



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO DE Streptococcus BETA HEMOLITICO DEL
GRUPO A (IDENTIFICACION NO SEROLOGICA) Y
Staphylococcus aureus COAGULASA POSITIVA A
PARTIR DE EXUDADOS FARINGEOS OBTENIDOS
DE LA POBLACION DE LA ZONA METROPOLITANA
NORTE QUE ACUDE AL HOSPITAL lo. DE
OCTUBRE DEL I. S. S. S. T. E.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

ADRIANA BELTRAN DELGADO

DIRECTOR:

QFI. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO 1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
RESUMEN	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS	23
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFIA	41

INTRODUCCION

Los estreptococos fueron observados por los primeros investigadores en los exudados purulentos, pero fue hasta 1884, que se demostró su decisiva influencia etiológica en la formación de pus. La gran diversidad de procesos en los que pueden estar involucrados y la complejidad de sus relaciones, hacen de los estreptococos bacterias patógenas muy interesantes (33).

El Dr. Brown de Baltimore, y sus colaboradores comprobaron que los estreptococos podrían dividirse en tres grupos, basándose en sus efectos sobre agar sangre. En consecuencia, incluyeron en el grupo alfa, denominándolos Streptococcus viridans a los que producen decoloración verde y hemólisis parcial del medio. Clasificaron en el grupo beta, con el nombre de Streptococcus hemolyticus, a aquellos estreptococos que forman zonas completas de hemólisis alrededor de las colonias, y por fin, constituyeron el grupo gama, Streptococcus anhemolyticus, con las bacterias de este tipo que no afectan a los eritrocitos en agar sangre (33, 28).

Durante los últimos veinte años, los bacteriólogos han investigado, siguiendo los lineamientos de Griffith en Inglaterra y de Rebeca --- Lancefield en los Estados Unidos, el contenido antigénico de los estreptococos. Los métodos de identificación actualmente usados se basan fundamentalmente en pruebas de precipitación usando un antígeno hidrocarbonado (C) que difiere de un grupo a otro. El Streptococcus del grupo -- viridans, tipo alfa hemolítico de las vías respiratorias, no posee este tipo de carbohidrato, pero otros estreptococos pueden clasificarse de -- esta manera. Los grupos de " Lancefield " son designados por letras, -- siendo debidos a miembros del Grupo A la mayor parte de las infecciones-

humanas producidas por estreptococos beta-hemolíticos. Este grupo se -
subdivide en gran número de tipos basándose en pruebas serológicas para-
antígenos proteicos específicos, llamados antígenos M, y localizados en
la superficie de la célula (En ocasiones, los Streptococcus del Grupo A
se dividen según otra proteína, el antígeno T, pero éste es menos especí-
fico que el M). Se han encontrado microorganismos del grupo A en el -
95% de las infecciones humanas producidas por estreptococos beta-hemolí-
ticos. Cuando el microorganismo asociado con una infección humana se de-
signa solamente con el número, se supone generalmente que pertenece el -
grupo A (20, 21).

Hoy día, los aspectos microbiológicos de la enfermedad tienden a -
constituir sólo una parte de un estado complejo en que una serie de even-
tos o un conjunto de facetas presentes simultáneamente pueden permitir -
que cualquier grupo considerable de microorganismos participe en el cua-
dro, no como agentes causales primario, sino como secundarios que contri-
buyen al síndrome total del enfermo. Por esto, la interpretación de los
resultados de un cultivo resulta difícil. Es necesario que los responsa-
bles del funcionamiento del laboratorio microbiológico estén familiariza-
dos con los aspectos modernos de la enfermedad por microbios (21).

Ya no es posible clasificar los microorganismos asociados al hombre
de una manera concisa como patógenos o no patógenos. La determinación -
del papel causante depende a menudo más de las circunstancias en que se-
halla el organismo que de su naturaleza.

Los microorganismo de los que antes se pensaba que rara vez, esta -
ban asociados con una enfermedad, están siendo identificados con síndro-
mes clínicos constantemente. Muchos de ellos pertenecen a la llamada --
flora normal, y algunos son organismos que por una u otra razón se cono-

cían poco, lo cual se explica por varias razones. En primer lugar, los individuos desarrollan hoy día susceptibilidad a enfermedades microbianas que, por lo menos en alguna medida, no existían en lo pasado. Las personas con problemas del metabolismo, los individuos debilitados y los que están sometidos a un tratamiento con esteroides u otros fármacos -- que deprimen el mecanismo inmune normal son susceptibles de una enfermedad microbiana, probablemente porque el huésped ofrece al agente una -- oportunidad de propagarse excesivamente. En algunos casos se podría sopechar que los organismos han tenido siempre poder patógeno, pero que -- estaba enmascarado por la presencia de otros organismos que ahora están -- siendo eliminados, por los antibióticos o por otros medios de control. En segundo lugar, el amplio empleo de los antibióticos ha producido cambios en ciertos organismos, por ejemplo el Staphylococcus aureus, hasta el extremo de que estos organismos han adquirido una nueva importancia. En el caso del Staphylococcus aureus, el amplio uso de los antibióticos permitió que aquellos que por una u otra razón podían resistir los efectos de estos agentes, se llegaran a distribuir mucho en la población. Otra consecuencia del empleo incrementado de los antibióticos es la manifestación en forma más severa de los efectos tardíos producidos por una infección bacteriana. El ejemplo más típico es la fiebre reumática y la glomerulonefritis, que según se sabe, son secuelas de la infección estreptocócica (6, 29).

Los estreptococos presentan ciertas estructuras celulares externas, que le dan características de resistencia y antigenicidad específicas: -- la cápsula, compuesta por ácido hialurónico, impide la fagocitosis; la pared celular compuesta por proteínas y antígenos M, T y R; una capa de carbohidratos, N-acetilglucosamina y Ramnosa; mucopéptido, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurámico, alanina, ácido glutámico, lisina y glicí

na y finalmente la membrana protoplásmica, proteínas-lípidos y glucosa (2).

Ninguna especie bacteriana causa tan amplia variedad de enfermedades en el hombre como los Streptococcus del grupo A beta-hemolíticos, hecho que está relacionado con el gran número de productos extracelulares, que se sabe que éstos producen, como son:

- Toxinas eritrogénicas (A, B, C)
- Estreptolisina O
- Estreptolisina S
- Difosfopiridinnucleotidasa
- Estreptoquinasa (A y B)
- Desoxirribonucleasa (A, B, C y D)
- Hialuronidasa
- Proteínasa
- Amilasa
- Esterasa
- Etc. (4)

Para el diagnóstico clínico en el laboratorio de Streptococcus grupo A beta-hemolítico se toma en cuenta las características siguientes: - causa enfermedades como bronconeumonía, amigdalitis folicular, nefritis, septicemia, escarlatina fiebre reumática, osteomielitis, erisipela. --

Son cocos esféricos que se presentan en cadenas y parejas, Gram positivas, en agar sangre forman colonias pequeñas beta-hemolíticas. Sensible a la bacitracina (0.02 - 0.04 unidades), y a el trimetoprim-sulfametoxazol (1.25 - 23.5 mg) (4).

