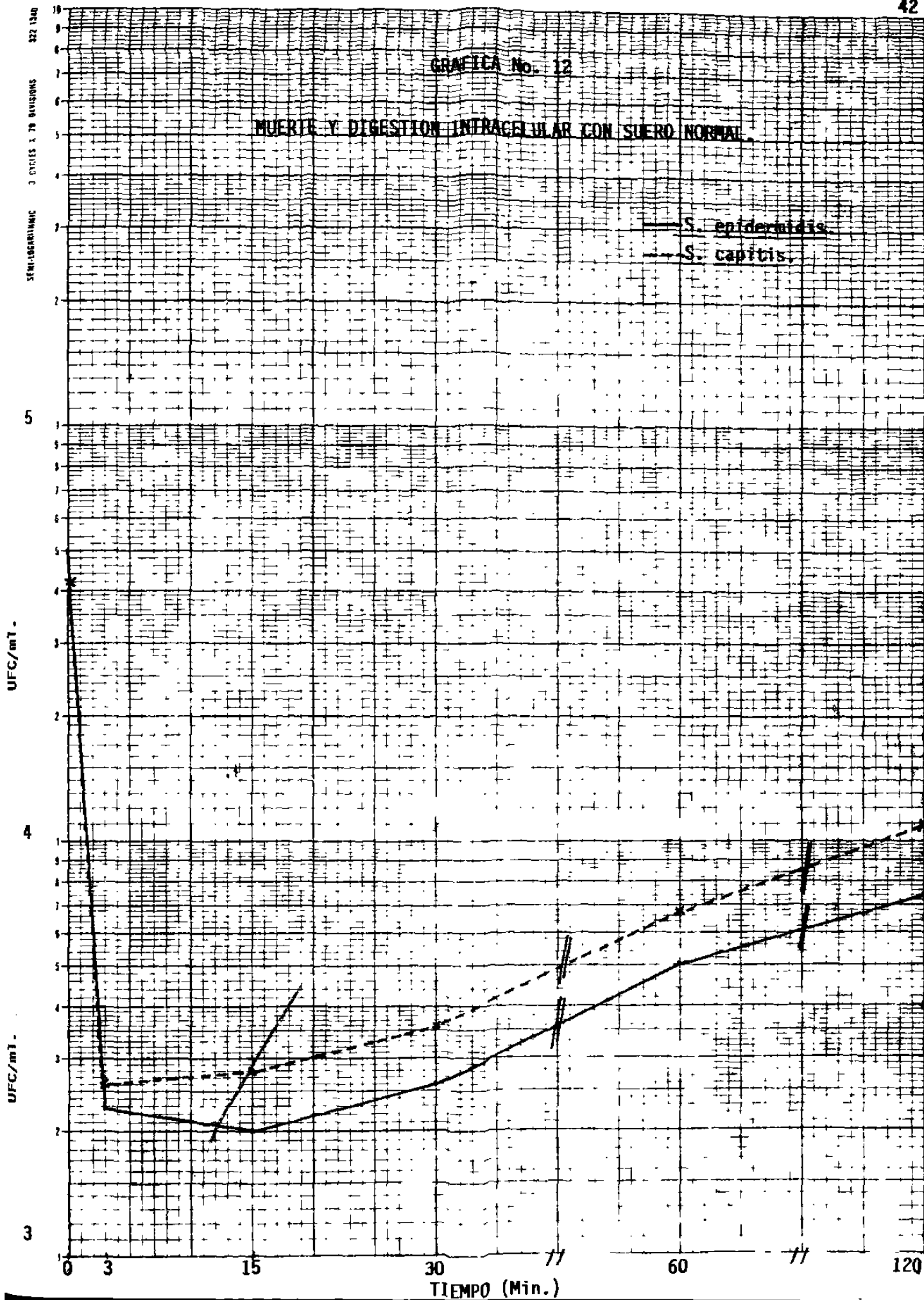
0 3 15 30 45 60 75 120
TIEMPO (Min.)



GRAFICA No. 12

MUERTE Y DIGESTION INTRACELULAR CON SUERO NORMAL

— S. epidermidis
- - - S. capitis



SEMI LOGARITMICO 3 CIRCULOS X 10 DIVISIONES 822 1340

GRAFICA No. 12

MUERTE Y DIGESTION INTRACELULAR CON SUERO NORMAL.

UFC/ml.

UFC/ml.

3

4

5

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

TIEMPO (Min)

