

16 300627
2ej



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

IDENTIFICACION PRESUNTIVA DE *Streptococcus pyogenes* Y *Streptococcus agalactiae* POR MEDIO DE DISCOS DE PAPEL FILTRO IMPREGNADOS CON BAGITRACINA, BETA-LISINA Y TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :
LAURA ALEJANDRA SERVIN DOMINGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:
Q.B.P. MA. GUADALUPE MORALES M.



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

INCORPORADA A LA UNAM

*Revisada y aceptada y
8. mayo 91*

*Revisada y aceptada
28 Mayo 91*

IDENTIFICACION PRESUNTIVA DE *SIREPIOCOCCUS* ~~oxydans~~
Y *SIREPIOCOCCUS* ~~agalactiae~~ POR MEDIO DE DISCOS
DE PAPEL FILTRO IMPREGNADOS CON BACITRACINA,
BETA-LISINA Y TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL.

*Revisada y aceptada
3 mayo 2011
f. d. /
H. d.*

*amp
3-4-91*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a i
LAURA ALEJANDRA SERVIN DOMINGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

OBP. MA. GUADALUPE MORALES M.

México, D. F.

1 9 9 1

El trabajo experimental de este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Control de Biológicos de la Escuela Nacional de Ciencias biológicas del Instituto Politécnico Nacional, y en el laboratorio de desarrollo de Bigaux Diagnóstica, bajo la dirección del Dr. Rubén de la Cruz y del M. en C. Alejandro Landa.

I N D I C E

OBJETIVO	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO	45
MEDIOS DE CULTIVO	47
REACTIVOS	48
CEPAS BACTERIANAS	49
METODOS	50
RESULTADOS	63
DISCUSION DE RESULTADOS	67
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFIA	78

OBJETIVO

Identificar de forma presuntiva, y estandarizada, a los estreptococos beta-hemolíticos del grupo A y del grupo B de Lancefield, por medio de discos de papel filtro impregnados con bacitracina, trimetoprim-sulfametoxazol y beta-lisina.

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

Definición y estructura de los estreptococos:

Los estreptococos se observaron por vez primera en un exudado purulento de enfermos de erisipela (Billroth, 1874) y de fiebre puerperal (Pasteur, 1875). Desde entonces estos microorganismos han sido objeto de varios estudios (16).

Los estreptococos son cocos Gram positivos. Sus células son esféricas, ovales, y en algunos casos alargadas o bacilares, forman cadenas más o menos largas (13,21,48).

Son microorganismos aerobios facultativos, aunque se desarrollan mejor en atmósferas con un contenido de oxígeno reducido. Los estreptococos son catalasa y citocromo oxidasa negativos. Estas características bioquímicas y su disposición celular permiten diferenciarlos de los estafilococos (13,21,48).

El género Streptococcus es uno de los cinco géneros pertenecientes a la familia Streptococcaceae. Los otros cuatro géneros son Aerococcus, Gamella, Leuconostoc y Pediococcus (48).

Los miembros del género Streptococcus constituyen la flora

bacteriana dominante de la boca a la faringe humanas. Algunas especies de estreptococos son habitantes normales del tracto intestinal (21).

Es exiguo el crecimiento de los estreptococos en agar nutritivo; para su desarrollo se requiere de un medio enriquecido. Los estreptococos son exigentes y complicados en relación a sus requerimientos nutritivos. La fermentación de glucósidos es homofermentativa, con el ácido láctico dextrógiro como producto final. Necesitan de vitaminas del grupo B y aminoácidos para su crecimiento (21,48,49).

Similares a otras bacterias patógenas del hombre, la temperatura óptima de crecimiento es de 37° C. A temperaturas de 56° C muere la mayoría de las cepas hemolíticas estreptocócicas; sólo algunas especies sobreviven a dichas temperaturas (13,25,49).

Del género Streptococcus, la especie más importante productora de enfermedades contagiosas para el hombre corresponde al grupo A de Lancefield. Se conoce también como Streptococcus pyogenes, la cual produce el 95% de todas las infecciones estreptocócicas (13,21,25,48,49).

Después de un periodo de incubación de 18 a 24 horas, los estreptococos del grupo A crecen en agar sangre en tres

diferentes formas de colonias:

a) Colonias mucoides: las cuales son alargadas y brillantes, con la superficie en forma de cúpula. Los estreptococos que crecen de esta forma generalmente producen cápsulas de ácido hialurónico y proteína M.

b) Colonias mate: las colonias de este tipo presentan un aspecto opaco, son planas, con tendencia a producir una superficie rugosa, debido a que en la mayoría de los casos se desarrollan a partir de colonias mucoides que han perdido humedad. Es por ésta razón que también se les llama colonias post-mucoides; frecuentemente producen proteína M.

c) Colonias lustrosas: son lisas y brillantes en apariencia, tienen un diámetro menor a los otros dos tipos de colonias; la proteína M esta presente en raras ocasiones.

Debe hacerse notar que la relación entre la colonia y la producción de la proteína M solamente es aproximada y no debe considerarse una característica definitiva, pues existe una notable variación en estas dos propiedades entre las cepas de Streptococcus pyogenes (2,48).

El aspecto de las colonias de los grupos B, C y G de Lancefield de estreptococos beta-hemolíticos - tanto los

superficiales como los que crecen en el interior de la gelosa sangre - no difieren mucho de las colonias del grupo A. Normalmente son opacas, y algunas cepas de un blanco brillante, con cierto parecido a las colonias de estafilococos cuando crecen en agar sangre. Algunas cepas del grupo B de estreptococos forman colonias de color rojo ladrillo mate, cuando son incubadas anaeróticamente (21).

Las colonias de estreptococos beta-hemolíticos en agar sangre de borrego se rodean por una zona bien definida de beta-hemólisis, de 2 a 4 veces el diámetro de la colonia; no obstante, hay un amplio margen de variación. El aspecto de las colonias depende directamente del tipo de gelosa sangre y no todas las características descritas aparecen en un solo tipo de medio. Las colonias que crecen dentro del agar (por la técnica de agar fundido y vertido) son variables en cuanto a su forma. Algunas son un poco lanceoladas, otras ovaladas o redondas (21).

La hemólisis y la morfología colonial de los estreptococos son las características principales para identificarlos en agar sangre. (21)

La composición química de la pared celular de los estreptococos ha ocupado la atención de varios autores, y de

sus estudios se ha revelado que los componentes de mayor importancia en cuanto a la virulencia de los estreptococos y a su clasificación se localiza en la superficie de la célula de la bacteria. La figura 1 muestra la localización de los componentes principales (9,21,48).

La parte más externa de la superficie de la célula es la cápsula. En los estreptococos del grupo A, la cápsula se compone de ácido hialurónico, formado por N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. El ácido hialurónico no es antigénico, pero si antifagocítico. En el grupo B, la cápsula se compone de un polisacárido, el que representa una sustancia tipo-específica. Su especificidad química y serológica permite el reconocimiento de los tipos Ia, Ib, Ic, II y III (2,13,23,25, 48,49).

Hacia el interior de la célula, la pared celular sigue a la cápsula. Esta estructura se divide en tres capas en los estreptococos del grupo A de Lancefield (2,23,25,48).

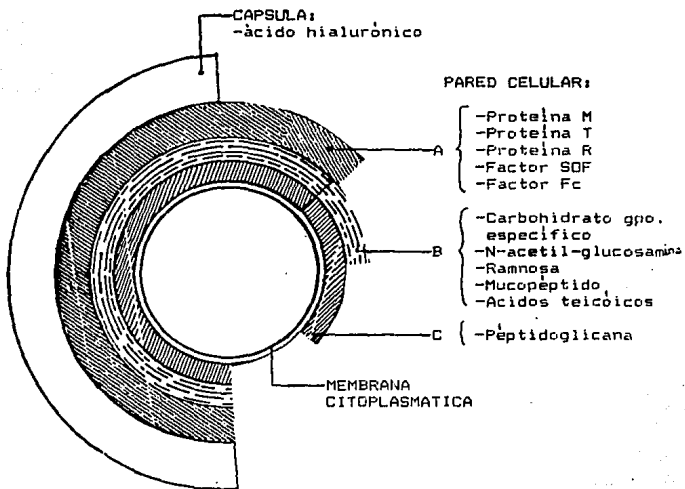
A) La capa más externa de la pared celular está formada por los siguientes compuestos:

- 1.- Acido lipoteicoico (ALT).
- 2.- Proteína M.
- 3.- Proteína T.

F I G U R A 1

DIAGRAMA DE DISTRIBUCION DE ESTRUCTURAS
SUPERFICIALES EN *Streptococcus pyogenes*

Tomado de Krause R. M. Bact. Rev. 27:369, 1963.



4.- Proteína R.

5.- Proteína M-asociada (MAP), también llamada proteína de tipo no específico.

6.- Factor de opacidad del suero (SOF)

7.- Factor de enlace Fc.

B) La capa media de la pared celular está compuesta por el carbohidrato C grupo-específico y los ácidos teicóicos.

C) La tercera capa que compone a la pared celular está formada por la péptidoglicana.

La superficie del estreptococo del grupo A está cubierta por proyecciones vellosas, designadas como fimbrias, que penetran por abajo de la estructura de la pared celular. Las fimbrias tienen dos determinantes. Una de ellas es el ácido lipoteicóico (ALT), que permite al microorganismo adherirse a las células epiteliales de la mucosa oral humana, mediante la mitad de los ácidos grasos de su molécula. Existen además receptores de ALT en la superficie de los leucocitos polimorfonucleares humanos. Estos juegan un papel importante en el reconocimiento del grupo A de estreptococos y en la capacidad de enlace en el proceso de fagocitosis (2,23,25,32,48).

La segunda determinante de las fimbrias es la proteína M.

Es un factor de virulencia, responsable de la resistencia a la fagocitosis; es la sustancia tipo-específica de los estreptococos del grupo A de Lancefield. Estimula la producción de anticuerpos opsonizantes, y se destruye por la tripsinización. Se ha observado que la proteína M contiene dos porciones: una con actividad precipitinógena y la otra con actividad antifagocítica. La primera está compuesta por moléculas pequeñas, tipo específicas, mientras que la segunda consiste en una reunión de moléculas con un peso molecular de 30 mil daltons aproximadamente. Las dos porciones son biológicamente distintas y pueden ser separadas (2,23,25,48).

Algunas cepas de estreptococos del grupo A contienen más de una proteína M. Los diferentes tipos de proteína M se pueden demostrar mediante varias pruebas, como las de precipitación, aglutinación, hemaglutinación, actividad bactericida, seroprotección al ratón y fijación de complemento (2,25).

La importancia de la proteína M justifica la conducta actual de investigar la prevalencia de tipos M particulares en varias partes del mundo, y de preparar este antígeno en una forma segura y altamente purificada, como proyecto de elaborar una vacuna polivalente de proteína M para el uso humano en el futuro (48).

La proteína T no es única, sino una designación que agrupa a diferentes proteínas resistentes a la digestión por enzimas proteolíticas. En cepas de estreptococos del grupo A de Lancefield, pueden existir proteínas T serológicamente distintas en combinación con uno o más tipos de proteína M. Más aún, tipos de M poseen más de un antígeno T como regla. Por ello, se utiliza como marcador secundario para cepas no tipificables por proteína M (2,16).

La proteína R se describe en los tipos 3 y 28, y participa en algunas reacciones de aglutinación. (2,48)

El factor de opacidad de suero (SOF) se encontró como una segunda sustancia tipo-específica en algunos estreptococos del grupo A, especialmente en aquellos que producen pobremente la proteína antigénica M o en los que el suero tipificador de M es difícil de preparar (2,48).

Tanto las proteínas T y R, así como el SOF, son sustancias de gran ayuda en la clasificación de estreptococos (2,48).

El factor Fc de enlace no ha sido investigado a fondo todavía, por lo que no se conoce bien su estructura y su función (2,48).

El carbohidrato C grupo-específico, principal componente de

la segunda capa de la pared celular, fué utilizado por Lancefield en 1928 para establecer la clasificación de los grupos serológicos, que se designan con letras mayúsculas de la A a la V. El polisacárido C ocupa el 10% del peso seco del microorganismo. Está constituido de ramnosa y hexosamina con enlaces alfa, (1,3), unido a un mucopéptido por puentes de alanina. La especificidad resulta de un residuo de N-acetil glucosamina en el grupo A y N-acetil galactosamina en el grupo C (2,33).

Las múltiples actividades biológicas de la péptidoglicana, demostradas in vitro e in vivo, indican que este componente - que en principio se consideró solamente como la estructura responsable de la rigidez de la pared celular, y que es el primordial componente de la tercera capa de la pared celular- también juega un papel importante en la génesis de las enfermedades estreptocócicas y, posiblemente, en las secuelas de éstas. Se ha considerado que la péptidoglicana se localiza en la parte interior de la pared celular, pero estudios realizados por Clearly y col. en 1977 indicaron que el sitio receptor para la unión del fago A25 es una porción de la péptidoglicana del estreptococo. Esta observación indica que la péptidoglicana puede localizarse en la superficie de la célula al menos en una parte, o quizá este expuesta durante el proceso de formación de la pared celular. En 1979, Ryc y col. demostraron con la técnica de la inmunoferritina que algunas

porciones antigénicas de la péptidoglicana se localizan en la parte filamentososa superficial de la pared celular. Como resultado de todos estos estudios, se puede deducir que la péptidoglicana forma una estructura de mosaico intercalado en la pared celular del estreptococo (2,16,21,23,49).

Virulencia y patogenicidad de los estreptococos:

La patogenicidad del género Streptococcus se debe a la gran cantidad de sustancias extracelulares que produce. Los compuestos tóxicos más importantes desde el punto de vista clínico se han identificado y analizado biológicamente (13, 21,25,48,49).

Entre las principales podemos mencionar a la toxina eritrogénica responsable de la erupción en pacientes con fiebre escarlata. Es citotóxica, aumenta la sensibilidad a las endotoxinas y exhibe gran actividad pirotóxica por liberación de pirógeno endógeno; es antigénica y produce anticuerpo neutralizable. Se asocia con el ácido hialurónico. Solamente la producen las cepas que se encuentran en estado lisogénico. Hasta ahora se han descrito tres tipos antigénicos: A, B y C (13,21,25,48).