Para el diagnóstico de el Staphylococcus aureus se toman encuestas las características siguientes: produce enfermedades en piel, nasofaringe, abscesos, intoxicación por alimentos, en aparato reproductor, en aparato digestivo, osteomielitis, impétigo, septicemia, neumonías, enterocolitis pseudomembranosa. Son cocos redondos que se agrupan en característicos cúmulos parecidos a racimos de uvas, Gram positivos, en agar sangre - forman grandes colonias pigmentadas de color oro. La mayoría de las cepas patógenas son positivas a coagulasa, DNasa, fosfatasa, termonucleasa, y manitol (2, 4).

En este trabajo se hicieron estas pruebas pero en condiciones anaerobias (ocasionadas por varios sistemas) adecuadas para la obtención de mejores resultados en cuanto a un diagnóstico clínico aceptable sin necesidad de pruebas demasiado costosas como el método de anticuerpos fluorescentes o el método de precipitación de Lancefield (7).

Siguen descubriéndose nuevas toxinas y enzimas estreptocócicas. Por ejemplo, con métodos inmunolectroforéticos se han encontrado en mezclas de gama globulinas humanas, 20 anticuerpos diferentes que reaccionan con 20 antígenos extracelulares diferentes que elabora la cepa C-203 de Streptococcus del grupo A beta-hemolíticos (36).

Algunas toxinas estreptocócicas son: Estreptocinasa (fibrinolisisina), es producida por muchas cepas de estreptococo beta-hemolítico provoca la transformación del plasminógeno del suero humano en plasmina, enzima proteolítica activa que digiere a la fibrina y a otras proteínas.

Estreptodornasa (DNasa), es una enzima que despolimeriza al DNA. --
Hialuronidasa, es una enzima que desdobra al ácido hialurónico, constituyente importante de la substancia intercelular del tejido conjuntivo, así pues, la hialuronidasa favorece la diseminación de los microorganismos infectantes. Toxina eritrogénica, provoca el exantema que se presenta en la escarlatina. Solamente las cepas que elaboran esta toxina son capaces de causar esta enfermedad. Algunos estreptococos elaboran y liberan en el medio una Difosfopiridin-nucleotidasa, enzima que quizá está relacionada con la capacidad del microorganismo para matar a los leucocitos. Protefnasas y Amilasas son producidas por algunas cepas (12, 36).

El grupo de Streptococcus A produce dos hemolisinas distintas O y S pero no todas las cepas producen ambas; algunas cepas pueden producir una o ninguna, la presencia en el suero de anticuerpos contra la estreptolisina O es útil para detectar infecciones recientes con estreptococos. -
La estreptolisina S es responsable de las zonas de hemólisis alrededor de las colonias que se forman sobre agar sangre (La estreptolisina O producirá también beta-hemólisis pero sólo bajo condiciones anaeróbicas, ya que queda irreversiblemente inactivada por el oxígeno). La estreptolisina S no es un buen antígeno (30).

Los organismos que siempre deben someterse a las pruebas de susceptibilidad son: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis (como patógeno), Enterobacterias, Pseudomonas, Haemophilus influenzae, y otros microorganismos de susceptibilidad impredecible.

Las pruebas de susceptibilidad no deben solicitarse para los organismos que posean una susceptibilidad inalterable a un antibiótico, como Streptococcus pneumoniae y el Streptococcus del grupo A beta-hemolítico a la penicilina, así como en los que estén actuando como flora

normal o colonizadores transitorios (22, 38).

Los Staphylococcus son miembros de la familia Micrococcaceae, que incluye los géneros Micrococcus, Staphylococcus y Planococcus. Las especies de interés clínico del género Staphylococcus el S. aureus coagulasa positiva y algunas especies coagulasa negativa, pueden identificarse por la morfología de sus colonias, producción de coagulasa, hemólisis, producción de desoxirribonucleasa, fermentación del manitol. En agar sangre el crecimiento es abundante entre 18 a 24 horas, a 34-37°C. Las colonias bien aisladas de estafilococos miden generalmente de 1 a 3 mm de diámetro a los cinco días de incubación. Son generalmente circulares, lisas y elevadas, ligeramente convexas. Las colonias que corresponden a esta descripción deben someterse a la coloración de Gram y las células se observan como cocos Gram positivos, formando agregados en forma de racimos de uvas o en cadenas (17, 31 32).

Muchas de las cepas de Staphylococcus son resistentes a la penicilina en virtud de la producción de penicilinasa, enzima que destruye la penicilina, rompiendo el anillo beta lactámico. Su producción está regulada a nivel de plásmidos, que pueden ser transferidos por bacteriofagos. Los plásmidos llevan también el control genético de la resistencia a otros antibióticos, como la tetraciclina y eritromicina (38).

Los Staphylococcus contienen tanto polisacáridos como proteínas antigénicas que permiten un agrupamiento de las cepas. Los ácidos teicoicos eslabonados al péptidoglucano de la pared celular, pueden ser antígenicos. Las proteínas superficiales pueden interferir con la fagocitosis. La proteína A, un componente de la pared celular se une a la porción FC de cualquier molécula de IgG. Esto hace que la porción Fab de cualquier molécula de anticuerpo esté cara afuera, de manera que se encuen-

tra libre para combinarse con un antígeno específico. Esta propiedad ha encontrado muchas aplicaciones en la inmunología y tecnología diagnósticas (Por ejemplo, la proteína estafilocócica A con un anticuerpo específico IgG insertado, dirigida contra una bacteria X, aglutina a ésta) (15, 25).

Exotoxina. Es un material filtrable, termolábil, letal para los animales por inoculación parenteral, que provoca necrosis de la piel y contiene diversas hemolisinas solubles. La hemolisina alfa, tiene a su vez una acción poderosa sobre el músculo liso de los vasos, actúa sobre eritrocitos de conejo, lesiona a las plaquetas y posiblemente idéntica a los factores letal y dermonecrótico de la exotoxina. La hemolisina beta destruye los eritrocitos de carnero. Estas hemolisinas y dos más, gamma y delta, son antigenicamente diferentes y no tienen relación alguna con las lisinas de los estreptococos (42).