0

3

15

30

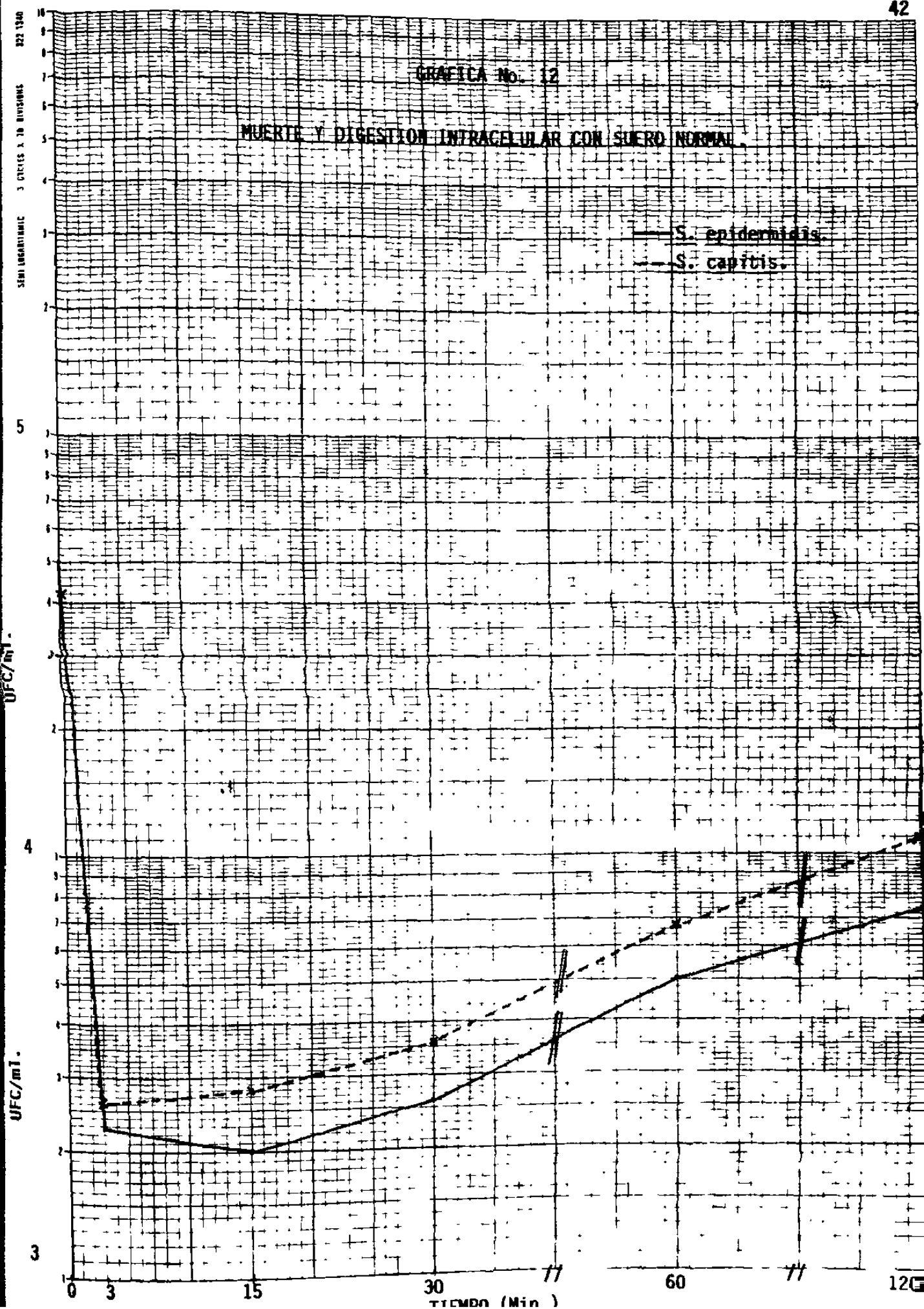
||

60

||

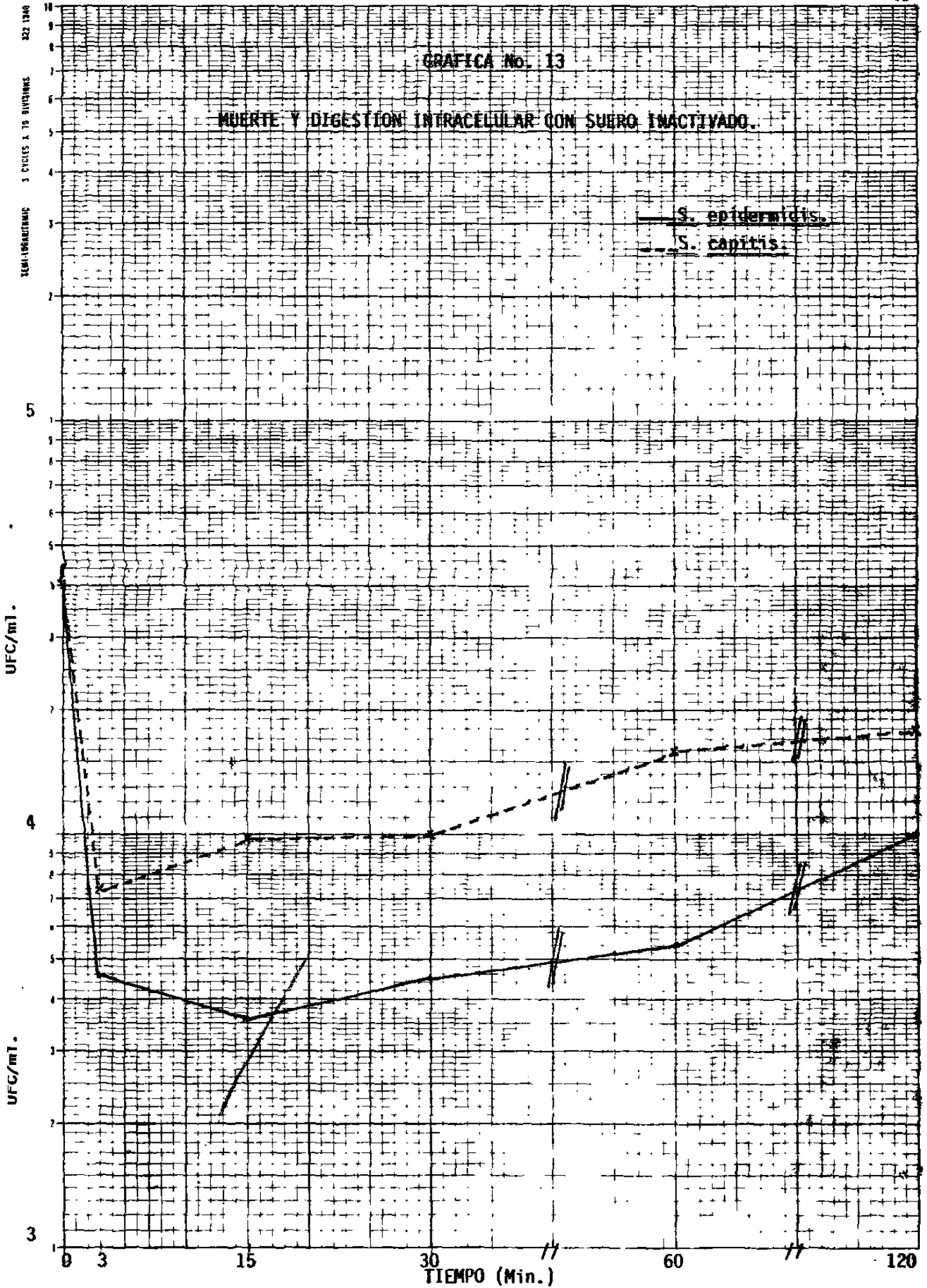
120

— S. epidermidis.
- - - S. capitis.



GRAFICA No. 13

MUERTE Y DIGESTION INTRACELULAR CON SUIERO INACTIVADO.



Los resultados de los tiempo de generación de las cuatro especies de estafilococos coagulasa negativos, se presentan en las gráficas 14 y 15 realizadas en papel semilogarítmico. En el eje de las abscisas se encuentra el tiempo utilizado: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, y 24 horas y en el eje de las ordenadas las unidades formadoras de colonias por mililitro determinando el tiempo de generación por el método de cuenta viable calculado con la siguiente fórmula (23): (Todos los experimentos se realizaron por triplicado).

$$g = \frac{t \log 2}{\log b - \log a}$$

donde: t = Tiempo (minutos) para n generaciones.

a = No. de bacterias en el inicio de la observación.

b = No. de bacterias después de n generaciones.

Los tiempos de generación que se obtuvieron fueron los siguientes.

TIEMPO DE GENERACION

| BACTERIAS | CUENTA VIABLE (UFC) |
|-------------------------|--------------------------|
| <u>S. sciuri</u> | 13 min |
| <u>S. saprophyticus</u> | 16 min |
| <u>S. epidermidis</u> | 30 min |
| <u>S. capitis</u> | 52 min |

Con cada especie de estafilococos se obtuvo diferencia en su división celular, mostrando S. capitis más retardo en su multiplicación, factor que puede ser importante en los experimentos efectuados.

La importancia de estas diferencias para la interpretación de los resultados se presentan en la discusión.