En 1932, Todd describió dos tipos distintos de toxinas:

las hemolisinas O y S. Estas son responsables de la actividad hemolítica de los estreptococos. Las separó basándose en su poder antigénico y en su susceptibilidad a la inactivación por oxidación. Todd denominó estreptolisina O a la hemolisina con poder antigénico y sensible a la oxidación; y estreptolisina S a la no antigénica y resistente a la oxidación. La estreptolisina S es termolábil, no se produce en caldo de cultivo sin suero y se inhibe su formación en un medio rico en glucósidos fermentables (21,49).

Existen además, en los estreptococos del grupo A, toxinas que son enzimas y actúan sobre las células cuando despolimerizan al DNA. Estas enzimas son llamadas desoxirribonucleasas. Se conocen cuatro formas antigénicas diferentes, inmunológica y electroforéticamente: A, B, C y D. Estas enzimas no penetran a través de las membranas plasmáticas de las células vivas de mamíferos, por lo tanto, no son citotóxicas (13,48).

Dentro de las toxinas estreptocócicas también puede mencionarse a la hialuronidasa, que ataca al ácido hialurónico de la cápsula estreptocócica. Probablemente esto favorece a su inestabilidad. En 1933, Duran Reynolds lo denominó como factor de difusión a causa de sus notables efectos líticos sobre la sustancia fundamental del tejido conectivo. Se piensa que en la hialuronidasa es importante la tendencia característica

de los estreptococos de difundirse rápidamente en los tejidos de los mamíferos (13,48).

Otros productos estreptocócicos extracelulares - como la estreptoquinasa, difosforidin-dinucleotidasa y proteinasas - son antigénicas, pero su uso en la determinación por anticuerpos es ahora poco común (48).

Clasificación de los estreptococos:

La característica más importante para la identificación en medios de cultivo de los diferentes estreptococos es el tipo de actividad hemolítica que poseen sobre los eritrocitos del medio (13,21,34).

En 1903, Schott Muller propuso clasificar las diferentes variedades de estreptococos, según su capacidad de hemolizar los eritrocitos cuando se cultivan en caldo sangre. En 1919, Brown describió y definió la actividad hemolítica en agar sangre. Recientemente, Taranta y Moody han separado y descrito a los estreptococos típicos en las definiciones de Brown como sigue:

- Alfa (α): Zona vaga de destrucción parcial de los eritrocitos alrededor de la colonia; a menudo acompañadas por

un cambio de color del medio de rojo a verdoso o marrón.

- Beta (β): Zona clara, incolora alrededor de la colonia, en la que los eritrocitos están completamente decolorados.

- Gamma (γ): La colonia no produce decoloración, ni posee actividad hemolítica aparente.

- Alfa prima (α') o de gran zona: Forma un pequeño halo o envoltura alrededor de la colonia, debido a los eritrocitos intactos o solo parcialmente lisados, y una gran zona de hemólisis completa. Cuando se observa directamente este tipo de hemólisis, puede confundirse con la hemólisis (β).

Las definiciones de Brown se basan en la observación microscópica de las colonias interiores del agar sangre (técnica de agar fundido y vertido). Durante muchos años, estas definiciones se han aplicado para caracterizar colonias de placas sembradas en estria (21).

Los efectos que poseen los diferentes tipos de sangre sobre la expresión hemolítica, se han estudiado ampliamente: el tipo de hemólisis cambia radicalmente de α a (β o α'), dependiendo del tipo de sangre basal. El cambio en la hemólisis con sangre de diferentes procedencias, se manifiesta en el tamaño de la zona hemolítica y en la definición del borde de la mis-

ma. Las diferencias de la hemólisis α se escalonan desde ligeras variaciones en la intensidad del color verdoso por una parte, hasta la hemólisis α ' en la otra (21).

Es por esto que los investigadores han propuesto la utilización de sangre de oveja en los medios de agar sangre para la identificación confiable de estreptococos beta-hemolíticos. La mayor parte de las infecciones estreptocócicas humanas son debidas a los estreptococos beta-hemolíticos (21).

En 1928, Lancefield proporcionó la evidencia de que en los estreptococos beta-hemolíticos existía una heterogeneidad de cepas, incluyendo tipos y grupos patógenos. Diferenció a los estreptococos beta-hemolíticos en grupos inmunológicos diversos, en base a los antígenos grupo-específicos; fueron identificados como carbohidratos, clasificándolos con letras mayúsculas de la A a la V (32).

Las estreptococos pertenecientes a los grupos A, B, C, D, F y G son los más importantes desde el punto de vista clínico: son los que producen las infecciones humanas estreptocócicas más frecuentes (21,32,48,49).

El grupo A de Lancefield, que también es llamado Streptococcus pyogenes, es el principal causante de las enfermedades respiratorias superiores. Las infecciones produci-

das por el grupo A se han separado en dos grandes grupos:

1. Infecciones estreptocócicas supurativas: Están condicionadas a la capacidad invasora del microorganismo y a la resistencia a la fagocitosis de las cepas virulentas, producida por la presencia de la proteína M o ácido hialurónico capsular. Incluye la faringitis estreptocócica aguda - con o sin escarlatina -, y todas sus complicaciones supurativas, como la amigdalitis, adenitis cervical, otitis media, mastoiditis, abscesos peritonsilares, meningitis, pulmonía, peritonitis, neumonía, infecciones uterinas estreptocócicas del puerperio, rinitis, celulitis estreptocócica y la erisipela (13,21,48,49).

2.- Infecciones estreptocócicas no supurativas: Son aquellas enfermedades que se presentan como secuelas tardías de una infección estreptocócica. Las de mayor importancia son la fiebre reumática y la glomerulonefritis (13,21,48,49).

Los estreptococos pertenecientes al grupo B de Lancefield, Streptococcus agalactiae, se han presentado como la mayor causa de neumonía, meningitis y/o septicemia en niños recién nacidos. También después del parto en mujeres que presentan endocarditis, vaginitis y septicemia. Además se han aislado en pacientes con encefalitis, otitis media e infecciones del tracto urinario (21,48,49,51).

El grupo C de Lancefield incluye tres especies: Streptococcus equisilis, Streptococcus equi y Streptococcus zooepidemicus. Todas causan infecciones en humanos y en animales. De estas tres especies, la Streptococcus equisilis es más frecuente en infecciones de la piel y puerperales. Comúnmente se aíslan de heridas y del tracto respiratorio, y causan enfermedades diversas, como septicemia, endocarditis y amigdalitis (30,40,48,49,52).

Los estreptococos que poseen el antígeno del grupo D de Lancefield, comúnmente llamados enterococos y conocidos como Streptococcus faecalis y Streptococcus faecium, se han aislado de infecciones graves. Ejemplos de tales infecciones son la endocarditis subaguda (en el 20% de los casos), infecciones del tracto urinario (en el 10% de los casos), pacientes con septicemia, así como heridas profundas y abscesos (30).

El grupo F de estreptococos, Streptococcus anginosus, se ha reportado como el causante de algunas infecciones de heridas y meninges en humanos. Además es responsable de algunos casos de bacteremia después de una extracción dental. Se han aislado también de la faringe y tracto intestinal de individuos sanos. Se caracterizan por ser microaerofílicos (30,40).

Los estreptococos del grupo G de Lancefield no tienen un

nombre especial. La designación de Streptococcus canis es debida a su frecuente asociación con infecciones producidas en los perros. En humanos, las infecciones más frecuentes con las que se han asociado son puerperales, de heridas, de piel, del líquido cefalorraquídeo y, ocasionalmente, de septicemia y endocarditis aguda. Se han aislado del tracto gastrointestinal y respiratorio (30,40).

Los estreptococos llamados viridians se han estudiado en menor escala, pero pueden dividirse en dos grandes grupos: los alfa-hemolíticos y los gamma-hemolíticos. Estos estreptococos no poseen antígenos de Lancefield. Es por esto que su identificación requiere de la realización de pruebas bioquímicas y fisiológicas (30,40).

Dentro de los estreptococos alfa-hemolíticos, dos especies se han estudiado especialmente: Streptococcus sanguis y Streptococcus mitior. Cerca del 50% de las cepas de Streptococcus sanguis presentan el antígeno H. Esta especie se ha aislado de pacientes con endocarditis, septicemia e infecciones purulentas. Streptococcus mitior se ha aislado de pacientes con enfermedades sistémicas, tales como endocarditis y septicemia; algunas cepas de esta especie tienen el antígeno del grupo K, M u D (30,40).

Existen cuatro especies predominantes de estreptococos no

hemolíticos aislados de material clínico humano:

Streptococcus milleri, Streptococcus mutans,
Streptococcus salivarius y Streptococcus bovis. La mayor parte de la especie de Streptococcus milleri no posee un antígeno de grupo; se ha localizado en diversos abscesos de diferentes órganos, como en el sistema nervioso central, tórax y abdomen. Algunas cepas de la especie Streptococcus mutans contienen el antígeno del grupo E; se han asociado a infecciones de endocarditis y caries dental. Aproximadamente el 50 % de las cepas pertenecientes a la especie de Streptococcus salivarius poseen el antígeno del grupo K; se han considerado como no patógenos. La especie Streptococcus bovis se ha dividido en dos tipos: biotipo I y II; esta especie posee el antígeno del grupo D, y frecuentemente se le llama estreptococo del grupo D no enterocócica. El biotipo I se ha asociado con la endocarditis (30,40).

Importancia clínica de los estreptococos:

La información disponible indica que las infecciones estreptocócicas y sus secuelas son un problema de salud público mundial de considerable importancia.

Los estreptococos patógenos del hombre se han encontrado en

T A B L A I

Características bioquímicas de estreptococos beta-hemolíticos
patógenos del hombre

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D no enterococos	Grupo D enterococos	Grupo G
Crecimiento en bilis 40%	-	+	-	+	+	-
Crecimiento a 45° C.	-	-	-	+	+	-
Hidrólisis de la esculina	V	-	V	+	+	V
Producción de ácido a partir de sorbitol	-	-	-	+	V	-
Producción de ácido a partir de manitol	-	-	-	+	V	-
Crecimiento en telurito al 0.4%	-	V	-	+	-	-

V = algunas cepas son positivas y otras son negativas.

T A B L A I I

Identificación presuntiva de estreptococos de importancia clínica.

	Grupo A	Grupo B	Grupo D entero- cocos	Grupo D no ente- rococos	* ND A, B, D.	Viridians
Tipo de hemólisis	beta	beta	alfa, beta o gamma	alfa, beta o gamma	beta	alfa o gamma
Sensibilidad a la bacitracina	+	-	-	-	-	-
Producción del factor CAMP	-	+	-	-	-	-
Hidrólisis del hipurato de sodio	-	+	V	-	-	-
Hidrólisis de lá esculina	-	-	+	+	-	-
Crecimiento en caldo NaCl 6.5%	-	V	+	-	-	-
Sensibilidad al TMP-SXZ	-	-	-	V	+	+

V = algunas cepas son positivas y otras son negativas.

* = Estreptococos beta-hemolíticos no pertenecientes a los grupos A, B ni D.

. = ocasionalmente se observan excepciones.

todas las zonas climáticas del mundo. Los datos sobre la incidencia de infecciones estreptocócicas indican que éstas son unas de las enfermedades bacterianas más frecuentes en el hombre de climas fríos y secos, aunque también son comunes en áreas tropicales y subtropicales. Sheehen y Feldman observaron que la estación también influye en la frecuencia del aislamiento, siendo mayor ésta en invierno y primavera. En cuanto a la edad, la frecuencia de aislamiento varía con el tipo de estreptococo, pero en general se encuentran en mayor proporción en niños menores a los 10 años (30,48,49).

Diversos estudios han revelado considerables proporciones en cuanto a las infecciones estreptocócicas. En algunas áreas de climas templados, aproximadamente un 30% de la población puede ser portadora de estreptococos. Datos recientes de países tropicales y subtropicales indican que la proporción de portadores es de 25% aproximadamente. El porcentaje de portadores de estreptococos del grupo A se halla por debajo del 10%, sin embargo, inmediatamente antes de una epidemia, este porcentaje se eleva considerablemente. Los portadores nasales diseminan una cantidad de estreptococos muy superior a la de los portadores faríngeos (48).

Las estadísticas derivadas de varios estudios realizados en pacientes de hospitales, han demostrado que la incidencia de enfermedades agudas del tracto respiratorio provocadas por

estreptococos en zonas templadas, es de 5 a 15 casos por cada 100 individuos al año. En climas calientes, los estreptococos tienden a producir desórdenes respiratorios leves, con una frecuencia que aún no se ha estimado. Sin embargo, las infecciones de la piel debidas a estreptococos hemolíticos son muy comunes en éstas áreas; la frecuencia puede alcanzar un 20% o más en poblaciones de niños en determinada estación (48).

En 1974, Giono y col. hicieron un estudio en la población escolar del "Plan Zomeyucan", Estado de México; reportaron que de 1281 niños, 137 eran portadores de cepas de estreptococos del grupo A, correspondientes a un 10.7% de positividad global, con una frecuencia de fiebre reumática de 1.4% en la población estudiada de escolares portadores de Streptococcus pyogenes (25).

La incidencia de la fiebre reumática ha descendido en los países desarrollados de clima templado, pero al parecer se ha estabilizado en cifras inferiores. En áreas tropicales y subtropicales, en contraste, la fiebre reumática representa un problema de salud general tan importante como el que existía en países de zonas templadas hace una década. La incidencia de glomerulonefritis aguda refleja la difusión de estreptococos nefritogénicos en la población (48).

Otras enfermedades estreptocócicas de gran importancia

clínica son las provocadas por estreptococos del grupo B: la endocarditis, la septicemia en mujeres después del parto, y la meningitis en los recién nacidos. La mortalidad en los casos reportados de endocarditis es de 42%, mientras que en las infecciones neonatales, el 37% tienen un desenlace fatal (47,48;51).