Leucocidina. Es un material soluble que mata a los leucocitos de diversas especies animales; es antigénico y más termolábil que la exotoxina, siendo incierto su papel en la patogenia (17).

DNasa. Enzima que despolimeriza al DNA, algunos microbiólogos utilizan esta prueba para la identificación de especie (30).

Enterotoxina. Es un material soluble producido por algunas cepas de estafilococos, particularmente en aquellas que crecen en medios semisólidos y con altas concentraciones de anhídrido carbónico (6).

Coagulasa. La mayoría de los estafilococos patógenos para el hombre producen esta sustancia proteica que se comporta como una enzima y que coagula el plasma (oxalatado o citratado) en presencia de un factor contenido en muchos sueros. El factor del suero que reacciona con la coagu-

lasa, genera actividad esterásica y coagulante en forma similar a como se realiza la activación de la protrombina a trombina. La coagulasa puede depositar fibrina en la superficie de los estafilococos alterando quizá su ingestión por las células fagocitarias o su destrucción una vez dentro de tales células (31).

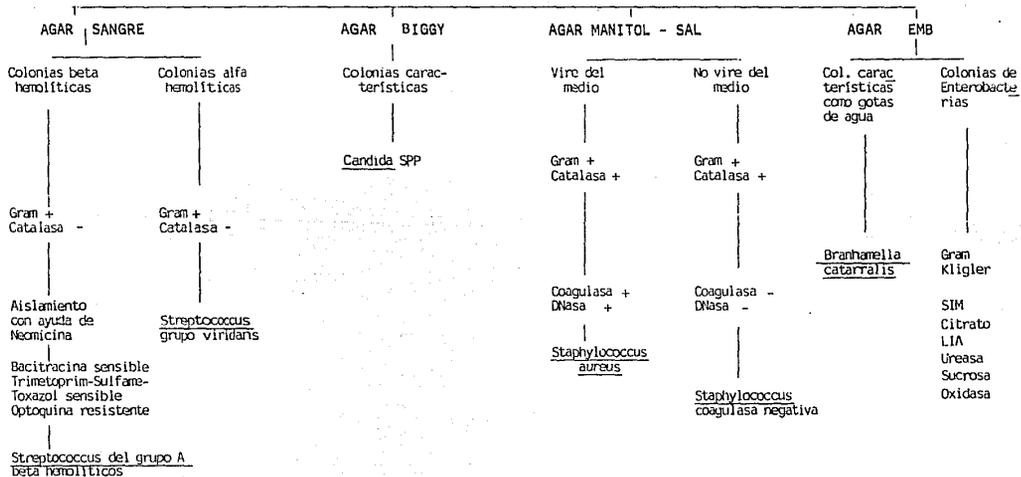
Otras sustancias extracelulares producidas por los estafilococos -- son: una hialuronidasa o factor de propagación, una estafilocinasa que -- da por resultado fibrinólisis y que actúa mucho más lentamente que la est -- treptocinasa; proteinasa, lipasas diversas y una toxina exfoliativa que -- produce el síndrome de la " Piel escaldada " (22).

Es muy importante el problema terapéutico planteado por los estafilo -- cocos resistentes a los medicamentos. Es esencial determinar la sensibili -- dad del germen infectante a los medicamentos disponibles antes de iniciar -- el tratamiento debido a que, principalmente en los hospitales, predominan -- los estafilococos resistentes a una o más sustancias antibacterianas -- (32).

Las cepas productoras de penicilina son resistentes a las penicilinas de uso común en los cuadros básicos de los principales centros de salud. -- pero pueden resultar susceptibles a los derivados semisintéticos de la pe -- nicilina, que no son hidrolizados por la enzima (22).

ESQUEMA DE TRABAJO

MUESTRA



RESUMEN

Se realizó un estudio durante un período de seis meses, en los cuales fueron recolectadas 645 muestras de exudados faringeos de pacientes que acudieron al Hospital 1º de Octubre del I.S.S.S.T.E. De dichas muestras se obtuvieron 66 aislamientos de Streptococcus beta hemolíticos del grupo A y 223 aislamientos de Staphylococcus aureus.

Con respecto a la indentificación del Streptococcus beta hemolítico del grupo A se comprobó que las condiciones de incubación para un mejor aislamiento y observación de la hemólisis beta fueron dadas por el sistema Gas Pak (90% nitrógeno, 10% CO₂) y por las picaduras hechas en el agar sangre (microanaerobiosis), al compararlo con las condiciones de aerobiosis y velobiosis. La prueba de indentificación de estreptococos utilizando el disco de trimetoprim-sulfametoxazol (23.75 mg y 1.25 mg) ofreció resultados semejantes a los obtenidos con discos de bacitracina.

La IDENTIFICACION DEL Staphylococcus aureus se realizó comparando las pruebas de coagulasa y DNasa, ofreciendo ambas resultados similares. Se observó también que el Staphylococcus aureus produce una beta hemólisis en forma de hato redondo, en condiciones anaeróbicas y con picaduras en el agar sangre.

En las muestras de exudados faringeos también fueron aislados otros géneros de microorganismos como enterobacterias, Candida albicans, Streptococcus del grupo viridans y Staphylococcus epidermidis.

Finalmente se confirma la superioridad de la incubación anaeróbica para la detección de Streptococcus del grupo A.

OBJETIVOS

Identificación de Streptococcus del grupo A beta hemolíticos (Identificación no serológica) y de Staphylococcus aureus (coagulasa positiva) a partir de exudados faríngeos en el Laboratorio Clínico del Hospital 1º de Octubre del I.S.S.S.T.E. Analizando su frecuencia.

Determinar la presencia de beta hemólisis, producida por Streptococcus del grupo A beta hemolíticos, variando las condiciones de incubación desde el primer aislamiento.

MATERIAL Y METODOS

Las muestras de exudados faringeos incluidas en este estudio fueron recolectadas en un período de seis meses, de los pacientes que acudieron al Laboratorio Clínico del Hospital 1º de Octubre del I.S.S.S.T.E.

Durante el período de seis meses fueron procesadas 645 muestras de exudados faringeos provenientes de pacientes con sintomatología de infección en faringe. Los cultivos de las muestras inoculadas sobre las placas de agar sangre en el primer trimestre de dicho período se trabajaron bajo condiciones aeróbicas de incubación y los métodos de identificación empleados durante este lapso de tiempo fueron los utilizados convencionalmente en el laboratorio clínico del Hospital 1º de Octubre. En el segundo trimestre, las placas de agar sangre inoculadas con los exudados faringeos fueron procesadas bajo tres condiciones de incubación: Velobiosis (4% de CO₂), Jarra de Gas Pak (10% CO₂), 90% NO₃) y Aerobiosis. Para la identificación de Streptococcus beta-hemolíticos del grupo A se utilizaron en forma adicional las pruebas de Bacitracina y Trimetoprim-Sulfametoxazol, así como las pruebas de DNasa y Coagulasa para la caracterización del Staphylococcus aureus.

