

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

Catedrático: Dr. S. OVEJERO DEL AGUA

ANTIBIOGRAMA DE ALGUNOS ESTAFILOCOCOS DE ORIGEN HUMANO Y ANIMAL

Por el Prof. S. Ovejero

Dr. F. Rejas

Dr. F. Villalón

Desde el comienzo de la era de los antibióticos, se viene observando en los estafilococos de origen humano una variación de sensibilidad a los mismos, que en general es paralelo a los cambios de la terapéutica antibiótica. La bibliografía que estudia este problema es amplísima, sin embargo los ensayos sobre cepas de origen animal son poco numerosos, y muy escasos los hechos sobre el estafilococo responsable de la mamitis gangrenosa de la oveja y la cabra.

El objeto de este ensayo, es realizar un antibiograma, y estudio bacteriológico comparativo de las más recientes cepas de *Micrococcus mastiditis gangrenae ovis* que figuran en nuestra colección, junto con otras cepas de *Stafilococcus piógenes* de origen humano y animal, como continuación al trabajo publicado hace varios años por uno de nosotros (S. OVEJERO).

Debido al escaso empleo hasta la época muy reciente, de la terapéutica antibiótica en las especies animales, pensamos, en principio, que

no eran probables grandes variaciones de sensibilidad a los antibióticos de las cepas de origen animal. Por lo que, decidimos comprobar la sensibilidad de estas cepas a los antibióticos de uso común, —penicilina, estreptomina, cloranfenicol, y tetraciclina—, y algunos otros, de precio no prohibitivo, o en fase de experimentación, y producción a no largo plazo, en nuestra Patria —eritromicina, kanamicina y frameticina—, olvidándonos intencionadamente de varios, —spiramicina, novobiocina y oleandomicina—, de difícil adquisición en la práctica.

El estudio lo hemos realizado sobre diez cepas de *Micrococcus mastiditis*, dos de *Stafilococcus piógenes* de origen animal, y cuatro de *Stafilococcus piógenes* de origen humano.

Describiremos en primer término los caracteres estudiados en las cepas, para comentar seguidamente los resultados obtenidos en el antibiograma.

ESTUDIO BACTERIOLOGICO

Morfología.—Cocos de 0,3-0,5 micras de diámetro, agrupados en masas o formando a veces parejas. No se observan diferencias entre las diversas variedades.

Coloración.—Gram positivos.

Caracteres culturales.—Caldo nutritivo: Enturbian el medio con sedimento granuloso posterior. Forman anillo más o menos marcado en límite del caldo.

Agar triptosa: Colonias pequeñas 2 mm. de diámetro, lisas, transparentes, blanco grisáceas. Algunas, a los tres o cinco días, presentan coloración ligeramente amarillenta.

Metabolismo.—Gelatina: Todas las cepas la licuan.

Leche tornasolada: Las tres variedades, en general, la coagulan y reducen, disolviendo el coágulo entre los dos y cinco días. Algunas cepas, sin embargo no alteran la leche.

Producción de indol: No producen.

Producción de SH₂: Las cepas de *Micrococcus mastiditis* no producen. Las de *Staf. piógenes* pueden o no producirlos, pero nunca masivamente.

Acción sobre los nitratos: Reducen nitratos a nitritos.

Prueba de Voges-Proskauer: Las tres variedades pueden o no producir acetilmetilcarbinol.

Prueba del Rojo Metilo: En general positiva.

Metabolismo hidrocarbonado: No existen diferencias en las tres variedades. Fermentan con producción de ácido, glucosa, galactosa, manosa, lactosa, sacarosa, maltosa, manita y levulosa. No alteran, arabinosa ramnosa, xilosa, rafinosa, inulina, sorbita, dulcita, adonita e inosita.

Pruebas diferenciales.—Medio de Chapmann manitado: Todas las cepas dan colonias amarillas.

Medio de Chapmann al cristal violeta: Las cepas de *Micrococcus mastiditis* presentan colonias violetas, con abundante o escaso crecimiento.

Todas las cepas de *Staf. piógenes* dan crecimiento escaso con colonias violetas.