GRÁFICA NO. 13
CURVA DE CRECIMIENTO
CUELLO MUELA LINDO

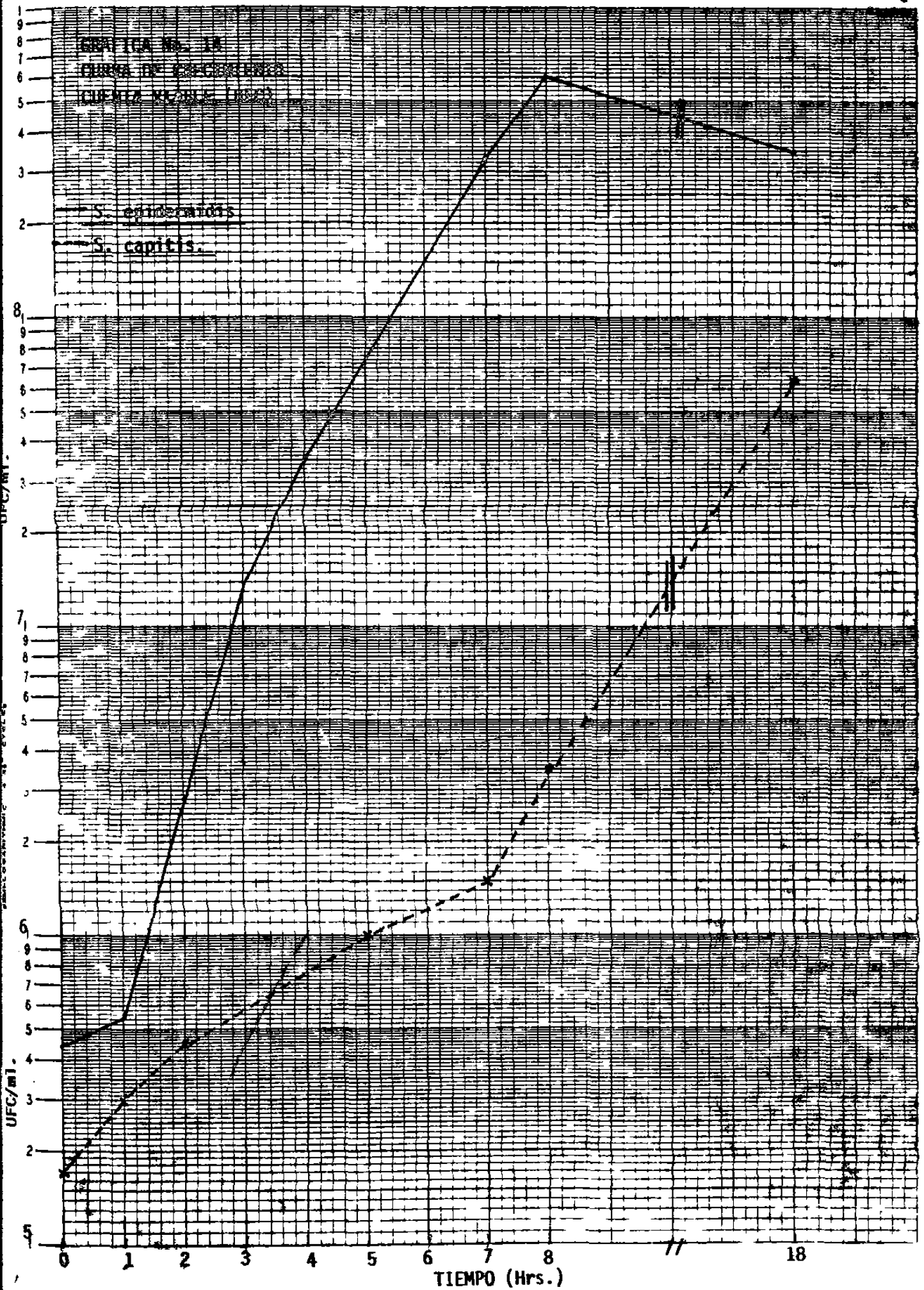
S. epidermidis

S. capitis

UFC/ml.

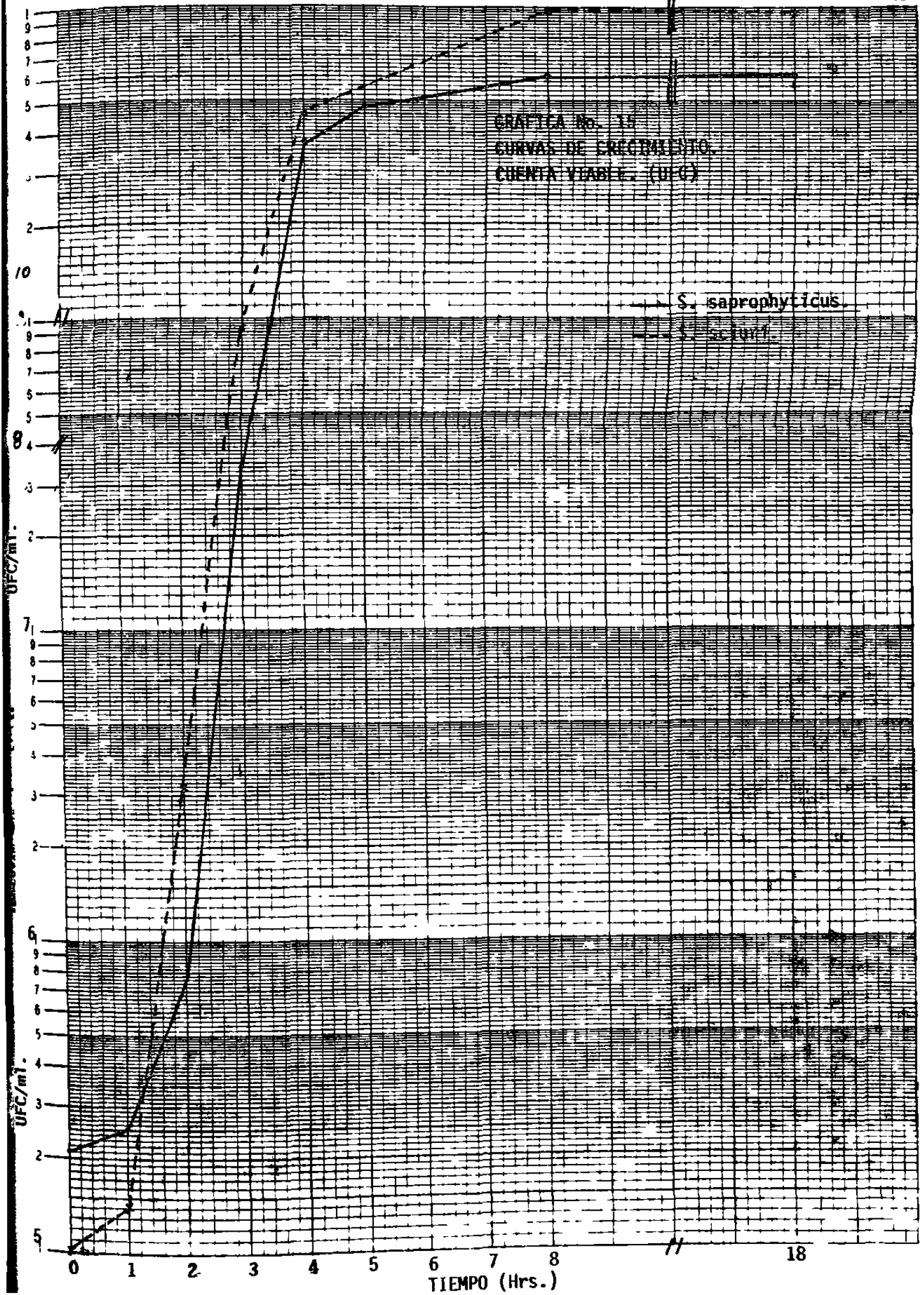
UFC/ml.