Debido a que las infecciones estreptocócicas son más frecuentes en la infancia y adolescencia, es de gran interés desarrollar vacunas específicas efectivas contra la proteína M de los estreptococos, pero a pesar del grado de purificación de la proteína M, no ha sido posible remover el compuesto endotóxico que genera reactividad inaceptable (48).

Parece innecesario insistir en la importancia de un adecuado análisis clínico para la identificación de estreptococos. La disponibilidad de métodos en la identificación de enfermedades estreptocócicas, para un tratamiento eficiente y para la prevención de sus secuelas, justifica plenamente la atención concedida por las autoridades a los problemas derivados de las infecciones estreptocócicas. (48)

Metodología para la identificación serológica:

La identificación de estreptococos no puede ser completa si

no se determina el grupo al que pertenece. Actualmente, los métodos serológicos se clasifican en dos grupos:

1) Basándose en la extracción de antígenos. El mejor método para la identificación de estreptococos consiste en cultivar colonias puras y aisladas del organismo infectante, extraer el carbohidrato del grupo y demostrar una reacción serológica entre el antígeno extraído y el antisuero específico del grupo. Las técnicas serológicas que necesitan de la extracción de los antígenos del grupo son las siguientes:

a) Método de extracción con ácido caliente de Lancefield (33).

b) Método de extracción con formamida caliente de Fuller (21).

c) Método de extracción con autoclave de Rantz y Randall.

d) Método de extracción enzimática de Maxted.

e) Método de extracción enzimática por la Pronasa B(15).

La extracción por el método de Lancefield y por el método de Fuller son considerados los métodos de referencia.

Después de la extracción del antígeno del estreptococo por alguno de los métodos ya mencionados, se procede a realizar la técnica de identificación serológica. Existen tres técnicas comúnmente empleadas:

a) Precipitación en tubo capilar. Esta técnica fue descrita originalmente por la Dra. Lancefield. En ella se coloca al antígeno sobre el suero antipolisacárido; funciona satisfactoriamente para sueros hiperinmunes. Debido a que la mayor parte de los lotes de los sueros comerciales posee un título bajo, el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia (CDC) recomienda que el suero se coloque sobre el extracto. Esta técnica consiste en una reacción de precipitación que ocurre entre los antígenos polisacáridos presentes en el extracto de la pared celular y los anticuerpos solubles homólogos antipolisacárido. La reacción se lleva a cabo en tubos capilares y un resultado positivo es aquel que da un anillo o nube blanca en la zona de contacto de ambos líquidos (21,33,48).

b) Inmunodifusión doble. Cuando se introducen anticuerpos y antígenos en un gel de agar, estas sustancias difunden libremente una hacia la otra, formando bandas opacas muy visibles de precipitado en los puntos de contacto de sus frentes de difusión (40).

Esta técnica es más tardada que la de precipitación, pero es más exacta porque las líneas de precipitación pueden dar una identidad parcial o total cuando se comparan contra el antígeno control (40).

c) Contrainmunolectroforesis. En 1955, Grabar y Williams desarrollaron un método simple pero muy eficaz para la identificación de antígenos, combinando electroforesis con la precipitación en gel de agar. Esta técnica consiste en introducir la mezcla de los antígenos en un pequeño pozo practicado en el agar, aplicándole un campo eléctrico durante una o dos horas. El gradiente eléctrico se interrumpe cuando se separan las proteínas y entonces se introduce el antisuero en un canal cuyo eje es perpendicular al de la migración electroforética. Los anticuerpos y los antígenos marchan unos al encuentro de otros, y se forman bandas de precipitación en las interacciones de sus fuentes de difusión. Esta técnica tiene la ventaja de utilizar pequeñas cantidades de extracto y suero antiestreptocócico con bajo título de anticuerpos (8, 13,40).

Estos métodos serológicos son laboriosos y consumen mucho tiempo de trabajo rutinario en un laboratorio de análisis clínicos. Aproximadamente dos días después de que el espécimen se obtiene del paciente se pueden observar los resultados, teniendo en cuenta que la cepa debe estar pura para

extraer su antígeno e identificarlo (40).

II. Técnicas serológicas que utilizan células completas de estreptococos. No necesitan de la extracción de antígenos de la pared celular. Las células son utilizadas en la reacción serológica para su identificación. Tres son los métodos principalmente utilizados:

a) Técnica de inmunofluorescencia. Los anticuerpos específicos marcados fluorescentemente proveen de un método rápido para la identificación de sus antígenos homólogos. Esta técnica ha sido utilizada con éxito para la identificación de bacterias, rickettsias, hongos y otros agentes. Fueron Coons y Kaplan, en 1950, los que desarrollaron esta técnica al introducir un sistema de filtros ópticos y métodos para la preparación de isocianato fluorescente y para su conjugación con globulina. Las principales ventajas que presenta sobre las técnicas anteriormente descritas son: rapidez (la identificación de estreptococos se realiza en 4 o 5 horas después de obtenida la muestra del paciente), y la sensibilidad, pues detecta a un número pequeño de estreptococos en un cultivo mezclado (se emite una coloración amarilla verdosa fácilmente perceptible por el ojo humano, y de muy diferente color al que se observa naturalmente en tejidos). Esta técnica es conveniente y confiable para la identificación de

estreptococos del grupo A cuando se manejan grandes cantidades de cultivos de garganta. También hay disponibles reactivos de inmunofluoresceína para los estreptococos de los grupos B, C, D, F y G, pero no son muy recomendables en la rutina, debido a su bajo título de anticuerpos y a que presentan gran cantidad de reacciones cruzadas (17,21,40,41).

La confiabilidad de la prueba de inmunofluoresceína está basada en personal entrenado, equipo sumamente preciso, reactivos estandarizados y controles adecuados, por todo esto el índice económico se eleva fuertemente.

b) Técnica de coagulación. Se han reportado diversas investigaciones que describen el método de coagulación para clasificar estreptococos beta-hemolíticos. Esta técnica emplea un reactivo que contiene células de Staphylococcus aureus Cowan I muertas, recubiertas con anticuerpos específicos, preparados en conejo y contra los grupos estreptocócicos A, B, C y G. La fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas se une a las células de estafilococos, estabilizadas por un tratamiento de formaldehído y calor. Los anticuerpos específicos adsorbidos de esta manera, para estabilizar al estafilococo, se orientarán en su sitio de combinación antigénica (Fab) hacia afuera, quedando éste expuesto para que pueda efectuarse la reacción inmunológica. La proteína está unida por enlaces covalentes a la pared ce-

lular del estafilococo, presentando un peso molecular de 42 mil Daltons (9,29,42,55).

Los reactivos de coagulación para la identificación de estreptococos fueron diseñados en 1973 por Christensen y col (9).

Existen reactivos comerciales de coagulación para la identificación de los grupos estreptocócicos A, B, C y G. La identificación de estreptococos hemolíticos y no hemolíticos del grupo D se realiza utilizando una reacción enzimática con lisozoma previo a la coagulación (21,42).

Se ha considerado de gran importancia la utilización de cultivos puros para evitar posibles reacciones cruzadas, obteniéndose así una identificación errónea. Sin embargo, Kinkegard y Slifkin han desarrollado un nuevo procedimiento de coagulación que permite agrupar estreptococos beta-hemolíticos directamente de la muestra obtenida del paciente (21,42,52).

Aunque las reacciones de coagulación son de alto costo comparados con reactivos de otros métodos de clasificación de estreptococos, esta prueba es sencilla de realizar y provee los resultados en un tiempo relativamente corto (8,20,29).

Se han realizado diversos estudios comparativos empleando diferentes técnicas de agrupación serológica de estreptococos: Tessier obtuvo una correlación del 100 % del método de coagulación con el método de Fuller utilizado como referencia; Stoner comparó el método de coagulación con el método de precipitación de Lancefield, obteniendo una correlación de 100 %; Hahn y Nyber, y Arvilomii también demostraron una alta correlación entre el método de coagulación y el de precipitación en capilar, aunque el último investigador encontró que una gran proporción de cepas (de 5 a 60 %, dependiendo del grupo estreptocócico) necesitan una tripsinización antes de observar un resultado satisfactorio en el método de coagulación (1,29).

c) Aglutinación con partículas de látex. En esta prueba se efectúa un proceso de extracción enzimática simple. El antígeno estreptocócico es identificado utilizando partículas de látex de poliestireno que han sido cubiertas con anticuerpos del grupo específico. Estas partículas aglutinan intensamente en presencia de su antígeno homólogo y permanecen en suspensión en presencia del antígeno heterólogo (21,40).

Debido a que la preparación de los antígenos para la prueba de aglutinación con partículas de látex necesita que se preparen extractos, se eliminan muchas reacciones cruzadas. La extracción del antígeno puede efectuarse por el método de

autoclave modificado de Rantz y Randall, o con Pronasa B(31).

El equipo comercial de la prueba de aglutinación con partículas de látex incluye reactivos para la identificación de estreptococos de los grupos A, B, C, D, F y G. El equipo contiene un reactivo para identificar a estreptococos hemolíticos, así como los no hemolíticos del grupo D. Sin embargo, Facklam observó que no todos los estreptococos del grupo D son identificables por dicho reactivo (20,40,59).

Investigaciones comparativas entre la aglutinación con látex y el método de Fuller prueban que este método de aglutinación es extremadamente preciso en la identificación de estreptococos, incluyendo a los del grupo D (59).

En 1980, Facklam reportó una correlación del 100% entre la técnica de aglutinación con látex y los procedimientos convencionales si los extractos de los estreptococos beta-hemolíticos se realizan con cultivos de 16 horas en agar sangre o de caldos incubados durante 18 horas; esto es, 40 horas después de obtener las muestras del paciente (20).

Esta técnica es del mismo costo que la prueba de coagulación, y da resultados confiables, pero necesita de un crecimiento masivo del microorganismo (que se lleva 24 horas) y de una extracción, lo que provoca un retraso y complejidad

para obtener los resultados (20).

Identificación presuntiva:

Los estreptococos beta-hemolíticos de mayor importancia clínica no pueden identificarse solamente con pruebas bioquímicas y fisiológicas. Sin embargo, existen técnicas presuntivas disponibles. Estas pruebas presuntivas no pueden reemplazar a los métodos serológicos, pero son útiles al dar una identificación preliminar. Los métodos de identificación presuntiva de estreptococos comunmente practicados son:

- 1.- Determinación del tipo de hemólisis.
- 2.- Sensibilidad a la bacitracina.
- 3.- Sensibilidad al trimetoprim-sulfametoxazol.
- 4.- Producción del factor CAMP.
- 5.- Hidrólisis del hipurato de sodio.
- 6.- Hidrólisis de esculina en presencia de bilis al 40%.
- 7.- Crecimiento en caldo con NaCl al 6.5%.

Si estas pruebas se llevan a cabo debidamente, y con testigos adecuados, se puede identificar con precisión el 95% de los estreptococos patógenos aislados de material clínico, no obstante, las identificaciones son presuntivas, y esta circunstancia debe indicarse (21,40).

Importancia de la identificación presuntiva:

Para que una prueba de laboratorio sea práctica, debe ser confiable, rápida, sencilla de realizar y económicamente factible (8).

La identificación definitiva de estreptococos beta-hemolíticos se realiza por la demostración del carbohidrato antigéno grupo-específico que es extraído del microorganismo. sin embargo, el abastecimiento del antisuero es limitado, y el método requiere de una capacidad considerable y experiencia técnica de alto nivel. No es normal que un laboratorio clínico rutinario cuente con el tiempo y el personal técnico para la realización de la prueba de precipitación en todas las cepas de estreptococos aisladas. En estudios en grandes poblaciones durante infecciones estreptocócicas epidémicas, el número estreptococos puede ser elevado y su identificación serológica costosa y compleja (35,40,41).

Muchos laboratorios han adoptado estas pruebas presuntivas

como alternativa para la identificación preliminar de estreptococos beta-hemolíticos, ya que se obtienen resultados confiables (con una precisión del 95%, si se realizan correctamente), económicos y de una manera más sencilla que con los métodos serológicos (21).

Prueba de Bacitracina:

Una prueba presuntiva para la identificación de estreptococos del grupo A de Lancefield sencilla de realizar y ampliamente utilizada actualmente, se basa en el hecho de que la mayor parte de las cepas de estreptococos del grupo A son susceptibles a la bacitracina, mientras que los estreptococos de otros grupos son resistentes a ella.

En 1953, Maxted fué el primero en reportar éste método de diferenciación de estreptococos del grupo A de otros estreptococos beta-hemolíticos. La metodología que efectuó fué la siguiente: pequeños cuadros de papel filtro, impregnados con una solución de bacitracina (5 UI/ml) y secados rápidamente, fueron colocados sobre la siembra masiva de la cepa de estreptococo analizada en una placa que contenía agar sangre. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se examinó la placa para observar los halos de inhibición; consideró que cualquier halo de inhibición, independientemente de su diámetro, da un resultado positivo para la identificación de estrepto-

cocos del grupo A. Maxted reportó que éste método era capaz de identificar el 99.9% de las cepas de estreptococos del grupo A (37).

En 1955, Levinson y Frank utilizaron un medio diferente y discos de papel filtro de 6.4 mm de diámetro, y reportaron que para la realización óptima de la prueba los discos deben estar impregnados con una solución de bacitracina de 1 UI/ml (35).

Desde entonces, muchos investigadores han realizado la prueba con diversas variables: diferente cantidad de inóculo, medio de cultivo, concentración del disco de bacitracina, tipo de sangre y criterios en la interpretación de resultados.

La concentración de bacitracina en los discos de papel filtro difiere entre los productores comerciales, y se pueden encontrar discos desde 0.02 hasta 0.2 UI/disco. En 1969, Chitwood y col. obtuvieron resultados que indican que las diferencias en el contenido de bacitracina de los discos puede influir en la confiabilidad de la prueba de sensibilidad a la bacitracina (8).

En cuanto a la interpretación de resultados, muchos investigadores han utilizado la presencia o ausencia de la zona de

inhibición para demostrar la sensibilidad a la bacitracina, como lo hizo originalmente Maxted, pero muchos otros han considerado que la medición del diámetro es de gran importancia para la diferenciación de los estreptococos del grupo A (1,11,41,55).

