

LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA SOBRE LA CASEINA COMO PRUEBA COMPLEMENTARIA RAPIDA EN LA IDENTIFICACION DE ESTAFILOCOCOS.

(THE PROTEOLITIC ACTIVITY ON THE CASEIN AS AN EARLY COMPLEMENTARY
TEST IN THE STAPHYLOCOCCAL IDENTIFICATION).

por

ESPEJO SERRANO, J.; A. GARRIDO CONTRERAS y F. CUELLO GIJON*

I. Introducción.

Según Baird-Parker (1974) el *Staphylococcus aureus* se diferencia del *S. epidermis* y del *S. saprophyticus* por la producción de coagulasa, nucleasa termorresistente y alfa hemolisina. Estas tres especies se diferencian entre sí por la composición de su pared celular respecto a peptidoglicano y ácidos teicoicos (Schleifer y Kokur, 1973, Oeding, 1974).

Para los estudios de rutina se suele recomendar la prueba de la coagulasa (Baird-Parker, 1974) así como la de la DN-asa (Lachica *et al.*, 1971; Barry *et al.*, 1973).

Por otra parte, parece ser que existe estrecha correlación entre la actividad proteásica del *S. aureus* y su virulencia sobre el ratón (Chesbro *et al.*, 1974). Así recientemente, algunos autores (Males *et al.*, 1974) a la hora de valorar los factores condicionantes de la virulencia del germen, consideran como primordiales, entre otros, la actividad proteolítica sobre la caseína y la gelatina.

El presente trabajo, en principio, se ha realizado con la finalidad de tipificar las cepas motivo de estudio al tiempo de comprobar la actividad proteolítica de las mismas.

II. Material y métodos.

El estudio se ha realizado sobre 150 cepas de estafilococos, de las cuales 127 eran de origen humano, y el resto, de biopsias animales traídas al laboratorio para su estudio microbiológico. Las de procedencia humana fueron aisladas de diferentes productos patológicos y cedidas por el Dr. Rodríguez Burgos, jefe de los Servicios de Microbiología de la Ciudad Sanitaria Reina Sofía de Córdoba.

* Cátedra de Microbiología e Inmunología. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba.
Recibido para publicación el 23-9-77.

Con las distintas cepas se han realizado pruebas de la manita (en aerobiosis y anaerobiosis), coagulasa, hemolisis y DN-asa.

En todos los casos se han seguido normas estandar, utilizándose en la preparación de los medios y reactivos productos de calidad bacteriológica de las casas DIFCO y MERCK.

La prueba de la coagulasa se hizo por duplicado empleándose, por una parte, plasma citratado de conejo, filtrado y repartido en tubos estériles, en los que se suspendía el cultivo de estafilococos; por otra parte, se ha hecho en medio sólido utilizando plasma liofilizado, que una vez reconstituido, se adicionaba al medio Coagulasa Agar Base (ambos DIFCO).

También se ha estudiado la actividad proteolítica sobre la caseína utilizándose para ello el SMCA (Standard Method Caseinate Agar), que es el medio mejorado por Martley *et al.*, (1970) para la detección y recuento de la flora proteolítica, con grandes ventajas sobre otros métodos destinados a dicho fin, como ya han demostrado Lawrence *et al.*, (1971) y más recientemente Espejo (1974 y 1975).

Asimismo, se ha visto la actividad sobre la gelatina, empleándose el medio Nutrient Gelatin de DIFCO.

La temperatura de incubación fue siempre a $37 \pm 0,2^\circ \text{C}$.

III. Resultados y discusión.

De las observaciones realizadas se ha podido comprobar que no existe una correspondencia total entre las pruebas recomendadas.

Así, por ejemplo, tomando como referencia la capacidad DN-asa hemos encontrado que: un 10 p. 100 de los DN-asa negativos degradaban la manita aeróbicamente; un 19 p. 100 lo hacían sólo en aerobiosis y otro 19 sólo anaeróbicamente. Mientras que el 9 p. 100 de los DN-asa positivos no la degradaban en anaerobiosis, y solamente un 2 p. 100 no lo hacía en condiciones aeróbicas.

Igualmente se ha visto que el 21 p. 100 de los DN-asa negativos eran coagulasa positivos.

Porcentajes de no correspondencia mayores a los hallados por nosotros han sido encontrados por diferentes autores. Cioglia *et al.*, (1972 y 1975), en un estudio reciente sobre 518 cepas de *S. aureus* derivadas de un mismo clon, encontraron que el 72 p. 100 era coagulasa negativo y un 82,6 p. 100 no producían hemólisis. Agrupadas las cepas en 28 tipos observan que un 32 p. 100 de la DN-asa positivas no degradaba la manita aeróbicamente y otro 30 p. 100 no lo hacían en anaerobiosis.