Capacidad toxigénica.—Hemolisinas: Cepas de *Micrococcus mastiditis*: Producen hemolisis β sobre glóbulos rojos de oveja. En general producen hemolisina α , mostrando a veces diferencias de intensidad según se trate de glóbulos de carnero o conejo.

Cepas de *Staf. piógenes* de origen animal: Producen hemolisina α y β .

Cepas de *Staf. piógenes* de origen humano: Producen hemolisina α y no hemolisina β .

Coagulasa: Las tres variedades coagulan el plasma de carnero y de conejo.

Fibrinolisisina: Las tres variedades lisan en mayor o menor proporción el plasma coagulado de carnero.

Dermonecrotoxina: En general todas las cepas producen con mayor o menor intensidad necrosis en conejo, aunque algunas solamente dan lugar a un proceso inflamatorio.

Poder patógeno para el ratón:

Inoculación intraperitoneal de 0,25 cc. de cultivo en caldo de 24 horas.

Las cepas de *Micrococcus mastiditis* matan al ratón entre uno y siete días. Sólomente una cepa no mató.

Las cepas de *Staf. piógenes* tardan más en matar al ratón, entre uno y quince días.

Relación entre las diversas pruebas.—Analizando las tablas que acompañan este trabajo, se puede observar que no existe relación alguna entre el metabolismo bacteriano y la capacidad toxigénica de las cepas.

Parece que cuando el crecimiento es escaso sobre el medio Chapman al cristal violeta, las cepas son excelentes productoras de toxinas.

Sin embargo suele existir cierta correspondencia, entre la capacidad hemolítica y dermonecrotóxica. Cuando la cantidad de hemolisina α es baja, no suele producirse necrosis en conejo, manifestando solamente un proceso inflamatorio.

No se observa relación alguna entre la capacidad hemolítica o dermonecrotóxica y la tasa de coagulasa, fibrinolisisina y poder patógeno para ratón.

Caracteres diferenciales entre las tres variedades.—Las tres variedades son iguales en sus caracteres morfológicos, metabólicos y toxigénicos, excepto en que el *Micrococcus mastiditis* suele matar más rápidamente al ratón que el *Staf. piógenes*. Las cepas de origen humano se diferencian fácilmente de las de origen animal, por no producir las primeras hemolisina β .

ANTIBIOGRAMA

El ensayo de sensibilidad se ha realizado con los antibióticos siguientes:

Penicilina potásica (Antibióticos S. A.).

Sulfato de dihidroestreptomicina (Antibióticos S. A.).

Clorhidrato de tetraciclina (Antibióticos, S. A.).

Cloranfenicol (Antibióticos S. A.).

Sulfato de frameticina (Uclaf.).

Sulfato de kanamicina (Bristol).

Glucosheptonato de eritromicina (Lilly).

Técnicas empleadas.—Previa pesada, en condiciones estériles, de los antibióticos, sobre riqueza conocida de producto base, se hicieron soluciones de alta concentración en agua destilada para estreptomicina, kanamicina y eritromicina, en tampón pH 4,5 tetraciclina, en tampón pH 6 penicilina, y en tampón pH 7 frameticina y cloranfenicol.

A partir de estas soluciones concentradas, se hicieron soluciones

de antibióticos en caldo Pennassay, con concentraciones de 0.5, 1,5, 10,20 y 50 unidades o mcg/cc., sobre 10 cc. de caldo por tubo.

Cada tubo fué sembrado con 0,1 cc. de un cultivo en caldo de 24 horas. Incubación 24 horas a 37°, seguida de lectura.

Resultados.—Sensibilidad a la penicilina: *Micrococcus mastiditis*: Bastantes sensibles. El 80 por ciento de cepas es sensible a 0,5-1 u/cc., y el 20 por ciento restante a 5-10 u/cc.

Staf. piógenes de origen animal: Muy sensibles. El 100 por ciento es sensible a 0,5 u/cc.

Staf. piógenes de origen humano: Relativamente sensibles. Un 25 por ciento es sensible a 0,5-1 u/cc., el resto necesita concentraciones entre 5-50 u/cc.

Sensibilidad a la estreptomicina: Las tres variedades son en general poco sensibles, necesitando concentraciones altas, entre 5 y 50 u/cc. siendo numerosas las cepas resistentes a esta última concentración.