Material

- Biológico: muestras de exudados faringeos obtenidos de pacientes con faringitis.
- Material de vidrieria indispensable en un Laboratorio Clínico.
- microscopio compuesto.
- Incubadora.
- Sistema de GasPak.
- Sistema de Velobiosis (baja tensión de oxígeno producida por una vela)

- Asas de inoculación.
- Hisopos esteriles.
- Abatelenguas esteriles.
- Equipo para tinción de Gram.

Reactivos y Medios de Cultivo.

- Agar Sangre. Bioxon de México.
 - Agar Sal-Manitol. Bioxon de México.
 - Agar Trypticosa - Soya. Bioxon de México.
 - Agar Eosina - Azul de Metileno. Bioxon de México.
 - Agar de Biggy Nickerson. Bioxon de México.
 - Medios para Bioquímicas. Bioxon de México.
 - Agua destilada.
 - Plasma humano.
 - Agar DNasa.
 - Aceite de Inmersión.
 - Etanol Absoluto. MERCK.
 - Peróxido de Hidrógeno al 30% MERCK.
 - Discos de Bacitracina, de 0.02 a 0.04 unidades.
 - Discos de Trimetoprim-Sulfametoxazol, (1.25-23.5 mg).
 - Discos de Optoquina.
- (Todos los discos para identificación son, de los Lab. Div. Bevon Dici
Prison & Co. U. S. A.)
- = Sensidiscos de Neomicina. Bioxon de México.

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus del grupo A</i>	<i>Streptococcus No grupo A</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Gram	+	+	+	+	+
Agrupación	cocos en racimos	cocos en racimos	cocos en pares	cocos en pares	cocos en pares
Coagulasa	+	-	-	-	-
Fermentación del Manitol	+	-	-	-	-
DNasa	+	-	-	-	-
Homólisis Beta	+	-	+	+	-
Bacitracina	-	-	+	-	-
Optoquina	-	-	-	-	+

CUADRO " a " Pruebas para la identificación de los géneros y especies

Streptococcus y Staphylococcus (32)

- AGAR SANGRE

El agar sangre es un medio de cultivo enriquecido que se utiliza para el desarrollo de los microorganismos de difícil crecimiento, también se usa para detectar la actividad hemolítica.

Método

Con el hisopo se hizo una impronta en la parte superior de las tres cajas de agar sangre y con el asa de inoculación se procedió a estriar con la técnica de dilución de colonias, posteriormente se practicaron varias punciones en el medio en un ángulo de 45°, también utilizando el asa, a fin de hacer penetrar algunas bacterias por debajo de la superficie del agar donde prevalece una baja tensión de oxígeno.

Una de las cajas fue incubada a 37 °C por 24 horas en aerobiosis, la segunda caja se incubó a 37 °C por 48 horas en condiciones de CO₂, dadas por el sistema de GasPak, y la tercera a 37 °C por 24 horas en condiciones de CO₂ dadas por el sistema de baja tensión de oxígeno producida por una vela (21, 33).

Nota: Como una ayuda para el aislamiento del *Streptococcus* del grupo A beta-hemolítico, se utilizó neomicina en forma de sensibilizadores, colocados en el agar inoculado, de modo que se inhibieran las bacterias sensibles de dicho antibiótico y no los *Streptococcus*, los cuales son resistentes a la neomicina (35).

- AGAR DE BIGGY NICKERSON.

El agar de glicina, glucosa, levadura y sulfato de bismuto fue descrito por Nickerson en 1953, en su estudio de reducción del sulfuro por especies de *Candida*. El medio es útil para el aislamiento y la identifica -

ción presuntiva de Candida SPP por medio de la reacción del sulfuro (22)

- AGAR EOSINA AZUL DE METILENO (EMB).

El agar Eosina-Azul de Metileno es un medio diferencial que utiliza pa
ra aislar enterobacterias o bacilos coliformes.

Los colorantes de anilina (eosina y azul de metileno) inhiben a las
bacterias gram positivas y a las gram negativas exigentes. También se --
combinan precipitando a pH ácido actuando como indicadores de producción -
de ácidos. (21).

- AGAR SAL-MANITOL.

El agar sal y manitol es un medio selectivo para el aislamiento de es-
tafilococos patógenos. El alto contenido salino proporciona una inhibi -
ción selectiva y el rojo de fenol pone de manifiesto la fermentación del -
manitol. Las placas se pueden inocular densamente dado el poder de inhibi
ción de la sal. Generalmente se incuban 24 horas, al final de las cuales-
las colonias de micrococcos aparacen pequeñas y rodeadas por zonas rojas o
púrpuras, en tanto que los organismos patógenos fermentadores del manitol-
tienen zonas amarillas (21).

Para la identificación de las especies de los géneros Staphylococcus y
Streptococcus fueron empleadas las siguientes determinaciones: tinción -
de Gram, catalasa, coagulasa, fermentación del manitol, DNasa, Bacitraci--
na, Trimetoprim-Sulfametoxazol y Optoquina (2).

- CATALASA.

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aero --
bias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, la excepción prin-
cipal es el género Streptococcus. La catalasa es una enzima que descompo-
ne el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Químicamente la --

catalasa es una hemoproteína, de estructura similar a la de la hemoglobina excepto que los cuatro átomos de hierro de la molécula se encuentran en -- estado oxidado (Fe^{+++}) en lugar de reducido. La mayoría de las bacte -- rias anaerobias descomponen el H_2O_2 con peroxidásas semejantes a la catala sa, salvo que cada molécula contiene un ión férrico.

El peróxido de hidrógeno se forma como un producto final oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares. La flavoproteína reducida --- reacciona directamente con el oxígeno gaseoso por medio de la reducción de electrones para formar peróxido de hidrógeno, y no por acción directa en -- tra el hidrógeno y el oxígeno moluculares.

Reactivo. Peróxido de hidrógeno al 30%.

Método:

*Prueba en portaobjetos.

- Con una aguja de punción transferir células del centro de una colo-- nia bien aislada a la superficie de un portaobjetos.
 - Añadir dos gotas o más de peróxido de hidrógeno (no invertir el or-- den de los reactantes).
 - La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o -- efervescencia, indica una reacción positiva. (12, 21, 33).
- BACITRACINA.