TIEMPO (Hrs.)



GRÁFICA No. 15
CURVAS DE CRECIMIENTO.
CUENTA VIABLE. (UFC)

S. saprophyticus
S. sciuri



D I S C U S I O N

Durante las últimas dos décadas, se ha visto que los estafilococos coagulasa negativos, causan infecciones relacionadas al uso de catéteres, conocidas como infecciones por cuerpo extraño (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15).

Se estableció la hipótesis de que la alta frecuencia de infecciones por cuerpo extraño producidas por S. epidermidis en comparación con S. capitis menos frecuentemente aislado, era debido a que S. epidermidis era capaz de resistir a la fagocitosis y digestión intracelular por los leucocitos polimorfonucleares.

Estos mecanismos de resistencia no específicos a la infección no habían sido estudiados para este tipo de microorganismos, ya que éstos, han sido considerados como no patógenos, en comparación con otros considerados como de más patogenicidad como S. aureus (18, 19).

En los experimentos de la fagocitosis, como se pudo observar en las gráficas, se presenta desde el tiempo de 0-3 minutos para las tres variantes que fueron utilizadas: sin suero, utilizado como experimento control, con suero normal y con suero inactivado, con una tendencia a disminuir a medida que se incrementa el

tiempo hasta las dos horas estudiadas. Los resultados difieren de lo reportado por Verbrugh y cols (18) para microorganismos como S. aureus. En dichos experimentos, el fenómeno fagocítico se presentó desde el tiempo de 3 minutos con una tendencia a aumentar hasta los veinte minutos que incluyó el estudio.

Se encontró diferencia significativa entre las dos especies bacterianas. La fagocitosis fue mejor para S. epidermidis que para S. capitis en presencia de suero inactivado que en presencia de suero normal, evento contrario al reportado por Verhoef y cols (21), en donde ellos efectuaron experimentos de la fagocitosis con suero normal, suero inactivado y suero deficiente en el componente del complemento C2 a diferentes tiempos: 1, 5, 15 y 60 minutos a 37°C para la bacteria S. aureus; encontrando que la mejor fagocitosis se manifestó en presencia de suero normal que con cualquiera de las otras dos variantes utilizadas por ellos.

Se ha demostrado que la fagocitosis en presencia de suero normal es mejor que con suero inactivado, esto debido a que el suero normal posee más factores extracelulares que el suero inactivado, como son la presencia de inmunoglobulinas y ciertos factores del complemento (opsoninas) las cuales facilitan el fenómeno fagocítico. El hecho de que el suero inactivado fuera más efectivo para la fagocitosis pudiera explicarse bajo dos contextos: 1) que los anticuerpos por sí solos fueron excelentes opsoninas para esta especie bacteriana y 2) que favoreciera la producción por S. epidermidis de un factor que incrementara

su adhesión o fagocitosis en los primeros minutos del estudio.

Por lo tanto, podemos deducir que los resultados obtenidos en este trabajo bajo las condiciones experimentales llevadas a cabo, pudieran explicarse bajo el contexto de que tal vez, el fenómeno que se está presentado desde 0-3 minutos sea debido a un mecanismo inicial de adherencia de las bacterias a la superficie de la membrana de los fagocitos debido a un factor extracelular bacteriano.

Quie y Belani (16), mencionan que la adherencia es un prerrequisito inicial para la patogénesis de todas las infecciones ocasionadas por bacterias y que es necesaria para que ocurra la colonización con la posterior producción de factores extracelulares que contribuyan a la virulencia del germen, por lo que la persistencia de las infecciones ocasionadas por los estafilococos coagulasa negativos pudiera estar relacionada con la capacidad de producir una sustancia (adhesina) que le permitiera al microorganismo evadir uno o varios de los mecanismos de resistencia natural a nivel de la fagocitosis.