Asimismo, Devrise y Oeding (1975), trabajando con estafilococos de origen animal encontraron que gran número de *S. epidermis* eran productores de coagulasa. Posteriormente (1976) los mismos autores hallaron resultados similares con estafilococos de origen humano y animal.

Respecto a la prueba de la coagulasa queremos resaltar que, si bien no se han observado diferencias entre los dos métodos utilizados, consideramos mucho más útil el patrón sobre tubos, toda vez que permite una lectura mejor y cronometrable, lo que favorece la valoración de la citada actividad.

En cuanto a la actividad proteolítica sobre el caseinato sódico, se ha visto que existe una diferencia neta y fácilmente demostrable entre la manifestada por los DN-asa positivos y DN-asa negativos.

Los DN-asa positivos han producido siempre un halo de proteolisis que podemos considerar tipo 1 (figura 1), en el que se observa cómo la caseína parcialmente degradada (paracaseínas) produce una precipitación uniforme y homogénea de paracaseinato cálcico.

Este tipo de halo ya fué observado por Martley *et al.*, (1970) trabajando con cepas conocidas de *S. aureus*.

La manifestación de la actividad de los DN-asa negativos es de la considerada como tipo 2 (figura 2), que se caracteriza en que por existir una ulterior degradación de las paracaseínas aparece una zona clara entre el frente de precipitación del paracaseinato cálcico y la colonia.

Hay que tener en cuenta que un 22 p. 100 de los DN-asa negativos no manifestó actividad proteolítica alguna a las 24 y 48 horas de incubación, haciéndolo sólo algunos de éstos, pasadas las 72 horas, de forma escasa y difusa.

Respecto a la acción sobre la gelatina, se ha podido demostrar que a las 24 horas sólo licuo un 8 p. 100, coincidiendo todos con cepas DN-asa positivas. A los 4 días la licuó el 21 p. 100, del que el 16 p. 100 era DN-asa positivo y el 5 p. 100 fue DN-asa negativo. A los 11 días se produjo licuación en el 8 p. 100 de los tubos, además de los citados anteriormente, correspondiendo a inoculados con cepas DN-asa positivas. No se observó cambio alguno al cabo de los 21 días de incubación.

IV. Conclusiones.

1 La prueba de la capacidad proteásica de los estafilococos, sobre la caseína, puede ser de gran utilidad para el estudio de los mismos, dada la correspondencia existente con la DN-asa, así como por la facilidad y rapidez en evidenciarla.

2. Estimamos que una identificación segura de las especies patógenas de origen humano y animal deberá realizarse conjugando la dócima citada con las pruebas de la manita y DN-asa.

V. *Resumen.*

Para el estudio e identificación de 150 cepas de estafilococos —de origen humano y animal— se han realizado las pruebas de la manita (aerobia y anaerobia), DN-asa, coagulasa, heolisis y de actividad proteásica sobre la caseína y gelatina.

A lo largo del estudio se ha evidenciado que la manifestación de la actividad proteolítica sobre la caseína puede representar una prueba complementaria, rápida e interesante, en la identificación de estafilococos, toda vez que, como se ha podido demostrar, existen diferencias significativas y fácilmente ostensibles entre la presentada por los DN-asa positivos y los DN-asa negativos.

VI. *Summary.*

For the study the 150 staphylococcal strains —of human and animal origin— it has been carried out the tests of mannitol (aerobic and anaerobic), DN-ase, coagulase, hemolysis and proteolytic activity on casein and gelatin.

Throughout the work it has been seen that there is a significant difference between the proteolytic capacity of the DN-ase positive and DN-ase negative staphylococci. So, this evidence can be an early and interesting complementary test for the staphylococcal identification.

VII. *Bibliografía.*

- Barry, A. L.; R. V. F. Lachica, and F. W. Atchinson, 1973.—Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease test. *Appl. Microbiol.*, 25: 496.
- Baird-Parker, A. C. 1974.—Micrococaceae. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., Baltimore, Williams and Wilkins Co.
- Chesbro, W.; N. Taylor and M. Smith, 1972.—Relationship between host origin of staphylococcal strain and their virulence for mice. *Can J. Microbiol.*, 18: 1371.
- Cioggia, A. M.; P. Ucheldu, and F. Palmos, 1972.—Ricerchi Biochimichi sugli stafilococchi "patogeni" *Ann. Sclavo*, 14: 217.