Sensibilidad al cloranfenicol: La totalidad de las cepas de las tres variedades son igualmente sensibles a este antibiótico, necesitando concentraciones no muy elevadas, 5-10 mcg./cc., para la inhibición del crecimiento.

Sensibilidad a la tetraciclina: Las tres variedades son muy sensibles, inhibiendo el crecimiento concentraciones de 0,5-1 u/cc.

Sensibilidad a la eritromicina: Las tres variedades son muy sensibles, 0,5-1 u/cc., excepto un 30 por ciento de cepas del *Micrococcus mastiditis* que necesita concentraciones entre 5-10 u/cc.

Sensibilidad a la frameticina: Las tres variedades son relativamente sensibles, con concentraciones de 5-10 u/cc. en general, excepto en el *Micrococcus mastiditis* en que un 20 por ciento de cepas es resistente a concentraciones de 50 u/cc.

Sensibilidad a la kanamicina: Las cepas de *Staf. piógenes* son relativamente sensibles, necesitando concentraciones de 5-10 mcg/cc.

La sensibilidad del *Micrococcus mastiditis* es muy variable, desde 0,5-50 mcg/cc., presentando un 20 por ciento de cepas resistentes a esta última concentración.

Discusión.—En general las cepas de *Micrococcus mastiditis* son menos sensibles a los antibióticos y de sensibilidad más variable que las cepas de *Staf. piógenes*.

De entre los antibióticos ensayados, se encuentran dos francamente activos —tetraciclina y eritromicina—: uno bastante activo y de resul-

tados muy constantes —cloranfenicol—, y tres —penicilina, frameticina y kanamicina— con resultados buenos sobre algunas cepas, pero muy variables, presentando los dos últimos cepas resistentes a la más alta concentración utilizada. La estreptomycinina es muy activa.

Como se puede observar, todas las cepas, tanto las de origen animal como las humanas, son en general sensibles a los antibióticos clásicos, sin variación manifiesta de sensibilidad para los mismos, debido con toda seguridad al escaso uso de la terapéutica antibiótica en las especies animales y de algunos antibióticos en determinados procesos patológicos de la especie humana. Efectivamente, la sensibilidad de las cepas humanas a la tetraciclina y cloranfenicol no ha variado, no obstante se observa una sensibilidad muy escasa para la penicilina, antibiótico de tan amplio uso en los procesos de tipo inflamatorio y supurativo.

Es de señalar que la acción bacteriostática de la frameticina y kanamicina es exactamente la misma, y muy similar en las cepas resistentes al de la estreptomycinina.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio bacteriológico y de sensibilidad a diversos antibióticos, de varias cepas de estafilococos procedentes de mamitis gangrenosa de oveja y cabra, y de procesos piogenos humanos y de especies animales.

Las tres variedades estudiadas cumplen los clásicos postulados de patogeneidad —manita, coagulasa y fibrinolisisina positivos—, y son exactamente iguales en sus caracteres morfológicos, metabólicos y toxigénicos, excepto en que los estafilococos procedentes de mamitis gangrenosa suelen matar más rápidamente al ratón que los estafilococos piógenos. Las cepas de origen humano, al no producir hemolisina β se diferencian fácilmente de las cepas de origen animal.

Se ha comprobado la sensibilidad de las cepas frente a diversos antibióticos —penicilina, estreptomycinina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, frameticina y kanamicina—. Tetraciclina y eritromicina son francamente activos; bastante activo y de resultados muy constantes el cloranfenicol; muy variables penicilina, frameticina y kanamicina; siendo muy poco activa la estreptomycinina.

En general las cepas de estafilococos procedentes de mamitis son menos sensibles a los antibióticos y de resultados más variables que las cepas de *Staf. piógenus*, excepto para la penicilina, que quizá por procesos de habituación, es francamente menos activa para los estafilococos humanos que para los de origen animal.

RESUME

On a réalisé une étude bactériologique et de sensibilité a divers antibiotiques, de différentes souches de staphylocoques provenant de mammites gangreneuse chez la brebis et la chèvre, et de processus pyogènes humains et d'especes animales.