En 1953, Maxted observo que Streptococcus del grupo A eran más sensi -- bles que los demás beta hemolíticos a un rango determinado de concentra -- ción de Bacitracina (0.02 a 0.04 unidades). Hoy día, el uso del disco -- de bacitracina es el método que más se emplea en laboratorios clínicos pa -- ra una identificación de los Streptococcus del grupo A. En general se ha -- comprobado que los resultados de la prueba concuerdan con la clasificación serológica; sin embargo, aunque el disco de bacitracina identifica al ---

99.5% de cepas del grupo A, existe una porción estimada entre el 5 y el -- 15% de otros estreptococos sensibles a la bacitracina, aislada de fuentes - clínicas que pueden pertenecer a grupos distintos al A.

La bacitracina inhibe la síntesis del mucopéptido que forma la pared - celular bacteriana, a partir del nucleótido de Park, que se acumula en su - interior; al impedir la formación de la pared celular, hace a la bacteria - osmóticamente sensible a la lisis.

Material: Discos de Bacitracina (0.02-0.04 unidades).

Método:

- Con una pinza pasada por la flama, retirar un disco de bacitracina - y aplicarlo al centro de la placa de agar sangre previamente incocu- lada.
- Aplicar una suave presión al disco para que se adhiera a la superfi- cie de la placa, sin hundirlo en el medio.
- Colocar una gota de agua destilada estéril. La humedad hace que la- bacitracina se difunda más rápidamente en el medio.
- Se incubaron a 37 °C por 48 horas bajo el sistema Gas Pak.

Interpretación: Se tomó como prueba positiva cualquier tamaño de zona- de inhibición. La ausencia de zona de inhibición (crecimiento hasta la orilla misma del disco) se interpretó como resistente (2, 21, 12).

- TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL

Los Streptococcus beta hemolíticos del grupo A y B muestran un patrón - de resistencia cuando se les hace crecer con un disco que contiene 1.25 mg de Trimetoprim y 23.75 mg de Sulfamexazol; por su parte, la mayo - ría de las cepas de los grupo C, F y G son susceptibles. Estos antimicrobianos actúan a distintos niveles en el metabolismo de los folatos - produciendo un sinergismo su combinación ya que actúan inhibiendo ---

a las enzimas que intervienen en éste, impidiendo de esta manera la síntesis de purinas y pirimidinas, constituyentes esenciales de los Ac. nucleicos indispensables para el crecimiento bacteriano.

Método:

- Aplicar asépticamente el disco de antibiótico sobre la superficie del agar tripticosa soya, previamente inoculado.
- Hacer una presión suave sobre el disco para que se adhiera a la superficie de la placa.
- Interpretación: Una zona clara de inhibición del desarrollo alrededor del disco fue considerada como un resultado positivo para la sensibilidad a tales antimicrobianos (9, 17, 34, 37, 41).
- COAGULASA

La coagulasa es una enzima proteica de composición química desconocida, con actividad semejante a la protrombina, capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible en un sistema analítico adecuado. Se cree que la coagulasa funciona in vivo produciendo una barrera en el sitio de la infección estafilocócica. En el laboratorio la prueba de coagulasa se utiliza comúnmente para diferenciar la especie de Staphylococcus aureus de otras especies del género Staphylococcus (estafilococos coagulasa negativa).

La coagulasa libre extracelular, reacciona con el factor plasmático o el factor reactivo de la coagulasa (FRC) para formar una sustancia similar pero no idéntica a la trombina, actuando indirectamente para convertir el fibrinógeno en fibrina. Durante la coagulación, péptidos similares son liberados del fibrinógeno y del principio coagulasa-FRC. La diferencia principal es que el factor reactivo de la coagulasa no necesita ----

crecimiento. Negativo, la zona alrededor es opaca. (15, 17, 24).

- OPTOQUINA

Se usa específicamente el disco de optoquina para diferenciar entre -- el Streptococcus pneumoniae (sensible) y otras especies de Streptococcus- alfa (resistentes).

La optoquina es un compuesto químico, clorhidrato de etilhidrocupreína. La etilhidrocupreína, que forma la base del disco de optoquina es insoluble en agua, pero el clorhidrato de etilhidrocupreína (optoquina) es completamente soluble en agua. El clorhidrato de etilhidrocupreína es un derivado del alcaloide hidroquina.

Material: Discos de optoquina.

Método:

- A partir de un cultivo puro estriar todo la placa de agar sangre en - cuatro direcciones con ayuda de un hisopo.
- Colocar asépticamente el disco de optoquina.
- Incubar.

Interpretación: sensible, hay inhibición del crecimiento al rededor del disco. Resistente, crecimiento no inhibido alrededor del disco. (16,12,31).

RESULTADOS

Los organismos identificados en el total de las muestras procesadas -- en los seis meses de trabajo se encuentran resumidos en el cuadro 1. El -- porcentaje más alto de la población de gérmenes estuvo comprendida por cocos gram positivos, seguidos por bacterias gram negativas, enterobacterias y levaduras. Dentro del grupo de bacterias gram positivas las especies -- predominantes fueron Streptococcus del grupo viridans (30.65%), --- Staphylococcus epidermis (14.8%) y Staphylococcus aureus (14.1%). Los organismos gram negativos tuvieron como representante principal a la -- Branhanella catarralis (23%); el grupo de enterobacterias estuvo presente con un 6.25% y las levaduras Candida albicans alcanzaron un 6.1%.

En el cuadro número 2 se encuentran representados el número de aislamientos de los microorganismos pertenecientes a los géneros Streptococcus - y Staphylococcus identificados durante los dos trimestres de trabajo, observandose para la mayoría un incremento durante el segundo trimestre del período de trabajo, es evidente durante los seis meses de estudio el mayor número de aislamientos obtenidos para los organismos identificados como - Staphylococcus aureus sobre el porcentaje obtenido para los microorganismos caracterizados como Streptococcus el grupo A beta-hemolíticos.

Como una observación adicional se comparo la frecuencia de aislamientos de los géneros Staphylococcus y Streptococcus en base al sexo de -- los pacientes y no se observó ninguna tendencia en alguno de los microorganismos por un sexo en particular (Cuadro 3).

Las diferentes condiciones de incubación de las placas de agar sangre - dieron como resultado a su vez diferencias en los resultados de organismos hemolíticos, como se puede apreciar en el cuadro 5 el sistema de GasPak -

permitio detectar mayor cantidad de Streptococcus beta-hemolíticos que -- las cantidades obtenidas con los otros dos sistemas (velobiosis y aerobiosis).

Para los Streptococcus se siguió un sistema de identificación en el cual se trabajaron cinco pruebas (Cuadro 5), éstas fueron realizadas sobre los aislamientos obtenidos bajo las condiciones de anaerobiosis dadas por la Jarra de GasPak. Bajo estas condiciones el crecimiento de este género de microorganismos fue abundante y mejor apreciables los resultados de las pruebas de identificación, en contraste al pobre o nulo desarrollo bajo condiciones de aerobiosis. De esta forma se identificaron los Streptococcus como pertenecientes o no al grupo A. La identificación de otros grupos dentro de este género no se realizó debido a la carencia de materia para tal efecto.