Schaub y col. fueron los primeros en medir el diámetro de los halos de inhibición, y concluyeron que un halo de 15 a 20 mm de diámetro diferencia a los estreptococos del grupo A, pero no se dieron datos suficientes para apoyar esta conclusión. Muchos fabricantes de discos impregnados con bacitracina indican la medición de la zona de inhibición para diferenciar a los estreptococos del grupo A, los cuales no crecen alrededor del disco con un diámetro de 10 mm o más del halo de inhibición. Petran y col., así como Stoner y Wallestrom, utilizando discos impregnados con bacitracina de diferente concentración y midiendo el halo de inhibición, considerando que un halo de 10 mm o más significa que se trata de un estreptococo del grupo A, encontraron una buena correlación entre este método y los métodos serológicos. Sin embargo, Ederer incrementó su error en los resultados de la prueba en un 10% (falsos negativos) al exigir halos de 10mm o más para la identificación de estreptococos del grupo A. Por el contrario, Facklam, Hardy, Pollock y Estela, utilizando dichos discos, pero siguiendo la regla de Maxted, (considerando que cualquier zona de inhibición diferencia a los estreptococos

del grupo A), también encontraron una buena correlación con los métodos serológicos (15,17,18,19,30,41,44,50,55,60).

Los resultados obtenidos por Coleman y col. sugieren que la presencia o ausencia de una zona de inhibición con discos de 0.04 UI puede ser utilizada rutinariamente para la identificación presuntiva de estreptococos del grupo A, y un diámetro específico de la zona de inhibición puede ser usada para leer la prueba únicamente con discos de 0.1 UI, considerando un halo de 12 mm como indicativo de una cepa de Streptococcus pyogenes (11).

La variación en el inóculo también puede influir en los resultados. La mayoría de los investigadores colocan los discos de bacitracina sobre una siembra masiva, mientras otros, como Stoner y Ederer, toman con un asa de 4 a 5 colonias, las cuales las transfieren a la placa, y posteriormente las distribuyen homogéneamente sobre ésta con un hisopo humedecido; Facklam inocular las placas de agar con un asa cargada con cultivo en caldo. El tipo de siembra es de gran importancia, pues si el inóculo es muy denso, los discos de bacitracina no inhiben el crecimiento o provocan un halo muy pequeño, con lo que puede obtenerse un resultado falso negativo. (41)

Facklam aconseja que para llevar a cabo la prueba de

bacitracina correctamente es necesario tomar en consideración los puntos siguientes: (21)

a) Utilizar discos diferenciales, no de sensibilidad, ya que éstos últimos contienen una concentración excesiva de bacitracina para permitir la diferenciación segura del grupo A. Los discos de bacitracina diferenciales contienen 0.04 UI por disco.

b) Es aconsejable utilizar un inóculo fuerte de cultivo puro.

c) Debe determinarse previamente el tipo de hemólisis para que la prueba sea segura, ya que está diseñada ésta prueba para estreptococos beta-hemolíticos.

d) Se ha señalado que existen variaciones entre los lotes de discos comerciales, por ello cada nuevo lote debe probarse con cepas estreptocócicas del grupo A y de otros grupos.

Otros factores que varían de unos investigadores a otros son : el medio, el tipo de sangre y su preparación, la atmósfera de incubación, y el lapso de tiempo transcurrido desde que las placas son inoculadas y los discos de papel filtro

colocados en ellas hasta el momento de la incubación, así como la temperatura del cuarto en el que se realiza la colocación de los discos en las placas.

Prueba de CAMP:

Recientemente se ha renovado el interés en el grupo B de estreptococos debido al alarmante aumento en el número de infecciones humanas producidas por este microorganismo.

El método más confiable para su identificación es el serológico o bioquímico, pero son métodos costosos y consumen mucho tiempo; por lo tanto, cualquier prueba que detecte al *Streptococcus agalactiae* rápida y confiablemente es ampliamente usada para el análisis microbiológico.

En 1944, Christie y col. descubrieron un producto de naturaleza protéica, extracelular, difusible, de los estreptococos del grupo B, el cual lisa los eritrocitos de la sangre de borrego sensibilizados por una exposición previa a la beta-lisina de Staphylococcus aureus. Este producto, conocido ahora como el factor CAMP, únicamente lo poseen los estreptococos del grupo B, con lo que pueden ser diferenciados de los otros grupos estreptocócicos.

Se ha demostrado que la beta-lisina del estafilococo es una

esfingomielinasa, la cual ataca a los lípidos de la membrana de los eritrocitos, haciéndolos susceptibles a una lisis subsecuente debida a varios factores: físicos, químicos o agentes biológicos. Estos factores incluyen daños mecánicos, cambios de pH y temperatura, EDTA, así como el factor CAMP de los estreptococos beta-hemolíticos del grupo B de Lancefield (4,56).

Se sabe que el factor CAMP es una proteína termoestable, extracelular, con un peso molecular de 23 500 daltons, y con la habilidad de lisar a los eritrocitos de la sangre de borrego sensibilizados previamente con la beta-lisina estafilocócica (4).

No se conoce aún la función biológica del factor CAMP, aunque su actividad in vitro está bajo investigación actualmente. La producción in vitro del factor CAMP se ve afectada por diversas condiciones en el cultivo, incluyendo el contenido del medio, pH del medio inicial y final y la atmósfera de incubación (57).

La prueba de CAMP tradicional se efectúa sembrando con un asa sobre una placa de agar sangre una cepa de Staphylococcus aureus productora de beta-lisina, de forma que recorra el diámetro de la placa, y entonces el estreptococo que será analizado se inocula en ángulo recto, pero sin que

haga contacto con la estria del estafilococo sembrado. La placa inoculada se incuba en ambiente aerobio a 37° C durante 18 a 24 horas. La producción del factor CAMP se manifiesta por una zona clara y cristalina de hemólisis en forma de punta de flecha en el area del agar adyacente a la cepa de estafilococo (10).

Para la prueba de CAMP tradicional, se han practicado diversas modificaciones, todas ellas tratando de lograr una identificación más rápida o sencilla, entre las que se incluyen: prueba de CAMP con replicador de Steers, prueba de CAMP en tubo, CAMP en gota, y CAMP con discos de papel filtro.

La prueba de CAMP con el replicador de Steers es una prueba sencilla y práctica para la identificación presuntiva del estreptococo del grupo B, y se reporta un 99.7% de sensibilidad y un 100% de especificidad. Por medio de este método un gran número de estreptococos puede ser fácil y rápidamente identificados presuntivamente como miembros del grupo B. (24)

La identificación presuntiva de estreptococos del grupo B por medio de la prueba de CAMP en tubo se realiza al exponer eritrocitos de borrego, suspendidos en un medio líquido, a la beta-lisina de estafilococo, y, subsecuentemente, a sobrenadantes de cultivo en caldo de estreptococos. La prueba no tiene un alto costo en cuanto a materiales y requerimiento, y

haga contacto con la estria del estafilococo sembrado. La placa inoculada se incuba en ambiente aerobio a 37° C durante 18 a 24 horas. La producción del factor CAMP se manifiesta por una zona clara y cristalina de hemólisis en forma de punta de flecha en el area del agar adyacente a la cepa de estafilococo (10).

Para la prueba de CAMP tradicional, se han practicado diversas modificaciones, todas ellas tratando de lograr una identificación más rápida o sencilla, entre las que se incluyen: prueba de CAMP con replicador de Steers, prueba de CAMP en tubo, CAMP en gota, y CAMP con discos de papel filtro.

La prueba de CAMP con el replicador de Steers es una prueba sencilla y práctica para la identificación presuntiva del estreptococo del grupo B, y se reporta un 99.7% de sensibilidad y un 100% de especificidad. Por medio de este método un gran número de estreptococos puede ser fácil y rápidamente identificados presuntivamente como miembros del grupo B. (24)

La identificación presuntiva de estreptococos del grupo B por medio de la prueba de CAMP en tubo se realiza al exponer eritrocitos de borrego, suspendidos en un medio líquido, a la beta-lisina de estafilococo, y, subsecuentemente, a sobrenadantes de cultivo en caldo de estreptococos. La prueba no tiene un alto costo en cuanto a materiales y requerimiento, y

además elimina las reacciones intermedias que ocurren con muchos estreptococos que no pertenecen al grupo B. Se ha reportado un 96% de confiabilidad con este método (43).

La prueba de CAMP en gota consiste en aplicar una gota de filtrado de beta-lisina de estafilococo adyacente a una colonia sospechosa de pertenecer al grupo B de estreptococos. Esta es la prueba presuntiva más rápida, ya que la identificación puede realizarse a los pocos minutos en la placa de primoaislamiento. Es de bajo costo, sencilla y altamente específica y sensible (46,53).

La base de la prueba de CAMP en disco es el incorporar la beta-lisina del estafilococo en discos de papel filtro. Estos se colocan en placas de agar-sangre de borrego y junto a ellos, pero sin hacer contacto, se inocula formando una estria con un asa la cepa sospechosa a analizar. Una vez incubada, la prueba de CAMP se observa con la formación de un área clara en forma de luna que rodea al disco. Se ha encontrado una especificidad y sensibilidad del 100%. Los discos impregnados con beta-lisina se han almacenado durante 3 años sin tener pérdida de actividad alguna, lo que da una gran ventaja de tiempo y economía (61).

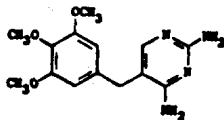
Desde que Christie y col. observaron por primera vez el fenómeno lítico conocido como prueba de CAMP, ésta ha sido

utilizada por algunos laboratorios de análisis clínicos como un examen sencillo y económico para la identificación presuntiva de los estreptococos del grupo B. Estudios previos han demostrado que un 98% de cepas de *Streptococcus agalactiae* producen el factor CAMP, por lo que esta prueba es de gran confiabilidad para la identificación de los mismos.

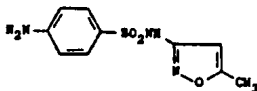
Prueba de Trimetoprim-sulfametoxazol:

Aunque la combinación de antibióticos en discos no ha sido aprobada en reportes de la Organización Mundial de la Salud, la mezcla de éstos dos componentes es una excepción, ya que se ha comprobado que juntos tienen un efecto sinérgico con propiedades farmacéuticas, y que actúan como un solo antimicrobiano. Este efecto se logra de una mejor manera al mezclar 1.25 microgramos de trimetoprim con 23.75 microgramos de sulfametoxazol (19,28).

El trimetoprim, 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxifenil-metil)-pirimidina, es un agente antimicrobiano, sintético, de amplio espectro, y que actúa como inhibidor específico de la deshidrofolato reductasa de las bacterias. Se encuentra como polvo fino cristalino, de color blanco cremoso, su peso molecular es de 290.32 g, y su fórmula es: (31,32)



El sulfametoxazol, 5-metil-3-sulfanil amidoisoxazol, también llamado gentanol, se encuentra en forma de cristales, su peso molecular es de 253.31 g, es un antibacteriano de fórmula:



Su LD 50 oral en ratones es de 3665 mg/kg.

La combinación de éstos dos compuestos ha sido probada para la identificación de estreptococos, en cuanto a la resistencia o susceptibilidad de éstos frente a los antibacterianos.

Se ha visto que los estreptococos del grupo A, B y D son resistentes a la mezcla de estos dos antimicrobianos, mientras que la mayoría de los estreptococos de los grupos C, F y G son susceptibles a la misma, aunque la reacción que tienen los microorganismos frente al trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SX2) puede variar ampliamente (19).

La metodología utilizada para probar la resistencia o susceptibilidad de los estreptococos hacia los discos impregnados con TMP-SXZ es la misma que se describe para los discos impregnados con bacitracina, y, al igual que esta prueba, la interpretación de resultados varía de un investigador al otro, basándose principalmente en el diámetro del halo de inhibición o en la presencia o ausencia de éste (19,28).

MATERIAL Y EQUIPO
DE LABORATORIO

- Cajas de Petri de vidrio de 20 X 100 mm.
- Tubos de ensaye.
- Matraces Erlenmeyer de 2000, 1000, 500, 100 ml.
- Pipetas graduadas de 10, 1, 0.2 ml.
- Probetas de 1000, 100 ml.
- Matraz aforado de 100 ml.
- Mechero de Bunsen.
- Asa.
- Hisopos.
- Autoclave.
- Incubadora.
- Refrigerador.
- Congelador 0° C.
- Horno.
- Piseta.
- Discos de papel filtro Schleicher & Schuell 740-E de 6mm de diámetro.
- Pinzas.
- Portaobjetos.
- Microscopio.
- Cuenta colonias Quebec.

- Potenciómetro.
- Centrifuga.
- Baño de agua.
- Membrana Millipore de 0.22 micras de diámetro de poro, 47 mm de diámetro.

MEDIOS DE CULTIVO

- Base de agar sangre Merck.
- Agar Mueller-Hinton Merck.
- Caldo Casoy Merck.
- Agar Casoy Merck.
- Caldo Cisteina-extracto de levadura (CCY)

REACTIVOS

- Cristal violeta.
- Lugol.
- Safranina.
- Etanol.
- Acetona.
- Peróxido de hidrógeno.
- Solución de BaCl_2 1%.
- H_2SO_4 1%.
- Bacitracina Sigma lote 97-F-0747.
- Estándar de referencia de bacitracina (sal de zinc)
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M.
- MgCl_2 0.001 M.
- Unidiscos Bigaux Diagnóstica impregnados con trimetoprim-sulfametoxazol.

C E P A S B A C T E R I A N A S

- Staphylococcus aureus ATCC 25923.
- 80 cepas de estreptococos beta-hemolíticos provenientes de diferentes muestras clínicas: exudados faríngeos (32 cepas), exudados vaginales (36 cepas), muestras urinarias (11 cepas), lesiones (1 cepa). Estas cepas fueron donadas por el departamento de bacteriología de los Laboratorios Médicos del Chopo, y el Instituto Nacional de Perinatología.

M E T O D O S

I. Determinación de potencia de bacitracina:

La primera parte del trabajo experimental consistió en la valoración de la potencia de la bacitracina que se utilizaría, debido a que se contaba con una muestra de un lote del antibiótico que se sospechaba había disminuido su actividad antimicrobiana. Para ello, se efectuó una valoración microbiológica, utilizándose una cepa de colección de Staphylococcus aureus (ATCC 25923).