Les trois variétés étudiées remplissent les postulats classiques de pouvoir pathogène, —mannite, coagulase et fibrinolysine positives— et sont exactement semblables en leurs caractères morphologiques, métaboliques et toxigéniques, sauf dans le fait que les staphylocoques provenant de mammites gangreneuses, sont susceptibles de tuer plus rapidement la souris que les staphylocoques pyogènes. Les souches d'origine humaine, ne produisant pas d'hémolysine β se différencient facilement des souches d'origine animale.

On a constaté la sensibilité des souches en présence de divers antibiotiques, —pénicilline, streptomycine, chloromycétine, tetracycline, érythromycine, framycétine, kanamycine—. La tetracycline et l'érythromycine sont réellement actives; la chloromycétine est assez active et donne des résultats très constants; la pénicilline, la framycétine et la kanamycine donnent des résultats très variables; la streptomycine étant très peu active.

En général les souches de staphylocoques provenant de mammites sont moins sensibles aux antibiotiques et donnent des résultats plus variables que les souches de staphylocoques pyogènes, sauf en ce qui concerne la pénicilline, qui peut-être par processus d'accoutumance, est réellement moins active pour les staphylocoques humains que pour ceux d'origine animale.

SUMMARY

A study has been made of the bacteriologi and sensitivity to various antibiotics of different strains of staphylococci taken from gangrenous mammitis of sheep and goat, and pus-forming processes in man and some animals.

The three species studied fulfil the classical condition of pathogenicity (mannite, positive coagulase and fibrinolysin) and are exactly similar in their morphological, metabolical and toxigenic qualities except that the staphylococci proceeding from gangrenous mammitis are usually more quickly fatal to mouse than the piogenous staphylococci. The strains taken from man, because they do not produce Haemolysin are easily distinguished from those of animal origin.

The sensitivity of the strain to the various antibiotics has been proved: penicillin, streptomycin, chloramphenicol, tetracyclin, erythromycin, framycetin and kanamycin. Tetracyclin and erythromycin are freely active. Chloramphenicol is fairly active and gives very constant results; Penicillin, framycetin and kanamycin give very variable results. Streptomycin is not very active. In general the strains proceeding from mammitis are less sensible to piogenous staphylococci, except for penicillin with staphylococci than with those of animal origin.

METABOLISMO BACTERIANO Y MEDIOS DIFERENCIALES

C E P A S	Voges-Proskauer	Rojo Metilo	Nitratos	Indol	SH ₂	Gelatina	Leche Tomada	Chapmann Manifiado	Chapmann Cristal violeta
1	+	+	R	—	—	L	CRD	CA	BCV
2	+	+	R	—	—	L	CRD	CA	ECV
3	+	—	R	—	—	L	CRD	CA	BCV
4	—	+	R	—	—	L	CRD	CA	ECV
5	—	+	R	—	—	L	CD	CA	ECV
6	+	—	R	—	—	L	CRD	CA	ECV
7	—	+	R	—	—	L	—	CA	ECV
8	+	+	R	—	—	L	CRD	CA	ECV
9	—	+	R	—	—	L	CRD	CA	BCV
10	+	+	R	—	—	L	CRD	CA	BCV
Staf. piógenes origen animal	+	+	R	—	—	L	—	CA	ECV
2	+	+	R	—	+	L	CRD	CA	ECV
Staf. piógenes origen humano	+	+	R	—	+	L	CRD	CA	ECV
1	+	+	R	—	+	L	CRD	CA	ECV
2	+	+	R	—	+	L	CRD	CA	ECV
3	—	+	R	—	+	L	—	CA	ECV
4	—	+	R	—	+	L	CRD	CA	ECV

NOTAS:

+: Positivo.
+ —: Ligeramente positivo.
—: Negativo.

R: Reduce.
L: Licua.
C: Coagula.
D: Disuelve.

CA: Colonias amarillas.
BCV: Buen crecimiento violeta.
ECV: Escaso crecimiento violeta.