En los 457 microorganismos identificados como pertenecientes al género Staphylococcus, 223 se caracterizaron como Staphylococcus aureus y 234 se caracterizaron como Staphylococcus coagulasa negativa. Las pruebas utilizadas para la caracterización del S. aureus durante el segundo trimestre se presentan en el cuadro 6, donde se aprecia que las pruebas de DNasa y Fermentación del manitol ofrecieron resultados positivos para dos cepas de Staphylococcus coagulasa negativa..

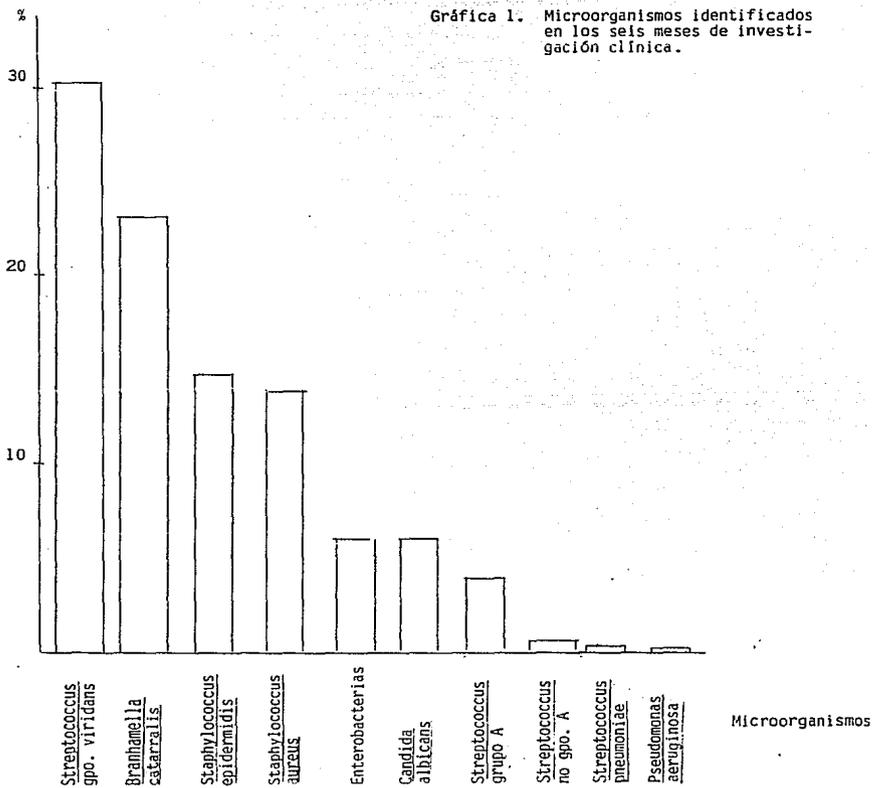
Cuadro 1

Recopilación de los aislamientos obtenidos en los seis meses de investigación clínica efectuada en el Hospital 1º de Octubre del I.S.S.S.T.E.

ORGANISMO	AISLAMIENTOS	PORCENTAJE
<u>Streptococcus</u> Gpo. viridans	485	30.65
<u>Streptococcus</u> No Gpo A*	8	0.50
<u>Streptococcus</u> del Gpo. A	66	4.17
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	2	0.12
<u>Staphylococcus aureus</u>	223	14.12
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	234	14.80
<u>Branhamella catarralis</u>	364	23
Enterobacterias	99	6.25
<u>Arizona</u> spp.	1	0.06
<u>Pseudomonas</u> spp.	2	0.12
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	2	0.12
<u>Candida albicans</u>	97	6.16
Total	1682	100%

No Gpo. A. = No perteneciente al Grupo A.

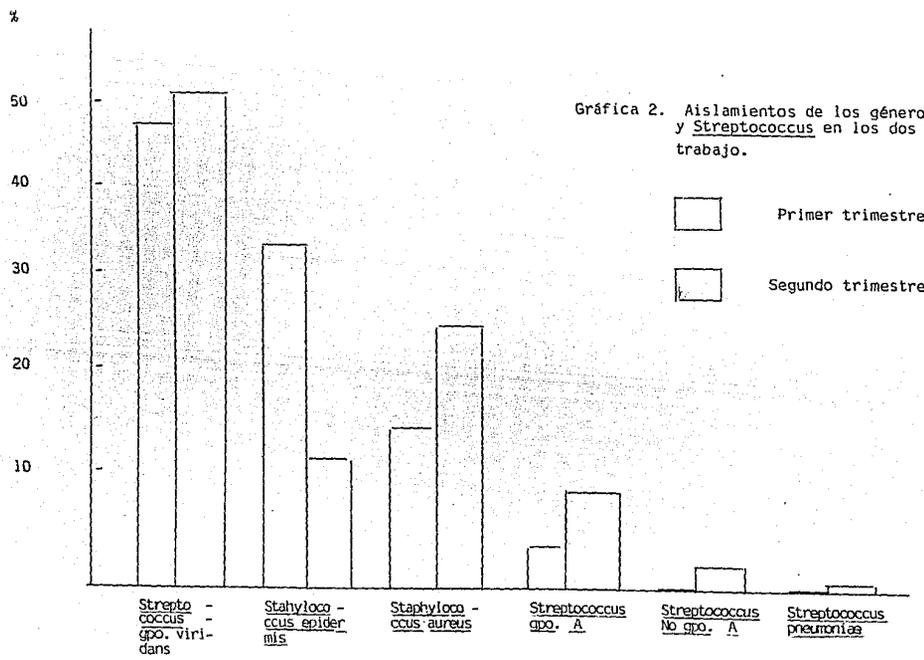
Gráfica 1. Microorganismos identificados en los seis meses de investigación clínica.



Cuadro 2

Aislamientos de los géneros Staphylococcus y Streptococcus en los dos trimestres de trabajo.

MICROORGANISMOS	Trimestre: Número de aislamientos (%)	
	PRIMERO	SEGUNDO
<u>Streptococcus</u> del grupo A	16 (3.38)	50 (9.15)
<u>Streptococcus</u> No grupo A	0	8 (1.46)
<u>Streptococcus</u> gpo. viridans	217 (45.9)	268 (49.0)
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	0	2 (0.36)
<u>Staphylococcus aureus</u>	72 (15.2)	151 (27.6)
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	167 (35.3)	67 (12.2)
T O T A L	472 (100)	546 (100)



Gráfica 2. Aislamientos de los géneros Staphylococcus y Streptococcus en los dos trimestres de trabajo.