Se ha publicado que éstos microorganismos producen una sustancia extracelular de glicocalix (moco o slime), esta sustancia está formada por 40% de carbohidratos y 27% de proteínas (16), este material mucoso en estos microorganismos aumenta la adhesión a superficies inertes como catéteres y

válvulas y además le permite al microorganismo cubrirse de una matrix protectora que podría explicar algunas dificultades encontradas en el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas por cuerpo extraño y posiblemente podría además prevenir la recuperación de las bacterias en las muestras del catéter durante los cultivos bacteriológicos de rutina. (9,16).

Esta pared espesa de moco (slime) no fué regularmente encontrada sólo en los catéteres colonizados por los estafilococos coagulasa negativos sino también en catéteres colonizados por otros microorganismos como son: S. aureus, P. aeruginosa, Acinetobacter calcoaceticus y otros microorganismos (16).

También se pudiera explicar que la fagocitosis observada en presencia de suero inactivado, probablemente pudiera deberse a que el calentamiento necesario para inactivar el suero normal a 56 C por 30 minutos elimine algún o algunos componentes presentes en el suero normal que favorezcan la formación de moco, ya que éste, según Noble y cols. (24) es capaz de interferir su ingestión por los fagocitos. Con esto, se podría especular que el suero normal y probablemente algunas proteínas del suero inactivado favorecieran su producción después de las dos dosis, (entre más tiempo, mayor producción del glicocalix) que al principio permite la adhesión a las células, pero conforme se va produciendo, ejerce una función antifagocítica. Esta sería una razón por la cuál hay una aparente mejor fagocitosis con

Sepidermidis, el cuál se supone, resistiría más a este mecanismo que S. capitis considerado como el menos virulento.

Por otro lado, los resultados de la digestión intracelular fueron expresados en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) para las dos bacterias estudiadas en presencia de las tres variantes utilizadas. Las unidades formadoras de colonias indican el número de bacterias que son capaces de resistir a la digestión intracelular.

Cabe señalar que ambas especies con las tres variantes, mostraron una tendencia a aumentar las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) después de los 30 minutos. Esto pudiera deberse a que los leucocitos polimorfonucleares tienen una vida media de 6 - 7 horas en la circulación tiempo que disminuye cuando dichas células se encuentran fuera de nuestro organismo (18,19). Esto, aunado al incremento del metabolismo celular ocasionado por el manejo de las células "in vitro", pudiera intervenir en la disminución de la capacidad degradativa del polimorfonuclear.

Por otra parte, los microorganismos incluidos en el estudio, tienen el antecedente de nutrirse y desarrollarse con formación de colonias en medios ausentes de nutrientes y en presencia de artefactos artificiales como son los catéteres y/o válvulas. Esto es confirmado por los estudios de Peter y cols. (9). Esto

nos hace pensar que dichos microorganismos tienden a multiplicarse, aumentando las unidades formadoras de colonias, razón por la cual se decidió determinar sus tiempos de generación, ya que pudieran afectar la interpretación de los resultados de la fagocitosis y digestión intracelular. Además cabe suponer que los de menos tiempo de generación pueden multiplicarse más rápidamente y por lo tanto, colonizar más pronto, como sería el caso de S. epidermidis el cual, presenta menos tiempo de generación y por lo tanto, su frecuencia de aislamiento pudiera ser atribuible a este comportamiento en comparación con S. capitis, de mayor tiempo de generación.

De acuerdo a los resultados de la digestión intracelular presentados en las gráficas 9-13, se encontró que S. capitis mostró más resistencia a su degradación que S. epidermidis bajo las condiciones en que se trabajó.

Esto, pudo ser debido a lo siguiente:

10. Que S. epidermidis podría tener una mayor capacidad enzimática para la producción del glicocalix (slime) y esto la lleve a una más fácil adherencia a la célula y una más fácil captación y una aparente fácil digestión intracelular en los primeros minutos del estudio, ya que al incrementarse el tiempo, el fenómeno se fué invirtiendo. Como se puede observar, los experimentos de la digestión intracelular con suero normal y suero inactivado se ve:

favorecidos sólo en los primeros 30 y 60 minutos respectivamente y al incrementarse el tiempo hasta las dos horas estudiadas, se presentó una mayor resistencia a su muerte intracelular; esto pudiera ser debido a:

- 1o. Que el ritmo de la digestión intracelular es menor que el ritmo de la división del microorganismo, demostrándose un aumento paulatino en las unidades formadoras de colonias de cada microorganismo estudiado.
- 2o. En el caso de S. epidermidis, a medida que pase el tiempo, éste, podría haber producido más glicocalix (slime), cubriéndose cada vez de una capa más gruesa de este material, aumentando su grosor y haciéndose así mismo, más resistente a la degradación de las enzimas intraleucocitarias.

Se hace incapié en la posible intervención del papel del glicocalix en este trabajo fundamentado por los diversos reportes recientemente publicados, a cerca de su efecto sobre los leucocitos polimorfonucleares y mononucleares. ya que puede presentar efectos adversos de los mecanismos de resistencia del huesped, como son la quimiotaxis, ingestión y respuesta oxidativas de los fagocitos (24), así como una disminución de la respuesta linfoproliferativa de las células mononucleares a antígenos bacterianos.(25). Los resultados sugieren que este

material se puede ir produciendo con el tiempo y que finalmente después de las dos horas pudiera observarse un efecto antifagocítico y antidegradativo y por lo tanto desarrollar un efecto inmunoinhibitorio sistémico y probablemente a nivel local.