METABOLISMO HIDROCARBONADO

C E P A S	Ara- binosa	Ram- nosa	Xitosa	Glucosa	Galac- tosa	Manosa	Levu- losa	Lactosa	Saca- rosa	Maltosa	Rafí- nosa	Inulina	Manita	Sorbita	Dulcita	Adonita	Inosita
1	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
2	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
3	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
4	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
5	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
6	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
7	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
8	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
9	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
10	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
Staf. piógenos ori- gen animal	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
1	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
2	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
3	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—
4	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—

NOTA: + producción de ácido.
 + — ligera producción de ácido.
 — no producción de ácido.

PODER TOXIGENICO

C E P A S	HEMOLISISNA				COAGULASA		FIBRINOLISISNA P. Oveja	Dermone- crotoxina	Muerte ra- tón días
	G. OVEJA		G. Conejo		P. Oveja	P. Conejo			
	Alfa	Beta	Alfa	Beta					
1	+	+	+	+	+	+	LT	N	2
2	+	—	+	+	+	+	L	N	6
3	+	—	+	+	+	+	L	I	6
4	+	—	+	+	+	+	L	I	—
5	+	—	+	+	+	+	L	N	1
6	+	—	+	+	+	+	LT	N	4
7	+	—	+	+	+	+	L	N	1
8	+	—	+	+	+	+	L	I	7
9	+	—	+	+	+	+	LT	N	1
10	+	—	+	+	+	+	L	N	4
Staf. piógenos origen animal	+	—	+	+	+	+	L	N	10
1	+	—	+	+	+	+	L	N	8
2	+	—	+	+	+	+	L	N	—
3	+	—	+	+	+	+	L	N	4
4	+	—	+	+	+	+	L	I	14
5	+	—	+	+	+	+	L	N	15
6	+	—	+	+	+	+	L	N	1

NOTAS:
 +: Positivo.
 + —: Ligeramente positivo.
 —: Negativo.
 I: Inflamación.
 N: Necrosis
 L: Licua.
 LT: Licuación total.

ANTIBIOGRAMA

Inhibición de crecimiento (u/cc. o mcg/cc.)

C E P A S	Penicilina	Estreptomina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Eritromicina	Framicetina	Kanamicina
1	0.5	5	5	0.5	1	5	5
2	0.5	50	5	0.5	1	0.5	5
3	5	>50	5	1	5	>50	>50
4	0.5	50	5	0.5	1	10	20
5	0.5	20	5	0.5	5	5	10
6	0.5	20	5	1	0.5	1	1
7	0.5	>50	10	0.5	1	0.5	0.5
8	0.5	50	10	0.5	1	1	5
7	0.5	10	5	0.5	0.5	5	5
10	5	>50	5	1	5	>50	>50
Staf. piógenos							
1	0.5	20	5	0.5	0.5	5	5
2	1	10	5	1	1	5	10
Staf. piógenos							
1	0.5	10	5	0.5	0.5	5	5
2	50	>50	10	0.5	1	5	10
3	10	50	5	1	1	10	10
4	20	50	10	0.5	1	10	10

BIBLIOGRAFIA

- BLANCO, A. 1952.—Ciencia Veterinaria, 13, 271.
 BUTTIAUX, R., BROGNIART, R. 1947.—Ann. Inst. Pasteur, 13,830.
 CAPOCCACCIA, L. 1956.—Arch. Ital. Sci. med. trop. 37.
 CARRAZ, M., BERTOYE, A., 1950.—Ann. Inst. Pasteur, 78,102.
 DARRASSE, H. 1957.—Ann. Inst. Pasteur, 92, 698.
 LECOMTE, J. P.—*La Framycetina, quelques applications en pratique Veterinaire*. These. Ecole Veterinaire Alfort.
 LUZTZ, A., y otros.—Ann. Inst. Pasteur, 92, 778.
 MASSENET-DE ROCHE, B. 1954.—*La Framycetina*, These. Faculte Medicine. Paris.
 MORIKUBO, Y. 1958.—J. Antib., 11, 9,171.
 OVEJERO, S. DIEZ, M., PASCUAL, M. R. 1955.—Ann. Facultad Veterinaria, León, 1,53.
 PILLET, J., ISBIR, S., MERCIER, P., 1950.—Ann. Inst. Pasteur, 78,638.