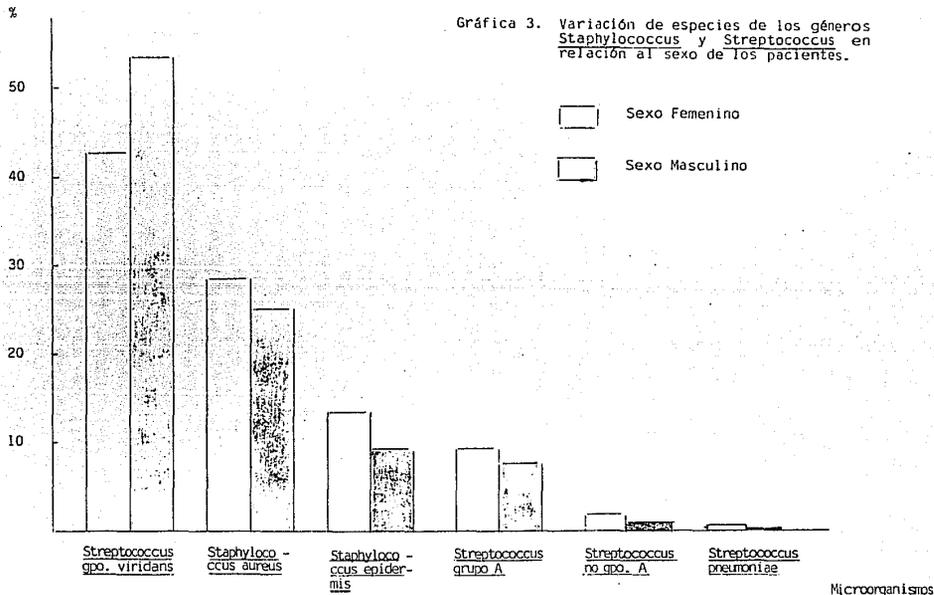
Primer trimestre
 Segundo trimestre

Microorganismos

Cuadro 3

Variación de especies de los géneros Staphylococcus y Streptococcus en relación al sexo de los pacientes.

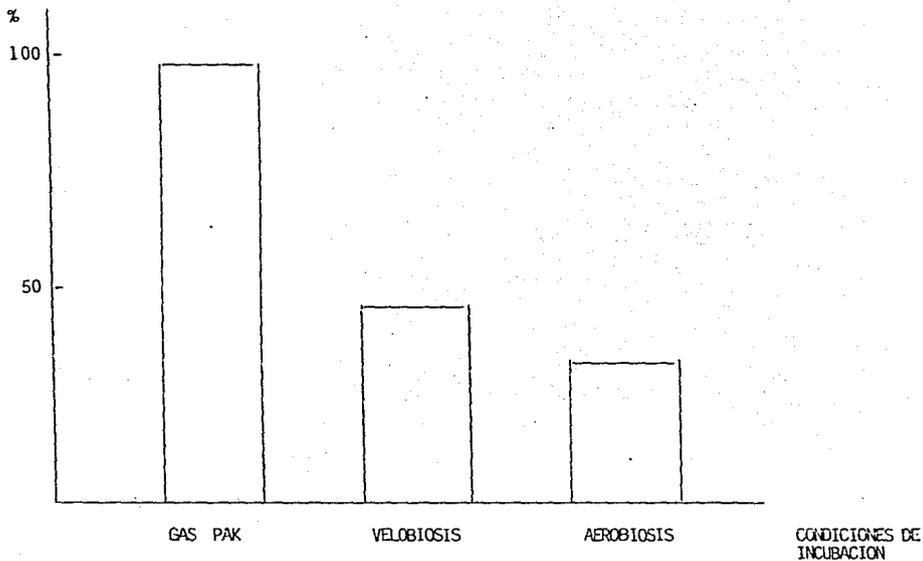
MICROORGANISMO	SEXO: Número de aislamientos (%)	
	FEMENINO	MASCULINO
<u>Streptococcus</u> del grupo A	26 (10.4)	24 (8.10)
<u>Streptococcus</u> no grupo A	5 (2.0)	3 (1.01)
<u>Streptococcus</u> gpo. viridans	108 (43.2)	160 (54.0)
<u>Streptococcus</u> <u>pneumoniae</u>	2 (0.8)	0
<u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>	74 (29.6)	77 (26.0)
<u>Staphylococcus</u> <u>epidermidis</u>	35 (14.0)	32 (10.8)
T O T A L	250 (100)	296 (100)



Cuadro 4

Porcentaje de Streptococcus del grupo A beta-hemolíticos aislados en agar sangre, incubados en diferentes condiciones atmosféricas.

Condiciones de Incubación	Frecuencia	Porcentaje
AEROBIOSIS	16	32
VELOBIOSIS	23	46
GASPAK	50	100



Gráfica 4. Porcentaje de aislamientos de Streptococcus beta-hemolíticos del grupo A en las tres condiciones de incubación.

Cuadro 5

Aislamientos de microorganismos del género Streptococcus identifi-
cados por su sensibilidad, hemólisis y producción de catalasa.

PRUEBAS	MICROORGANISMOS: (Número de Aislamientos)			
	<u>Streptococcus</u> grupo A	<u>Streptococcus</u> No grupo A	<u>Streptococcus</u> <u>pneumoniae</u>	<u>Streptococcus</u> gpo. viridans
	(50)	(8)	(2)	(268)
BACITRACINA	S*	R*	R	S
SULFAMETOXAZOL- TRIMETOPRIM	S	S	R	R
OPTOQUINA	R	R	S	R
CATALASA	+	+	+	+
HEMOLISIS	BETA	BETA	ALFA	ALFA

* S: Sensible R: Resistente

Cuadro 6

Aislamientos de estafilococos aerobios identificados en el laboratorio clínico de 347 exudados faringeos recolectados en tres meses.

PRUEBA	Microorganismos: Número de aislamientos			
	<u>Staphylococcus aureus</u> 148	<u>aureus</u> 3	<u>Staphylococcus</u> 65	<u>Coagulasa negativa</u> 2
COAGULASA	+	+	-	-
DNasa	+	-	-	-
Fermen. del Manitol	+	+	-	+
Catalasa	+	+	+	+

DISCUSION

Dentro del objetivo general del presente estudio estaba el de determinar la frecuencia de aislamientos del Staphylococcus aureus y el Streptococcus beta hemolítico del grupo A en cultivos de muestras faringicas, lo cual fue claramente observado en los resultados obtenidos donde se encontró una frecuencia mayor para el Staphylococcus aureus.