Este método de valoración se basa en la difusión del antibiótico desde discos de papel filtro impregnados con la bacitracina, sobre una capa de agar solidificado que contiene el germen de prueba, depositada en una caja de Petri. La zona de inhibición prevista del microorganismo es un área circular que queda enteramente alrededor del disco que tiene la solución del antibiótico.

I.1. Preparación de las placas de inoculado:

Se tomaron de 6 a 8 colonias del Staphylococcus aureus ATCC 25923 de la placa de cultivo, con un asa estéril, y se intro-

dujeron en un tubo de ensayo que contenía 5 ml de caldo de soya tripticasa. Este tubo se incubó por un periodo de tres horas a una temperatura de 37° C, para así obtener una suspensión bacteriológica de turbidez moderada. Esta suspensión se utilizó para ajustar 5 ml de agar Müeller-Hinton fundido y enfriado a 45° C, para obtener una turbidez de éste equivalente visulamente al estándar 0.5 de McFarland. Este estándar se preparó con la adición de 0.5 ml de solución de BaCl₂ al 1% a 99.5 ml de H₂SO₄ al 1% (0.36 N); esta solución estándar turbidimétrica se preparó en un tubo de ensayo de idénticas dimensiones a los que serían utilizados para la muestra de agar fundido en el que estaría el inóculo.

Se prepararon cajas de Petri con agar Mueller Hinton (con 5 mm de profundidad), y se secaron aproximadamente 30 minutos antes de la inoculación. Una vez solidificada ésta capa de agar, se le agregaron 4 ml del agar fundido que había sido inoculado, extendiéndolo uniformemente sobre toda la superficie. Cuando la capa de agar inoculado se solidificó, se colocaron en cada placa, y de manera que quedaron separados entre sí, 6 discos de papel filtro, cada uno impregnado con una concentración conocida de bacitracina. Entonces, las placas se incubaron a 37°C por 18 horas. Después de este periodo, las zonas de inhibición alrededor de los discos se midieron y reportaron en mm.

1.2. Preparación de la solución concentrada tipo y, a partir de la misma, preparación de las soluciones diluidas tipo de diferente concentración:

Se utilizó como patrón de referencia una sal de zinc de bacitracina de 58.5 U/mg de potencia, la cual fué desecada en pesafiltro de vidrio tarada a 60°C bajo presión reducida de 5 mm de Hg durante 3 horas en un horno al vacío. De ésta, se pesaron 64.1 mg y se disolvieron en 5 ml de HCl 0.1N, para obtener una solución concentrada de 7 500 U/ml. A partir de ésta se prepararon cuatro diluciones diferentes, de manera que impregnando 0.20 ml de cada una, tomando en cuenta la solución concentrada inicial, en los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro estériles, se tuvieran 5 tipos de discos con diferentes concentraciones, y que fueron: 1.3, 2.4, 4.4, 8.1 y 15 U/disco. La solución diluida tipo óptima para la comparación de la valoración es aquella cuya concentración corresponde a la dilución media entre las soluciones diluidas tipo: 4.4 U/disco.

1.3 Procedimiento para la valoración:

En la elaboración de la curva tipo, se usó un total de 12 placas, tres para cada solución diluida tipo, excepto para la solución diluida tipo óptima (cuya concentración corresponde

a 4.4 U/disco), con la cual se impregnaron tres discos de papel filtro para cada placa. En cada serie de tres placas, se colocaron los discos de papel filtro alternando la solución diluida tipo óptima y los otros tres discos con una de las otras soluciones diluidas tipo. De esta manera, en las doce placas se tuvieron 36 zonas de inhibición para la solución diluida tipo óptima y 9 zonas de inhibición para cada una de las otras cuatro soluciones tipo.

De la bacitracina a valorar se consideró la potencia marcada en la etiqueta: 71 U/mg. Para ello se pesaron 15.1 mg y se llevaron a un volumen de 5 ml. Con esta solución se impregnaron discos de papel filtro estériles, de manera que se obtuvieron así discos impregnados con la muestra problema. Para la muestra problema a analizar se utilizaron tres placas. En cada una se colocaron seis discos de papel filtro, alternándose así: tres con la solución diluida tipo óptima y tres discos impregnados con la solución de la muestra problema. De esta manera se obtuvieron 9 zonas de inhibición, tanto para la solución diluida tipo óptima como para la solución de la muestra que se ensayó.

Después de que todas las placas fueron incubadas (las 15 en total), se midieron los diámetros de la zona de inhibición, por medio de una regla con divisiones en milímetros.

1.4. Estimación de la potencia:

Para preparar la curva tipo se promediaron, en cada una de las cuatro series formadas por tres placas, los nueve diámetros de las zonas de inhibición correspondientes a la solución diluida tipo óptima, y los nueve diámetros de las zonas de inhibición de cada una de las soluciones diluidas tipo de cada serie; también se promediaron los 36 diámetros de las zonas de inhibición diluida tipo óptima, correspondientes a las cuatro series, y el promedio obtenido es la base para la corrección.

Esta corrección se realiza con la diferencia de los promedios de los 36 diámetros de las zonas de inhibición de la solución diluida tipo óptima y de los 9 diámetros de las zonas de inhibición correspondientes a la solución diluida tipo óptima, de la serie respectiva de 3 placas. Este valor de la diferencia se suma (si es que el promedio de los 9 diámetros de las zonas de inhibición correspondientes a la solución diluida tipo óptima es menor al promedio de los 36 diámetros de las zonas de inhibición de la solución diluida tipo óptima) o se resta (si el promedio de los 9 diámetros de las zonas de inhibición de la solución diluida tipo óptima es mayor a el promedio de los 36 diámetros de las zonas de inhibición de la solución diluida tipo óptima) al promedio de

los 9 diámetros de las zonas de inhibición de cada una de las soluciones diluidas tipo de cada serie..

Con los diámetros corregidos de las zonas de inhibición de las soluciones diluidas tipo, incluyendo el promedio de los 36 diámetros correspondientes a las zonas de inhibición de la solución diluida tipo óptima, y las concentraciones de bacitracina de cada solución diluida tipo, en mg/ml, se trazó una curva tipo, anotando en las abscisas la concentración de bacitracina (en logaritmo de mg/ml), y en las ordenadas el diámetro de inhibición (en mm).

La curva tipo se traza uniendo los puntos correspondientes a las zonas de inhibición de diámetro más alto y más bajo obtenidas por medio de las siguientes ecuaciones:

$$B = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

$$A = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

donde:

B = diámetro promedio calculado en milímetros para la zona de inhibición de la solución tipo diluida de más baja concentración.

A = diámetro promedio calculado en milímetros para la zona de inhibición de la solución diluida tipo de más alta concentración.

c = diámetro promedio en milímetros de las zonas de inhibición de las 36 lecturas de la solución diluida tipo óptima, en las cuatro series.

a, b, d, e = diámetros promedio corregidos en milímetros de las zonas de inhibición de las otras cuatro soluciones diluidas tipo.

Para determinar la potencia de la bacitracina problema se promediaron los diámetros de las 9 zonas de inhibición en las 3 placas utilizadas, tanto de la solución diluida tipo óptima como de la solución de la muestra problema. En la curva tipo trazada se interpolan las concentraciones correspondientes a estos diámetros de zona de inhibición corregidos.

Para obtener el contenido del antibiótico en la muestra, la concentración encontrada se multiplicó por el factor de dilución apropiado.

II. Impregnación de discos de bacitracina:

Una vez obtenida la potencia de la bacitracina problema, con ella se impregnaron los discos de papel filtro que serían utilizados para efectuar el trabajo experimental.

De la bacitracina se hicieron tres diluciones diferentes, de manera que, impregnando cada disco con 0.02 ml, se tuviesen discos con 0.02, 0.04 y 0.10 U de bacitracina.

Los discos estériles impregnados con la bacitracina se secaron y almacenaron en frascos color ámbar. Para su conservación, se guardaron en congelación hasta el momento de su uso; en tal caso, se dejaron los frascos que contenían cada una de las diferentes concentraciones de bacitracina alrededor de 30 minutos a temperatura ambiente para permitir el equilibrio de la temperatura antes de su uso.

III. Impregnación de discos con beta-lisina:

Para efectuar la prueba de CAMP en disco, fué necesaria la

obtención y extracción de la beta-lisina a partir de estafilococos que la produzcan. Para ello, se practicó el siguiente procedimiento:

Se sembró en un tubo inclinado de agar Casoy el Staphylococcus aureus ATCC 25923, y se incubó a 37° por 18 horas. El crecimiento fué suspendido en 3.5 ml de suero fisiológico. Un mililitro de ésta suspensión bacteriana se agregó a una botella que contenía 250 ml de caldo cisteína-extracto de levadura (CCY), y se le ajustó el pH a 7.6. Después de una incubación a 37° por 18 horas, se centrifugó, y el líquido sobrenadante se pasó a través de una membrana Millipore de 0.22 mm. Esta beta-lisina fué impregnada en los discos de papel filtro estériles (0.02 ml por disco), se colocaron éstos en frascos de color ámbar y se liofilizaron. Se almacenaron en congelación hasta el momento de su uso. Alrededor de 30 minutos antes de usarse, los frascos con los discos se dejaron a temperatura ambiente.

IV. Discos de Trimetoprim-sulfametoxazol:

Se contó con un stock de discos impregnados con trimetoprim (1.25 mg)-sulfametoxazol (23.75 mg), fabricados por Bigaux Diagnóstica. Se mantuvieron en congelación hasta aproximadamente 30 minutos antes de su uso, durante los cuales se dejó

que se equilibrara a temperatura ambiente.

V. Cepas de estreptococos:

Las cepas de estreptococos analizadas fueron primeramente identificadas con la técnica de coaglutinación con reactivos de Pharmacia Diagnostics, para determinar a que grupo de Lancefield pertenecían.

Las cepas se sembraron y aislaron en placas de gelosa sangre de borrego al 5%. Por cada placa se conservaron cinco cepas. Después de 18 horas de incubación a 37°, se comprobó que las colonias fueran beta-hemolíticas, se les efectuó la prueba de catalasa y se les hizo tinción de Gram, para así verificar su identidad.

VI. Inóculos probados:

Para la identificación presuntiva de los estreptococos con los antimicrobianos, se probaron 3 concentraciones diferentes del inóculo en las placas que contenían 20 ml de gelosa sangre de borrego al 5%:

1) Se sembró con un inóculo grueso tomando con una asa aproximadamente 10 colonias de un cultivo de 18 horas de la cepa

a analizar, y se sembró masivamente en toda la superficie del medio con la misma asa, en dos direcciones diferentes, perpendicular una a la otra, para así asegurar el crecimiento homogéneo en toda la superficie de la placa.

2) La concentración media del inóculo se logró tomando de 3 a 5 colonias de un cultivo de 18 horas de la cepa a analizar, colocándolas a lo largo del diámetro de la placa, para posteriormente distribuir el inóculo homogéneamente con un hisopo estéril humedecido en caldo Casoy. La distribución del inóculo también se realizó en dos direcciones diferentes, una perpendicular a la otra. Finalmente se pasó el hisopo por la superficie del agar adyacente a las paredes de la caja.

3) La magnitud menor de inóculo se logró tomando de 8 a 10 colonias de un cultivo de 18 horas con el asa y se transfirió a un tubo con 5 ml de caldo Casoy. Después de una incubación de 18 horas a 37°, se utilizó esta suspensión bacteriana para ajustar 10 ml de caldo Casoy con el estándar turbidimétrico (0.5 de McFarland). Las placas se inocularon humedeciendo el hisopo con el caldo ajustado al estándar. El exceso del inóculo en el hisopo fue eliminado presionando y rotando el hisopo firmemente contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido. Con el hisopo entonces se sembró sobre la superficie del medio en dos direcciones, una perpendicular a

la otra, y, finalmente, se pasó sobre la superficie del agar que estaba junto a las paredes de la caja con el mismo hisopo.

Una vez efectuadas las tres operaciones para las 3 magnitudes de inóculo de cada una de las cepas, se dejó pasar un tiempo corto para permitir que el inóculo seque (aproximadamente 5 minutos), y se colocaron en cada placa los cuatro discos de papel filtro, -3 impregnados con bacitracina (cada uno de diferente concentración: 0.02, 0.04, 0.10 U/disco) y un disco de trimetoprim-sulfametoxazol. Se utilizaron pinzas estériles para tomar cada disco y colocarlo en su lugar. Cada disco se presionó suavemente con las pinzas contra el agar para asegurar un mayor contacto con el medio.

Las placas se incubaron a 37° por 18 horas. Después de la incubación se midió cada zona de inhibición (incluyendo el diámetro del disco) y se registró en mm.

IX. Prueba de CAMP:

Para la evaluación de la prueba de CAMP en disco se colocó un disco impregnado con la beta-lisina en una placa con 20 ml de gelosa sangre de borrego a 5%, y, aproximadamente, a 2 mm de éste se hizo una estria lo más delgada posible de la cepa

a analizar con el asa. En cada placa se colocaron 8 discos, y para cada disco se hicieron 2 estrias, cada una de una cepa diferente, pudiendo analizar así en una sola placa 16 cepas diferentes. Las placas se incubaron a 37° por un espacio de 18 horas, después del cual se hizo la observación de las mismas y el análisis de la prueba. Todas aquellas cepas que formaran una beta-hemólisis bien marcada adyacente al disco en forma de media luna se consideraron como cepas productoras de el factor CAMP, y por lo tanto pertenecientes al grupo B de Lancefield..