- Cioglia, A. M.; A. Contu and P. Meloni, 1975.—Variabilità dei caratteri biochimici in *Staphylococcus aureus*. *L'Igiene Moderna*, 3: 321.
- Devrise, L. A. and P. Oeding, 1975.—Coagulase and heat-resistant nuclease producing by *Staphylococcus epidermis* strains from animals. *J. appl. Bact.*, 39: 197.
- Devrise, L. A. and Oeding, P. 1976.—Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *Res. in Vet. Sci.*, 21: 284.
- Espejo Serrano, J. 1974.—Datos sin publicar.
- Espejo Serrano, J. 1975.—Variaciones estacionales de algunas microfloras de interés tecnológico de la leche cruda. Tesis Doctoral, p. 164. Univ. de Córdoba.
- Lachica, R. V. F.; Hoerich, P. D. and Genigeorgis, C. 1971.—Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase positive cocci. *Appl. Microbiol.*, 21: 823.
- Lawrence, R. C.; Martley, F. G.; Teese, J. G. and Newstead, D. F. 1970.—The rapid screening of milk samples for proteolytic and total bacteria counts. *N. Z. Dairy Res. Inst., Publication n. 517.*
- Males, B. M.; Rogers, J. A. Jr. and Parisi, J. T. 1975.—Virulence factors of biotypes of *Staphylococcus epidermis* from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.*, 18: 1371.
- Martley, F. G.; Jayashankar, R. S. and Lawrence, R. C. 1970.—An improved agar medium for the detection of proteolytic organism in total bacterial count. *J. Appl. Bact.*, 33: 363.
- Oeding, P. 1974.—Cellular antigens of staphylococci. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 236: 15.
- Schleifer, K. H. and Kokur, M. 1973.—Classification of staphylococci based on chemical and biochemical properties. *Arch. Mikrobiol.*, 93: 65.

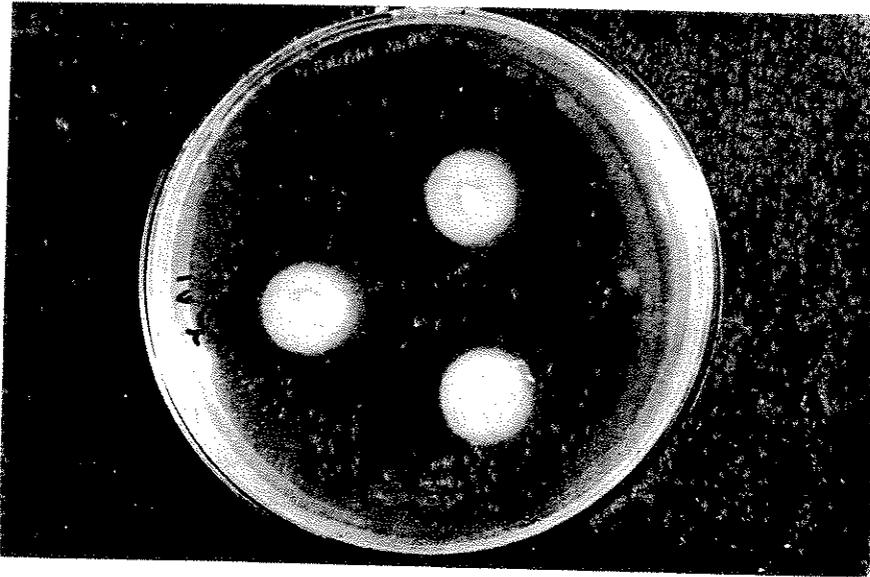


FIG. 1.—Halo de proteolisis tipo 1, manifestado por las cepas de estafilococos DN-asa positivos.

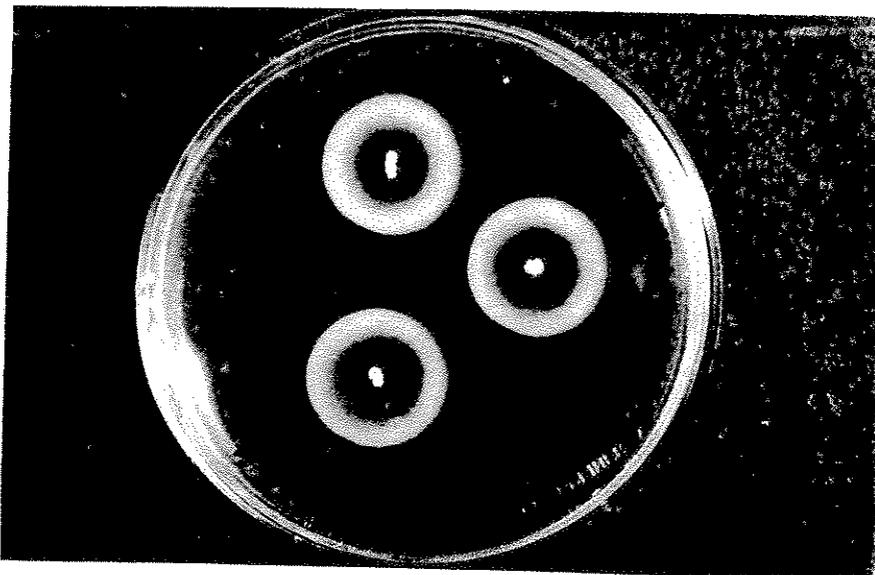


FIG. 2.—Halo de proteolisis tipo 2, manifestado por las cepas de estafilococos DN-asa negativos.