De acuerdo a los resultados obtenidos de dichos eventos en este estudio, no se encontró que S. epidermidis resistiera a la fagocitosis y digestión intracelular por leucocitos polimorfonucleares en el lapso de tiempo estudiado, por lo que no se puede explicar satisfactoriamente la alta frecuencia de las infecciones ocasionadas por S. epidermidis bajo este contexto, por lo tanto nuestra hipótesis no se comprobó.

Como se pudo observar, los resultados fueron contrarios a lo esperado, por lo que surgen muchas interrogantes, como es ver si existe algún componente o componentes en el suero inactivado versus suero normal que realmente estén favoreciendo la producción del glicocalix (slime) o si realmente éste afecte la fagocitosis y digestión intracelular por leucocitos polimorfonucleares evaluando ahora su efecto después de las dos horas estudiadas incluso hasta las 48-96 horas, o bien, si la diferencia en los resultados obtenidos entre las dos especies bacterianas este relacionada con la producción del glicocalix.

C O N C L U S I O N E S

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

- 1o. La fagocitosis de ambas bacterias se presenta desde el tiempo 0-3 minutos con una tendencia a disminuir a medida que se incrementa el tiempo.
- 2o. La fagocitosis en presencia de suero normal y suero inactivado fué mejor para S. epidermidis que para S. capitis.
- 3o. Los experimentos con suero normal e inactivado, favorecen la digestión intracelular sólo en los primeros 30 y 60 minutos respectivamente y al incrementarse el tiempo, se presentó mayor resistencia a la muerte intracelular.

Se propone que:

El suero favorece la producción del glicocalix (slime), y éste, contribuye a la resistencia antifagocítica y a la degradación intracelular por los leucocitos polimorfonucleares, posiblemente al presentarse el tiempo de generación de cada una de las especies de estafilococos coagulasa negativos.

Si la propuesta es cierta, habría que estudiar:

- 1o. Si el suero normal y/o el suero inactivado realmente están favoreciendo la producción del glicocalix (slime)?
- 2o. Es el glicocalix (slime) producido por los estafilococos coagulasa negativos el que efectivamente está afectando la fagocitosis y digestión intracelular?
- 3o. La diferencia observada en la fagocitosis y digestión intracelular entre las dos bacterias, está relacionada con la cantidad del glicocalix (slime) producido?
- 4o. Existirá acaso otro factor de patogenicidad que no lo hemos visualizado y que tal vez es el que lleva a S. epidermidis a causar la mayor frecuencia de las infecciones por cuerpo extraño?

R E S U M E N

Los estafilococos coagulasa negativos, son microorganismos de baja virulencia. No suelen ocasionar infecciones en el hombre a menos que exista una alteración de las barreras naturales de defensa, como es el uso de catéteres. Actualmente se ha reportado una alta frecuencia de infecciones producidas por Staphylococcus epidermidis en comparación con otras especies menos frecuentemente aisladas como Staphylococcus capitis, lo que nos llevó a estudiar si S. epidermidis es capaz de resistir a la fagocitosis y digestión intracelular por leucocitos polimorfonucleares.

La fagocitosis de ambas bacterias se presentó desde el tiempo 0-3 min. hasta los 30 min. con una tendencia a disminuir a medida que se incrementa el tiempo. La fagocitosis en presencia de suero normal e inactivado fué mejor para S. epidermidis que para S. capitis. Los experimentos con suero normal e inactivado favorecieron la digestión intracelular sólo en los primeros 30 y 60 minutos respectivamente y al incrementarse el tiempo se presentó resistencia a la muerte intracelular.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que tanto S. epidermidis como S. capitis, mostraron una tendencia a resistir a la fagocitosis y a la digestión intracelular por leucocitos

polimorfonucleares aún en presencia de suero normal, existiendo sólo diferencia en el tiempo que la presentaron. Esta capacidad antifagocítica y antidegradativa podría ser debida a la producción de una substancia tipo adhesina conocida como glicocalix (Slime) producida por estas bacterias que esté afectando los resultados y que la diferencia de comportamiento entre las dos bacterias sea debida, a que su producción esté relacionada con el tiempo de generación de cada especie.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Davis, B.D., Dulbecco R. y Cols. 1978. Tratado de Microbiología. 2a.Ed. Salvat Editores. Barcelona, España. 1559 p.
- 2.- Lennette, E. 1980. Manual of Clinical Microbiology. Third Edition. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1044 p.
- 3.- Amardh, A. and Schleifer, K.H. 1986. Coagulase Negative Staphylococci. Almquist & Wiksell International. Stockholm, Sweeden.
- 4.- Fleen, A., Verhoef, J. and Hernandez, A. 1986. Coagulase Negative Staphylococci as Nosocomial Pathogens in Neonates. Am.J.Med. 80 (suppl 6B): 161-165.
- 5.- Baddour, L.M., Christensen, G.D. Hester, M.G. and Bisno, A.L. 1984. Production of Experimental Endocarditis by Coagulase Negative Staphylococci. Variability in Species Virulence. J.Infect Dis. 150 (5): 721-727.