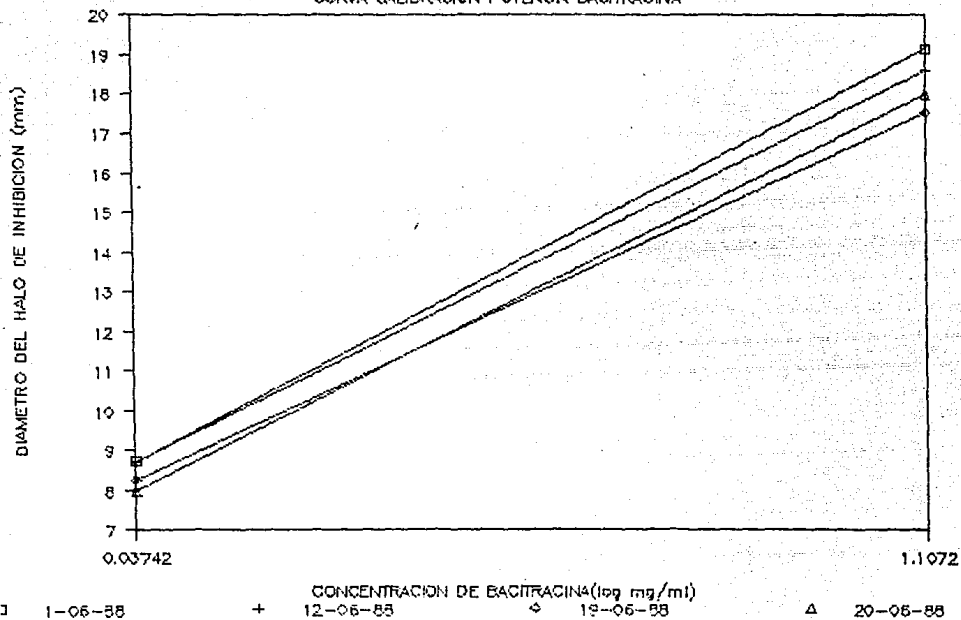
RESULTADOS

En la Gráfica I se muestra la curva de calibración para la valoración de la bacitracina Sigma lote 97F-0747. Se efectuaron 4 curvas de calibración con la bacitracina de referencia (sal de zinc), de potencia 58.5 U/mg, y para cada una de ellas se supuso una concentración diferente de la bacitracina de Sigma, para así obtener valores que pudieran ser interpolados en la curva correspondiente. El valor de la potencia encontrado de la bacitracina de Sigma fué de 30.79 U/mg, valor que corresponde al 42.85 % de la potencia teórica que reportaba. Con esta bacitracina se trabajó posteriormente para impregnar los discos de papel filtro y efectuar así la prueba de sensibilidad a la bacitracina de las cepas estreptocócicas.

La Tabla III muestra la proporción de las muestras clínicas de donde se obtuvieron las cepas a analizar, y el grupo al que pertenecían las mismas, observándose que los estreptococos del grupo A se aíslan principalmente de exudados faríngeos, mientras que los esteptococos pertenecientes al grupo B se encuentran principalmente en exudados vaginales.

Las 80 cepas de estreptococos beta-hemolíticos donadas por el departamento del Bacteriología de los Laboratorios del

GRAFICA I
CURVA CALIBRACION POTENCIA BACITRACINA



T A B L A I I I

PROPORCION DE LAS CEPAS
ANALIZADAS DE MUESTRAS CLINICAS

Muestra clínica	Estreptococos del grupo A	Estreptococos del grupo B	TOTAL
exudado faríngeo	29	3	32
exudado vaginal	5	31	36
urinario	2	9	11
lesión	0	1	1
TOTAL	36	44	80

Chopo y por el Instituto Nacional de Perinatología pertenecían a los grupo A y B de Lancefield y a cada una de ellas se les practicaron la prueba de bacitracina, la prueba de CAMP y la sensibilidad al Trimetoprim-sulfametoxazol.

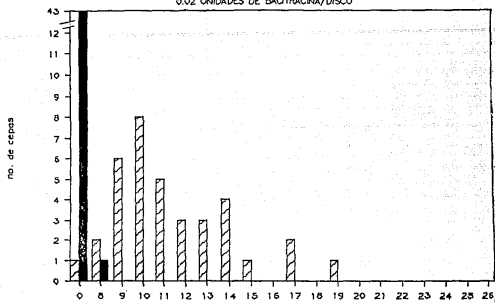
Las Gráficas II, III y IV muestran los resultados obtenidos al efectuar la prueba de sensibilidad a la bacitracina a las 80 cepas analizadas. En cada figura se aprecia el efecto de la magnitud del inóculo y de la concentración de bacitracina impregnada en los discos de papel filtro. En el caso de la Gráfica II, en la cual se observan los resultados obtenidos al sembrar el inóculo en forma masiva, se puede comparar la diferencia de los diámetros del halo de inhibición de acuerdo con la concentración de bacitracina en el disco. Los resultados obtenidos con 0.02 U de bacitracina por disco muestran una media de 11.22mm de diámetro, para todas las cepas de estreptococos del grupo A. Con los discos que contienen 0.04 U de bacitracina, la media del diámetro se incrementa a 13.94 mm. La media se aumenta aún más con los discos de 0.10 U, ya que éste se incrementa hasta 15.75 mm.

En la Gráfica III se muestran los resultados obtenidos con la siembra de inóculo moderado, logrado con el asa e hisopo húmedo. En ella se pueden comparar los resultados obtenidos con este tipo de siembra y la variación de acuerdo a la

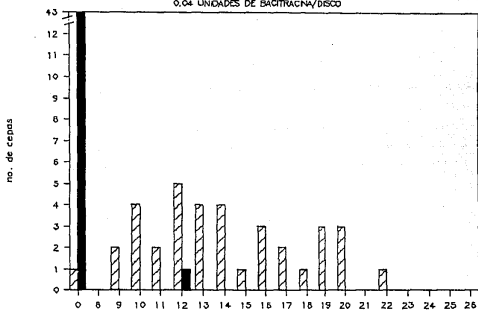
GRAFICA II

SIEMBRA MASIVA

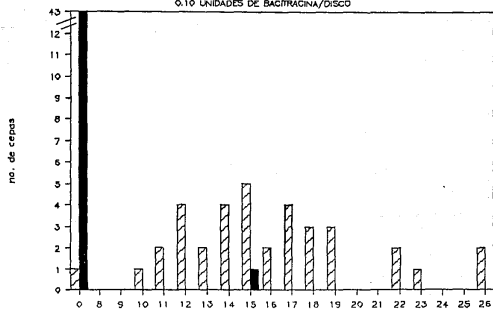
0.02 UNIDADES DE BAGITRACINA/DISCO



0.04 UNIDADES DE BAGITRACINA/DISCO



— diámetro halo de inhibición (mm)
0.10 UNIDADES DE BAGITRACINA/DISCO



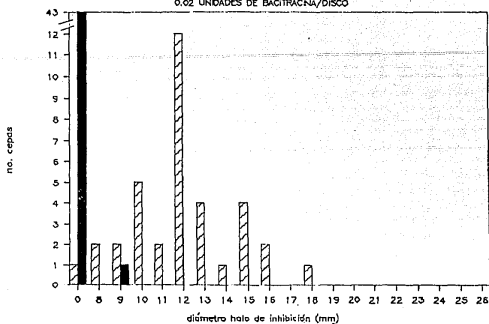
▨ estreptococos gpoA

diámetro halo de inhibición (mm)

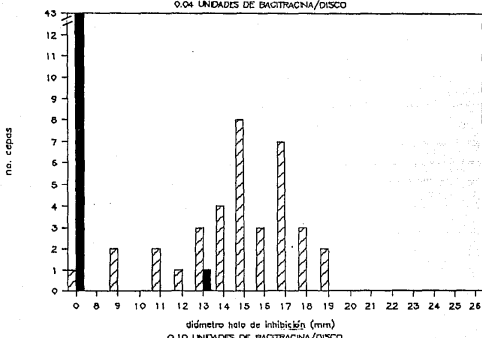
■ estreptococos gpoB

GRAFICA III SIEMBRA CON ASA E HISOPO

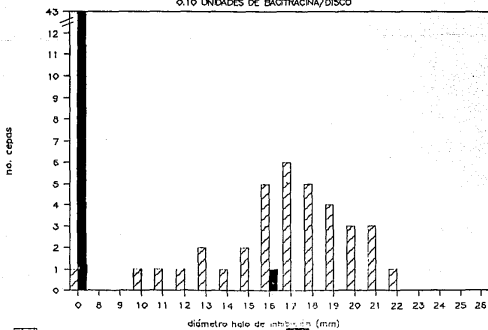
0.02 UNIDADES DE BAGITRACINA/DISCO



0.04 UNIDADES DE BAGITRACINA/DISCO



0.10 UNIDADES DE BAGITRACINA/DISCO

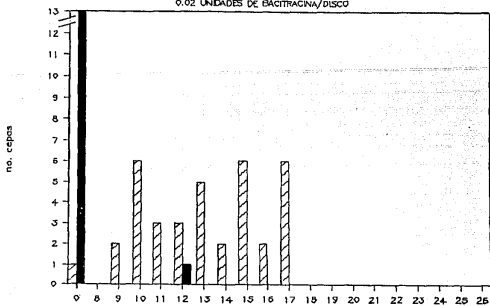


▨ estreptococos gpoA

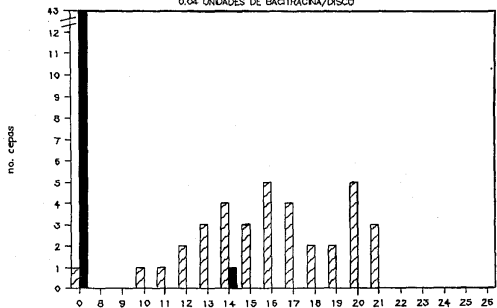
▩ estreptococos gpoB

GRAFICA IV
SIEMBRA AJUSTADA AL 0.5 DE MCFARLAND

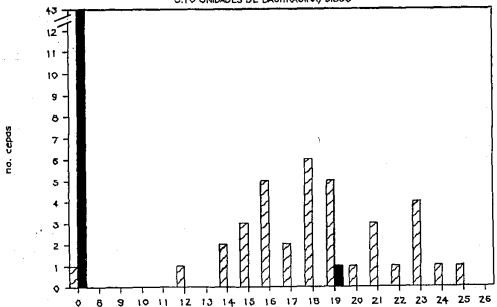
0.02 UNIDADES DE BACITRACINA/DISCO



0.04 UNIDADES DE BACITRACINA/DISCO



0.10 UNIDADES DE BACITRACINA/DISCO



estreptococos gpo.A

estreptococos gpo.B

concentración de bacitracina en el disco. En el caso de 0.02 unidades de bacitracina por disco, la media obtenida de los diámetros del halo de inhibición de las cepas pertenecientes al grupo A fué de 11.83 mm. Los discos que contenían 0.04 unidades de bacitracina provocaron un diámetro de inhibición promedio en las mismas cepas de 14.61 mm. La concentración de 0.10 unidades de bacitracina por disco dieron como resultado en la media de los diámetros de inhibición 16.55 mm.

En la Gráfica IV se muestran los diámetros obtenidos en los halos de inhibición de las cepas al ser sembradas ajustando- las al 0.5 de McFarland. En el caso de los diámetros del halo de inhibición obtenidos al usar discos con 0.02 unidades de bacitracina, la media fué de 12.88 mm. Los discos que contenían 0.04 U de bacitracina por disco provocaron un promedio de 15.83 mm en el diámetro del halo de inhibición de las cepas del grupo A. La media del diámetro de la zona de inhibición aumentó con el uso de los discos de 0.10 U de bacitracina hasta 18 mm.

Las tabla IV muestra las interpretaciones de la prueba de la bacitracina de acuerdo a la presencia o ausencia del halo de inhibición o la medida del diámetro mismo.

En la tabla V se muestran los resultados obtenidos con la prueba de CAMP en disco.

T A B L A I. V

Resultados de la prueba de bacitracina para la identificación de estreptococos beta-hemolíticos

TIPO DE SIEMBRA	CONCENTRACION DE BACITRACINA UNIDADES/DISCO	CONSIDERANDO ÚNICAMENTE EL HALO DE INHIBICION				CONSIDERANDO COMO ZONA DE INHIBICION 10 mm DIAMETRO				CONSIDERANDO COMO ZONA DE INHIBICION 12 mm DIAMETRO			
		GRUPO A		GRUPO B		GRUPO A		GRUPO B		GRUPO A		GRUPO B	
		ZONA	IND ZONA	ZONA	IND ZONA	ZONA	IND ZONA	ZONA	IND ZONA	ZONA	IND ZONA	ZONA	IND ZONA
SIEMBRA PASIVA	0.02 U/DISCO	36 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	27 (75)	9 (2.5)	0 (0)	44 (100)	14 (38.89)	22 (61.11)	0 (0)	44 (100)
	0.04 U/DISCO	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	33 (91.66)	3 (8.33)	1 (2.27)	43 (97.72)	27 (75)	9 (25)	1 (2.27)	43 (97.72)
	0.10 U/DISCO	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	33 (91.66)	3 (8.33)	1 (2.27)	43 (97.72)
SIEMBRA CON ASA E HISOPO	0.02 U/DISCO	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	31 (86.11)	5 (13.89)	0 (0)	44 (100)	24 (66.66)	12 (33.33)	0 (0)	44 (100)
	0.04 U/DISCO	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	33 (91.66)	3 (8.33)	1 (2.27)	43 (97.72)	31 (86.11)	5 (13.89)	1 (2.27)	43 (97.72)
	0.10 U/DISCO	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	33 (91.66)	3 (8.33)	1 (2.27)	43 (97.72)
SIEMBRA AJUSTADA AL 0.5 McFARLAND	0.02 U/DISCO	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	33 (91.66)	3 (8.33)	1 (2.27)	43 (97.72)	24 (66.66)	12 (33.33)	1 (2.27)	43 (97.72)
	0.04 U/DISCO	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	33 (91.66)	3 (8.33)	1 (2.27)	43 (97.72)
	0.10 U/DISCO	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)	35 (97.22)	1 (2.77)	1 (2.27)	43 (97.72)

NUMERO DE CEPAS
(PORCENTAJE DE POSITIVIDAD)

ZONA = CON HALO DE INHIBICION

IND ZONA = SIN HALO DE INHIBICION

La Gráfica V muestra los resultados obtenidos con los discos de papel filtro impregnados con trimetoprim-sulfametoxazol con las cepas de estreptococos analizadas. El promedio en el diámetro de la zona de inhibición al sembrar en forma masiva fué de 7.91 mm para estreptococos del grupo A y 3.47 mm para estreptococos del grupo B. En el caso de la siembra de inóculo moderado (asa e hisopo), la media del diámetro de las cepas del grupo A fué de 8.61mm, mientras que la del grupo B fué de 3.22 mm. En la siembra ajustada al 0.5 de McFarland, las cepas pertenecientes al grupo A tuvieron una media del diámetro del halo de inhibición de 9.0 mm, y las del grupo B fué de 4.0 mm.

En la Tabla VI se muestran los resultados obtenidos con los discos impregnados con trimetoprim-sulfametoxazol, con las cepas de estreptococos analizadas, variando la magnitud del inóculo y el criterio de análisis: tomando en cuenta unicamente el halo de inhibición, o considerando un halo de 10 y 12 mm de diámetro.

T A B L A V

Resultados de la Prueba de CAMP

	Estreptococos del grupo A	Estreptococos del grupo B	TOTAL
Prueba de CAMP positiva	3 (8.4%)	40 (90.0%)	43
Prueba de CAMP negativa	33 (91.6%)	4 (9.1%)	37
TOTAL	36	44	80

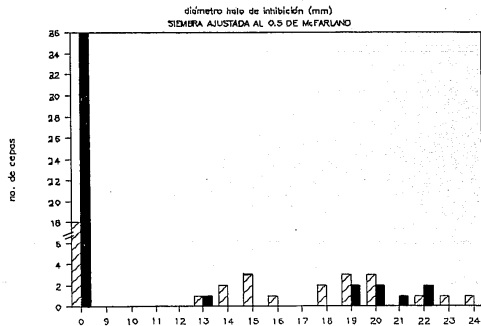
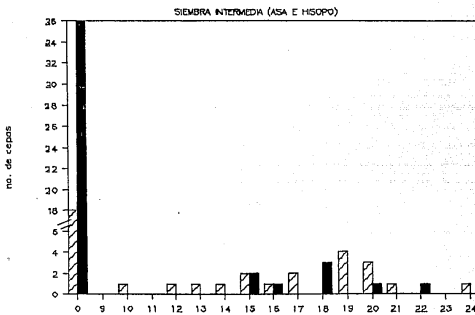
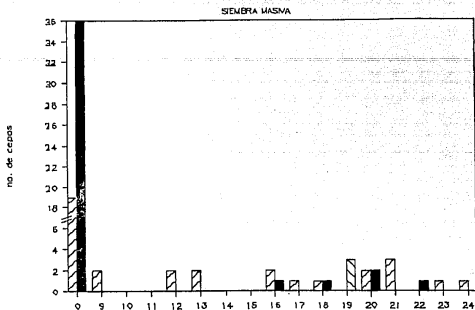
$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{Resultados positivos}}{\text{Verdaderos positivos}} \times 100 = \frac{40}{44} \times 100 = 91\%$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{Resultados negativos}}{\text{Verdaderos negativos}} \times 100 = \frac{33}{36} \times 100 = 92\%$$

$$\begin{aligned} \text{Valor Predictivo Positivo} &= \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}} \times 100 \\ &= \frac{40 \times 100}{40 + 4} = 90.9\% \end{aligned}$$

GRAFICA V

DIAMETRO HALO DE INHIBICION DE TMP-SXZ



▨ ESTREPTOCOCCOS GPO.A

▤ ESTREPTOCOCCOS GPO.B

T A B L A V I

Resultados de la prueba de TMP-SXZ para la identificación de estreptococos beta-hemolíticos

TIPO DE SIEMBRA	CONSIDERANDO ÚNICAMENTE EL HALO DE INHIBICIÓN				CONSIDERANDO COMO ZONA DE INHIBICIÓN 10 mm DIÁMETRO				CONSIDERANDO COMO ZONA DE INHIBICIÓN 12 mm DIÁMETRO			
	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO A		GRUPO B		GRUPO A		GRUPO B	
	ZONA	NO ZONA	ZONA	NO ZONA	ZONA	NO ZONA	ZONA	NO ZONA	ZONA	NO ZONA	ZONA	NO ZONA
SIEMBRA MASIVA	17 (47.22)	19 (52.77)	8 (18.18)	36 (81.81)	15 (41.66)	21 (58.33)	8 (18.18)	36 (81.81)	15 (41.66)	21 (58.33)	8 (18.18)	36 (81.81)
SIEMBRA CON ASA E HISOPO	18 (50)	18 (50)	8 (18.18)	36 (81.81)	18 (50)	18 (50)	8 (18.18)	36 (81.81)	17 (47.22)	19 (52.77)	8 (18.18)	36 (81.81)
SIEMBRA AJUSTADA AL 0.5 MCFARLAND	18 (50)	18 (50)	8 (18.18)	36 (81.81)	18 (50)	18 (50)	8 (18.18)	36 (81.81)	18 (50)	18 (50)	8 (18.18)	36 (81.81)

NUMERO DE CEPAS
(PORCENTAJE DE POSITIVIDAD)

ZONA = CON HALO DE INHIBICION

NO ZONA = SIN HALO DE INHIBICION

DISCUSION DE RESULTADOS

La prueba de la bacitracina para la identificación de estreptococos del grupo A es una forma sencilla y confiable. Pero la bacitracina que se encuentra en México es importada, y, por lo tanto, de un costo elevado, por ser además de una alta pureza. Sin embargo, existe una casa productora de este antimicrobiano a un menor precio, pero con la desventaja de que tiene una menor potencia y, además, no se da la garantía de que la potencia indicada sea la potencia real. No obstante, este problema se soluciona al efectuar la valoración de la bacitracina por el método microbiológico. Este método de valoración es sencillo de realizar y de resultados fiables. Con esto puede asegurarse que la bacitracina que se utiliza para producir discos impregnados con ella tienen la concentración fijada real de la misma, y con un costo asequible.

Los resultados de la prueba de bacitracina efectuada en este trabajo difieren debido a las tres variables manejadas durante la realización del mismo. El efecto que tiene la carga del inóculo se aprecia en la magnitud del diámetro de la zona de inhibición. Aquellas placas que fueron sembradas masivamente presentan los diámetros de las zonas de inhibición menores, ya que mientras más inóculo hay más resistencia

al antimicrobiano se presenta. En las placas sembradas ajustando al 0.5 de McFarland muestran las zonas de inhibición de menor diámetro, pues un inóculo débil es más sensible a la bacitracina. En las placas que fueron sembradas con la carga de inóculo intermedia se observan diámetros de la zona de inhibición de moderada dimensión.

La segunda variable manejada en el trabajo fue la concentración de bacitracina en los discos. Se encontró que aquellos discos impregnados con 0.02 U produjeron una zona de inhibición más pequeña, mientras que los discos que contenían 0.10 U dieron por resultado las zonas de inhibición mayores. Los discos impregnados con 0.04 U produjeron diámetros de las zonas de inhibición intermedios.

La tercera variable consiste en la forma de interpretar los resultados, ya que se vió el efecto que se tiene al tomar cualquier zona de inhibición como indicación de estreptococos beta-hemolíticos del grupo A, o si se deben medir los diámetros de las zonas de inhibición para hacer la identificación de los mismos.

Si se toma el criterio original de Maxted para la interpretación de resultados, considerando cualquier tamaño de la zona de inhibición para la identificación de estreptococos del grupo A, el efecto en la magnitud del inóculo y en la

concentración de bacitracina en los discos de papel filtro no afecta, de manera que en las nueve modificaciones (cada una con una concentración del antimicrobiano y magnitud del inóculo específica) se obtiene una sensibilidad de 97.2% y una especificidad de 97.7%.

Si, por el contrario, se toma un diámetro de 10 mm o mayor de la zona de inhibición la pauta para la identificación de los estreptococos del grupo A, la magnitud del inóculo y la concentración de bacitracina en los discos de papel filtro provocan un cambio significativo. Aquellos discos de bacitracina impregnados con 0.02 U cada uno producen una zona de inhibición en los estreptococos de diversas dimensiones, según la magnitud del inóculo. Cuando el disco se colocó en medio de la siembra masiva, y tomando las zonas de inhibición de 10 mm o mayores como indicativos de estreptococos del grupo A, la especificidad llega a aumentar hasta el 100%, sin embargo, la sensibilidad se reduce notablemente, hasta un 75%. Los discos que fueron colocados en la siembra intermedia también aumentaron su especificidad al 100%, pero su sensibilidad también disminuyó hasta el 86.1%. En las placas sembradas ajustando al 0.5 de McFarland, los discos impregnados con 0.02 U de bacitracina pudieron inhibir el crecimiento de una cepa de estreptococo del grupo B, considerando que su diámetro de la zona de inhibición fué mayor a 10 mm, teniendo así una especificidad del 97.7%, y aumentando la sensibilidad,

con respecto a los resultados obtenidos con las otras magnitudes del inóculo, al 91.7%.

En cuanto a los discos impregnados con 0.04 unidades de bacitracina, no se observó un cambio tan marcado como en los discos de 0.02 unidades de bacitracina, de acuerdo a la magnitud del inóculo. Tanto en la siembra masiva como en la intermedia, la especificidad mostrada por los discos fué de 97.9%, y la sensibilidad de 91.7%.

Se obtuvieron los mismos resultados de especificidad (de 97.7%) y de sensibilidad (de 97.2%) de los discos impregnados con 0.04 unidades de bacitracina y colocados en la siembra ajustada al 0.5 de McFarland, y los discos impregnados con 0.10 unidades de bacitracina en las tres magnitudes de inóculo.

Si se toma como criterio para la identificación de estreptococos del grupo A un diámetro de la zona de inhibición de 12 mm o mayor, se encuentran cambios aún mayores en la especificidad y la sensibilidad.

Los discos que contenían 0.02 unidades de bacitracina dieron por resultado una especificidad del 100% en siembra masiva e intermedia; sin embargo, su sensibilidad fué muy baja, de 38.9% y 66.7%; respectivamente. Con el inóculo ajustado al

0.5 de McFarland, su especificidad fué de 97.7%, y su sensibilidad fué de 66.7%.

Los discos impregnados con 0.04 unidades de bacitracina mostraron una especificidad de 97.7% en los tres tipos de siembra, mientras que su sensibilidad si se vió afectada por la magnitud del inóculo; en la siembra masiva, la sensibilidad mostrada fué de 75%, en la magnitud de inóculo intermedia fué de 86.1%, y en la siembra ajustada al 0.5 de McFarland su sensibilidad fué de 91.6%.

La especificidad observada con los discos de 0.10 unidades de bacitracina no varió con el tipo de siembra, pero no sucedió así con la sensibilidad. Los discos colocados en siembra masiva mostraron una sensibilidad del 88.9%, en la siembra de magnitud del inóculo moderada su sensibilidad fué de 91.6%, y los situados en la siembra ajustada al 0.5 de McFarland fué de 97.2%.

Con todos estos resultados se observa que los mejores resultados, tanto de sensibilidad como de especificidad, se obtienen igualmente con:

a) Las tres concentraciones de bacitracina impregnadas en los discos y con los tres tipos de siembra, tomando como criterio de identificación el mismo que Maxted utilizara para

su estudio: cualquier zona de inhibición, sin importar su diámetro, se considera indicativo de estreptococos del grupo A de Lancefield.

b) Los discos impregnados con 0.04 unidades de bacitracina, con la siembra del inóculo ajustada al 0.5 de McFarland, y tomando como pauta para la identificación de estreptococos del grupo A un diámetro de la zona de inhibición de 10 mm o mayor.

c) Los discos que contienen 0.10 unidades de bacitracina, con las tres magnitudes de inóculo, considerando una zona de inhibición de 10 mm o más de diámetro como indicativo de estreptococos del grupo A.

d) Los discos de papel filtro impregnados con 0.10 unidades de bacitracina, ajustando el inóculo al 0.5 de McFarland, y tomando un diámetro de la zona de inhibición mayor o igual a 12 mm para identificar a los estreptococos del grupo A.

En todos estos casos, la especificidad obtenida es de 97.9% y la sensibilidad es de 97.2%. Un 2.3% de las cepas se reportarían como pertenecientes presuntamente al grupo A de Lancefield, aún cuando no lo son; sin embargo, los resultados falsos positivos son preferibles a los resultados falsos negativos, es por esto que no son recomendables las condicio-

nes en las que la especificidad aumenta al 100%, pues se sacrificaría la sensibilidad, disminuyéndola notablemente.

La prueba del factor CAMP se ha utilizado ampliamente para la identificación presuntiva del grupo B estreptocócico con resultados satisfactorios. No obstante, en este estudio se obtuvieron 8.4% resultados falsos positivos. Algunos investigadores han coincidido en los resultados de la prueba de CAMP, pues han obtenido resultados falsos positivos. Estos resultados falsos positivos los provocan cepas pertenecientes a el grupo A de los estreptococos beta-hemolíticos. Se cree que esto es debido a la producción de un factor lítico sinérgico por parte de algunos estreptococos del grupo A, y que posee características muy semejantes a las de la estreptolisina O.

En cuanto a la prueba de resistencia de los estreptococos de los grupos A y B frente al TMP-SMX, se observó en este trabajo que no puede tomarse como prueba de identificación presuntiva para dichos microorganismos. Los resultados obtenidos demuestran que no todos los estreptococos de los grupos A y B son resistentes a la mezcla de antimicrobianos: de las 80 cepas analizadas, el 31.3% fueron susceptibles a la prueba en la siembra masiva, sin tomar un diámetro específico de la zona de inhibición para la identificación. Tanto en los discos colocados en la siembra ajustada al 0.5 de McFarland

como en la siembra de magnitud de inóculo intermedio, el 32.5% de las cepas fueron sensibles a la mezcla de antibióticos.

Tomando un diámetro de la zona de inhibición de 10 mm o más como indicación de la sensibilidad de la cepa por el antimicrobiano, el 24.7% de las cepas fueron sensibles al mismo en la siembra masiva, mientras que en las otras dos magnitudes del inóculo persistió el 32.5% sensible a él.