- 6.- Sewell, CH.M., Clarridge, J.E., Young, E.J. and Guthrie, R.K. 1982. Clinical Significance of Coagulase Negative Staphylococci. J.Clin. Microbiol.16 (2): 236-239.

- 7.- Zimmerli, W., Lew, P.D. and Waldvogel, F.A. 1984. Pathogenesis of Foreign Body Infection: Evidence for a Local Granulocyte Defect. J.Clin.Invest. 73: 1191-1200.

- 8.- Zimmerli, W., Waldvogel, F. Vaudaux, P. and Nydegger, U. 1982. Pathogenesis of Foreign Body Infection: Description and Characteristics of an Animal Model. J.Infect Dis. 146 (4): 487-498.

- 9.- Peters, G., Locci, R. and Pulverer, G. 1982. Adherence and Growth of Coagulase Negative Staphylococci on Surfaces of Intravenous Catheters. J.Infect.Dis.146 (4): 479-482.

- 10.- Christensen, G., Simpson, W.A., Bisno, A.L. and Beachey, E. 1982. Adherence of Slime Producing Strains of Staphylococcus epidermidis to Smooth Surfaces. Infect Immun.37 (1): 318-326.

- 11.- Hogt, A.H., Dankert, J., deVries, J.A. and Feijen, J. 1983. Adhesion of Coagulase Negative Staphylococci to Biomaterials. *J.Gen.Microbiol.* 129 :2959-2968.
- 12.- Sheth, S.K., Franson, T.R., Rose, H.D., Buckmire, F.L. Cooper, J.A. and Sohnle, P.G. 1983. Colonization of Bacteria on Polyvinyl Chloride and Teflon Intravascular Catheters in Hospitalized Patients. *J.Clin.Microbiol.* 18 (5): 1061-1063.
- 13.- Marrie, T.J., Noble, M.A. and Costerton, J.W. 1983. Examination of the Morphology of Bacteria Adhering to Peritoneal Dialysis Catheters by Scanning and Transmission Electron Microscopy. *J.Clin.Microbiol.* 18 (6): 1388-1398.
- 14.- Marrie, T.J. and Costerton, J.W. 1984. Scanning and Transmission Electron Microscopy of In Situ Bacterial Colonization of Intravenous and Intraarterial Catheters. *J.Clin.Microbiol.* 19 (5): 687-693.
- 15.- Bayston, R. and Penny, S.R. 1972. Excessive Production of Mucoid Substance in *Staphylococcus S 11 A*: A Possible Factor in Colonization of Holter Shunts. *Dev.Med.Child. Neurol.* 14 (suppl 27): 25-26.

- 16.- Quie, P.G. and Belani, K.K. 1987. Coagulase Negative Staphylococcal Adherence and Persistence. J.Infect.Dis. 156 (4): 543-547.
- 17.- Ludwicka, A., Uhlenbruck, G., Peters, G., Gray, E.D., Jeljaszewicz, J. and Pulverer, G. 1984. Investigation on Extracellular Slime Substance Produced by Staphylococcus epidermidis. Zbl.Bakt.Hyg. A 258.256-267.
- 18.- Verbrugh, H.A., Peters, R., Peterson, P.K. and Verhoef, J. 1978. Phagocytosis and Killing of Staphylococci by Human Polimorphonuclear and Mononuclear Leucocytes. J.Clin. Pathol. 31 .539-545.
- 19.- Verhoef, J. Peterson, P.K. and Quie, P. 1977. Kinetics of Staphylococcal Opsonization, Attachment, Ingestion and Killing by Human Polimorphonuclear Leucocytes: A Quantitative Assay Using ³ H Thymidine Labeled Bacteria. J. Immunol Methods. 14 . 303-311.
- 20.- Clark, L.A. and Easmon, S.F. 1986. Opsonic Requirements of Staphylococcus epidermidis. J.Med.Microbiol. 22.1-7.

- 21.- Verhoef, J., Peterson, P.K. Sabath, L.D. & Quie P.G. 1977.
Opsonic Requieriments for Staphylococcal Phagocytosis.
Heterogeneity Among Strains. Immunol. 33. 191-197.
- 22.- Miles, A.A. y Misra, S.S. 1938. The Estimation of the
Bactericidal Power of the Blood. J.Hyg. 38. 732-749.
- 23.- Grabtree, K. and Hinsdill, R. 1974. Fundamental
Experiments in Microbiology. W.B.Saunders Company,
- 24.- Noble, M.A., Reid, P.E., Park, C.M. and Chan, V.Y.H.
1986. Inhibition of Human Neutrophil Bacteriocidal
Activity by Extracellular Substance Form Slime
Producing Staphylococcus epidermidis. Diagn Microbiol.
4: 335-339.
- 25.- Gray, E.D., Peters, G., Versteegen, M. and Regelman, W.E.
1984. Effect of Extracellular Slime Substance form
Staphylococcus epidermidis on the Human Cellular Immune
Response. Lancet. 365-367.
- 26.- Bergey's Manual fo systematic Bacteriology, vol. 2.