Si para la identificación se requiere de un diámetro de 12 mm o mayor en la zona de inhibición, con la siembra masiva aún son sensibles el 24.7%, con la siembra intermedia se inhiben el 33.7%, y con la siembra ajustada al 0.5 de McFarland son sensibles el 32.5% de las cepas.

CONCLUSIONES

1.- De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la identificación presuntiva de los estreptococos del grupo A de Lancefield puede llevarse a cabo por medio de la prueba de sensibilidad a la bacitracina bajo condiciones diversas obteniendo resultados semejantes con ellas; sin embargo, para llevar a cabo un trabajo rutinario de laboratorio, y obtener una buena sensibilidad y especificidad en la prueba, las mejores condiciones para trabajar son: la siembra masiva, la utilización de discos de papel filtro impregnados con 0.04 unidades de bacitracina, e interpretando los resultados tomando en cuenta unicamente la presencia o ausencia del halo de inhibición.

2.- La siembra masiva tiene la ventaja de ser rápida y sencilla para llevarse a cabo durante un trabajo rutinario, al igual que la interpretación de la ausencia o presencia del halo de inhibición en los resultados.

3.- Los discos de papel filtro impregnados con 0.02 y 0.10 unidades de bacitracina dan igual resultado que los impregnados con 0.04 unidades del antimicrobiano bajo las condiciones anteriormente señaladas, pero los discos

impregnados con estas concentraciones no se encuentran comercialmente en el mercado, lo que trae consigo la desventaja de elaborarlos, y esto conlleva a la investigación de la potencia del antibiótico con el que se impregnarian, originando una inversión de tiempo y gastos adicionales. Los discos de 0.04 unidades de bacitracina si se comercializan, y se puede tener con ellos la ventaja de que, siempre y cuando se preparen considerando la potencia de la sal, la confiabilidad de los resultados es elevada.

4.- La prueba de la sensibilidad a la bacitracina es sencilla y económica, por lo que es ampliamente recomendada como prueba presuntiva para la identificación de estreptococos del grupo A de Lancefield. Con ella, utilizándola bajo las condiciones descritas, se tiene una respuesta de especificidad y sensibilidad muy buena, comparable con las de otras técnicas más complejas y costosas.

5.- La prueba del factor CAMP, es una prueba sencilla y económica para identificar presuntivamente a los estreptococos beta-hemolíticos del grupo B de Lancefield. Llevándola a cabo con discos de papel filtro impregnados con la beta-lisina estafilocócica se tiene la ventaja de identificarlos en forma rápida y prácticamente, eliminando la adquisición y conservación de cepas de *Staphylococcus aureus*.

6.- La prueba de sensibilidad al trimetoprim-sulfametoxazol no cumplió con los resultados esperados bajo las condiciones de este trabajo, por lo que no se recomienda para la identificación presuntiva de estreptococos beta-hemolíticos de los grupos A y B de Lancefield.

7.- La identificación de estreptococos beta-hemolíticos de los grupos A y B es de gran importancia, ya que estos grupos son los responsables de la mayoría de las infecciones estreptocócicas en humanos. Es por esto que es necesaria una metodología estandarizada y confiable, además de ser de bajo costo.

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

1. Arvilomii, H. 1976. "Grouping of beta-haemolytic streptococci by using coagulation, precipitation or bacitracin sensitivity". Acta Path. Microbiol. Scan. Sect. B 84: 79-84.
2. Barry, A. L. C. Thornsberry. 1976. "Susceptibility tests: diffusion test procedures". The antimicrobial susceptibility testing. Lea & Feiberg, Philadelphia, USA.
3. Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris, M. Turck. 1966. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method." Am. J. Clin. Pathol. 45": 493-496.
4. Benheimer, A. W., R. Linder, L. S. Avigad. 1979. "Nature and mechanism of action of the CAMP protein of group B streptococci". Infect. Immunity 23: 838-844.
5. Bergner, S. R., E. Halmovici. 1965. "Evaluation of the bacitracin test for the identification of group A hemolytic streptococci." Israel J. Med. Sci. 1: 453-454.

6. Braunstein, H., E. B. Tucker, B. C. Gibson. 1969. "Identification and significance of *Streptococcus agalaciae* (Lancefield group B)". *Am. J. Clin. Pathol.* 51:207-213.

7. Breed, R. S., E. G. D. Murray, N. R. Smith. 1957. "Bergey's manual of determinative bacteriology". The Williams & Wilkinson Company. Baltimore, U. S. A. pp: 508-529.

8. Chitwood, L. A., M. B. Jennings, H. D. Rileg. '69. "Time, cost and efficacy study of identifying group A streptococci with commercially available reagents." *Appl. Microbiol.* 18: 193-197.

9. Christensen, P., G. Kahlmeter, S. Johnson, G. Kranval. 1973. "New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies adsorbed to protein A-coated staphylococci." *Infect. Immun.* 7:881-885.

10. Christie, R., N. Atkins, E. Munch-Petersen. 1944. "A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci." *Aust. J. Exp. Biol.* 22: 197-200.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

11. Coleman, D. J., D. McGhie, G. M. Tebbut. 1977. "Further studies on the reliability of the bacitracin inhibition test for presumptive identification of Lancefield group A." J. Clin. Pathol. 30: 421-426.

12. Darling, C. L. 1975. "Estandarization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material." J. Clin. Microbiol. 1: 171-174.

13. Davis, C. L. 1986. "Tratado de microbiologia". Salvat editores, México. pp: 730-748.

14. Dipersio, J. R., J. E. Barret, R. L. Kaplan. 1985. "Evaluation of the spot-CAMP test for the rapid presumptive identification of group B streptococci." Am. J. Clin. Pathol. 84: 216-219.

15. Ederer, G. M., M. M. Herman, R. Bruce, J. M. Matsen, S. S. Chapman. 1972. "Rapid extraction method with pronase B for grouping beta-hemolytic streptococci." Appl. Microbiol. 23: 285-288.

16. Escamilla, E. A. 1975. "Clasificación serológica de estreptococos beta-hemolíticos en grupos de Lancefield y antígenos M y T." Tesis. ENCB México.

17. Estela, L., H. E. Shuey. 1963. "Comparision of fluorescent antibody, precipitin and bacitracin disks methods in the identification of group A streptococci." Am. J. Clin. Pathol. 40: 591-597.

18. Facklam, R. R., J. F. Padula, L. G. Thacker, B. J. Sconyers. 1974. Presumptive identification of group A, B and D streptococci." Appl. Microbiol. 27: 107-113.

19. Facklam, R. R. 1979. "Presumptive identification of group A, B and D streptococci on agar plate media." J. Clin. Microbiol. 9:665-672.

20. Facklam, R. R. 1980. "The status of developed and developing techniques." Recent development in laboratory identification techniques. Exp. Med. Amsterdam. pp: 99-103.

21. Facklam, R. R. 1980. "Streptococci and aerococci." Manual of clinical microbiology. Third edition. American Society of Microbiology. U. S. A. pp: 88-110.

22. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. 1974. Dirección general de control de alimentos, bebidas y medicamentos. SSA. Cuarta edición. México, D. F. pp: 31-42.

23. Fox, E. N. 1965. "The multiple molecular structure of the protein M of group A streptococci." *Sci.* 54: 1118-1125.

24. Fuchs, P. C., C. Christy, R. M. Jones. 1978. "Multiple-inocula (replicator) CAMP test for presumptive identification of group B streptococci." *J. Clin. Microbiol.* 8: 232-233.

25. Giono, B. C. 1974. "El estreptococo y la fiebre reumática." *Rev. Lat. Amer. de Microbiología.* 16:111-122.

26. Giono S. C. 1976. "Manual del laboratorio de bacteriología médica." Tercera edición. ENCB. México, D. F. pp: 137-143.

27. García González, Yolanda del Carmen. 1989. "Preparación de discos impregnados con beta-lisina para la identificación presuntiva de *Streptococcus agalactiae*". Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. México.

28. Gunn, B. A. 1976. "SXT and Taxo A disks for presumptive identification of group A and B streptococci in throat cultures." *J. Clin. Microbiol.* 4: 192-193.

29. Hahn, G., I. Nyberg. 1976. "Identification of streptococci group A, B, C and G by slide coagglutination of antibody." *J. Clin. Microbiol.* 4:99-101.
30. Hardy, M. A., H. P. Dalton, M. J. Allison. 1978. "Laboratory identification and epidemiology of streptococcal hospital isolates." *J. Clin. Microbiol.* 8: 534-544.
31. Index Merck. 1983. Merck and Co. Inc. Décima edición. U. S. A. pp: 1278, 1387.
32. Koch, A. E., J. J. Burchall. 1971. "Reversal of the antimicrobial activity of trimetoprim by thymidine in commercial prepared media." *Appl. Microbiol.* 22: 812-817.
33. Lancefield, R. C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci." *J. Exp. Med.* 57: 571-195.
34. Leland, D. S., R. C. Lachapelle, F. M. Wlodarski. 1978. "Method of rapid detection of group B streptococci by coagglutination." *J. Clin. Microbiol.* 7: 323-326.
35. Levinson, M. L., P. F. Frank. 1954. "Differentiation of group A from other beta-hemolytic streptococci with bacitracin." *J. Bact.* 69: 284-287.

36. Marchlewicz, B. A., J. L. Duncan. 1980. "Properties of a hemolysin produced by group B streptococci." *Infect. Immun.* 30: 805-813.

37. Maxted, W. R. 1953. "The use of bacitracin for identifying group A haemolytic streptococci." *J> Clin. Pathol.* 6: 224-226.

38. Munch-Petersen, E., R. Christie. 1974. "On the effect of the interaction of staphylococcal beta-toxin and group B streptococcal substance on red blood corpuscles and its use as a test for the identification of *Streptococcus agalactiae*" *J. Path. Bact.* 59:367-371.

39. Murray, P.R., A. D. Wold, M. M. Hall, J. A. Washington II. 1976. "Bacitracin differentiation for presumptive identification of group A beta-hemolytic streptococci: comparison of primary and purified plate testing." *J. Pediatr.* 89:576-579.

40. Nord, C. E. 1980. "Methods for identification streptococci in a clinical bacteriological laboratory." *Recent development in laboratory techniques. Exp. Med. Amsterdam.* pp:132-138.

41. Petran, E. I. 1969. "Comparision of the fluorescent antibody and the bacitracin disk methods for the identification of group A streptococci." The Am. J. Clin. Pathol. 34: 8-10.

42. Pharmacia Diagnostics. 1982. "Phadebact streptococci test. Instrucciones para el uso. Pharmacia Diagnostics. Piscataway, N. J. U. S. A.

43. Phillips, E. A., J. W. Tapsall, D. D. Smith. 1980. "Rapid tube CAMP test for identification of Streptococcus agalactiae (Lancefield group B)." J. Clin. Microbiol. 12: 135-137.

44. Pollock, H. M., B. J. Dahlgren. 1974. "Distribution of streptococcal groups in clinical specimens with evaluation of bacitracin screening." Appl. Microbiol. 27: 141-143.

45. Randall, E. L. 1976. "Pathogenicity of streptococci." Recent development in laboratory identification techniques. Exp. Med. Amsterdam. pp: 116-121.

46. Ratner, H. B., L. S. Weeks, C. W. Stratton. 1986. "Evaluation of spot-CAMP test for the identification of group B streptococci." J. Clin. Microbiol. 24: 296-297.

47. Reid, T. M. S., D. J. Lloyd. 1980. "The clinical need and technical methods for the identification of the group B streptococcus." Recent development in laboratory identification techniques. Exp. Med. Amsterdam. pp.196-198.
48. Rotta, J., R. R. Facklam. 1977. "Manual of microbiological diagnostic methods for streptococcal infections and their sequelae." World Health Organization. pp: 3-26.
49. Sánchez, M. L. 1983. "Identificación y agrupación de estreptococos beta-hemolíticos aislados de faringe de diferentes poblaciones." Tesis ENCB, México.
50. Schaub, I. G., I. Mazeika, R. Lee. M. T. Dunn, R. A. Lachaine, W. H. Price. 1957. "Ecologic studies of rheumatic fever and rheumatic heart disease." Am. J. Hyg. 67: 46-56.
51. Scully, B. E., D. Spriggs, H. C. Neu. 1987. "Streptococcus agalactiae (Group B) endocarditis.- A description of twelve cases and review of the literature." Infection. 15: 169-176.
52. Slifkin, M., E. Engwall, G. R. Pouchet. 1978. "Direct plate serological grouping of beta-hemolytic streptococci from primary isolation plates with the Phadebact Streptococcus test." J. Clin. Microbiol. 7: 356-360.

53. Solórzano, S. F., G. Echaniz A., E. Calderón J., C. J. Conde G., R. Castellanos C. 1987. "Identificación rápida del estreptococo del grupo B." Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 4: 344-348.
54. Sox, H. C. 1984. "Probability theory in the use of diagnostic tests." Annals. of Internal Medicine. 104: 60-66.
55. Stoner, R. A. 1970. "Bacitracin and coagglutination for grouping of beta-hemolytic streptococci". J. Clin. Microbiol. 7: 463-466.
56. Tapsall, J. W., E. A. Phillips. 1984. "Streptococcus pyogenes streptolysin D as a cause of false positive CAMP reactions." J. Clin. Microbiol. 19: 534-537.
57. Tapsall, J. W., E. A. Phillips. 1985. "Brief note.- The influence of nutritional and cultural factors on CAMP factor production by group B streptococci." Pathology. 17: 663-665.
58. Tapsall, J. W., E. A. Phillips. 1987. "Presumptive identification of group B streptococci by rapid detection of CAMP factor and pigment production." Diagn. Microbiol. Infection. 7: 225-228.

59. Tessier, F. G. L. Daguet. 1980. "Comparative study of different methods of grouping streptococci A, B, C, D and G." Recent development in laboratory identification techniques. Exp Med. Amsterdam. pp: 141-145.

60. Wallestrom, A. 1962. "A simple biochemical 'triple test' for preliminary identification of group A streptococci." Acta Pathol. Microbiol. Scand. 56: 459-464.

61. Wilkinson, H. W. 1977. "CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci." J. Clin. Microbiol. 6:42-45.