Fue muy notable la gran cantidad de aislamientos de Streptococcus coagulasa negativa los cuales en forma común se consideran como parte de la flora normal de la faringe, pero su elevado porcentaje de aislamientos en pacientes sintomaticos pueden en un momento dado hacernos pensar que tomen un papel de patógenos oportunistas aunque esto debe ser considerado cuidadosamente dado que para poder seguir ese criterio se deben considerar diversos factores, como son el cuadro clínico del paciente, la presencia de deficiencias nutricionales, traumatismos, inmunodeficiencia, diabetes, infecciones previas por otros microorganismos, etc. Este criterio de patógenos oportunistas junto con sus consideraciones, también se aplica a las enterobacterias y levaduras. La Branhamella catarralis es considerada como flora normal en la faringe y por lo tanto no se le confiere importancia clínica a su hallazgo.

En algunas ocasiones, el elevado número de Streptococcus del grupo viridans en el cultivo de este tipo de muestras puede "obscurecer" u ocultar el desarrollo de otros microorganismos (32) como es el caso del Streptococcus pneumoniae, que en este trabajo fue aislado en un muy bajo porcentaje y quizás se haya debido a dicho fenómeno. Esto no es aplicable al Streptococcus beta hemolítico, dado que la presencia de estreptococos del grupo viridans no interfiere en ninguna forma en su desarrollo o aislamiento (31, 32).

De las tres atmósferas de incubación empleadas para el aislamiento de los estreptococos beta hemolíticos, la atmósfera anaeróbica obtenida con el sistema GAs Pak (10% CO₂, 90% NO₃) fue la que ofreció un mayor porcentaje de aislamientos de dichos microorganismos, estos resultados están de acuerdo con los reportados en la literatura (1, 2, 5, 8, 9, 14). En tales condiciones de incubación, la tensión reducida de oxígeno obtenida por las picaduras realizadas en el agar sangre y la anaerobiosis suministrada por el sistema Gas Pak, promueven la hemólisis de los estreptococos por la protección de la hemolisina oxígeno-labil, y a la vez dicha anaerobiosis suprime el desarrollo de la flora comensal aeróbica que pudiera antagonizar el crecimiento de los estreptococos (1, 2, 9, 14).

El uso de un disco de sensibilidad de Trimetoprim-Sulfametoxazol para la identificación de Streptococcus del grupo A ofreció resultados similares a los obtenidos con el disco de Bacitracina. Tales resultados aunque no son concluyentes y necesitan de estudios posteriores, concuerdan con los reportados por algunos autores (1, 30). En algunos cultivos, la prueba de bacitracina se realizó en el primo aislamiento, pero el desarrollo de otros géneros bacterianos diferentes del Streptococcus, ocultaba el resultado de la misma; aunque algunos autores apoyan el uso del primer aislamiento para esta prueba (1, 34), por la razón antes descrita la prueba fue desarrollada en el cultivo puro obtenido en condiciones aneróbicas donde el resultado se observaba claramente.

Para la identificación del Staphylococcus aureus las pruebas de DNasa y coagulasa ofrecieron resultados similares, aunque con una pequeña variación, en la cual tres estafilococos coagulasa positiva tuvieron un resultado negativo para la prueba de DNasa. Aunque varios autores (18, 10, 34, 31) recomiendan las pruebas de term nucleasa o coagulasa para la iden

tificación definitiva del Staphylococcus aureus. Los resultados aquí observados nos hablan también de la aplicabilidad de la prueba de DNasa para dicho objetivo aunque conviene adicionar a ésta otras pruebas para una mayor seguridad en la identificación de dicho microorganismo.

El cultivo de exudados faringeos bajo las condiciones del sistema GasPak, tiene la ventaja de impedir el desarrollo de algunos microorganismos que interfieren con la identificación de estreptococos del grupo A, a diferencia del cultivo en condiciones aeróbicas, donde organismos frecuentemente encontrados en este tipo de muestras, como por ejemplo la Candida spp y algunas enterobacterias, crecen fácilmente "ocultando" al estreptococo beta hemolítico, inhibiendo la producción de la beta-hemólisis e impidiendo su detección.

La atmósfera del sistema GasPak permite la actividad de las hemólisinas oxígeno-lábiles del estreptococo y a su vez conserva el agar sangre, o disminuye su deterioro durante la incubación, haciendo más visible el desarrollo colonial y la hemólisis producida. Este óptimo desarrollo bajo dichas condiciones promueve que las pruebas de identificación para estreptococos que se realizan directamente sobre el desarrollo en la placa (sensibilidad a la bacitracina y al trimetoprim-sulfametoxazol) sean más claramente apreciadas.

La tensión reducida de oxígeno que proporciona el método de incubación por velobiosis no produjo resultados tan satisfactorios para el aislamiento de Streptococcus del grupo A beta-hemolíticos como los producidos por el sistema GasPak.

Resumiendo, se puede afirmar que el sistema GasPak es el método de elección para la detección y aislamiento de estreptococos beta hemolíticos

sobre los métodos de incubación aeróbica y baja tensión de oxígeno producida por una vela (Velobiosis) que en forma frecuente también se utilizan.

En cuanto al Staphylococcus aureus, es bien conocido que existen medios selectivos para su crecimiento, en este trabajo se observó que en ocasiones este microorganismo no se desarrollaba sobre el agar sal-manitol. Bajo las condiciones obtenidas con el sistema de GasPak, el desarrollo sobre agar sangre fue adecuado y en algunos casos con producción de beta - hemólisis, lo cual abre nuevas posibilidades de investigación sobre el - aislamiento e identificación del Staphylococcus aureus.

CONCLUSIONES

- Fue encontrada una mayor frecuencia de Staphylococcus aureus que de Streptococcus beta hemolíticos del grupo A en muestras de exudados faríngeos.
- Se logró aislar mayor cantidad de Streptococcus del grupo A beta hemolíticos con el sistema de anaerobiosis de Gas Pak que con el -- sistema de velobiosis o en condiciones aeróbicas.
- La hemólisis fue más clara y en ocasiones solamente observada en -- condiciones anaeróbicas dadas por el sistema de Gas Pak.
- El hecho de haber colocado el disco de bacitracina, el disco de Tri metoprim-Sulfametoxazol y finalmente el de optoquina, en una caja de agar con el cultivo puro del microorganismo sospechoso de ser - Streptococcus del grupo A nos proporcionó una mejor identifica - ción que cuando solo se utilizó el disco de bacitracina. También -- se pudo observar que en cultivos puros las pruebas tuvieron mejor - lectura que en cultivos no puros debido a que algunas enterobacte - rias y estafilococos interfieren con éstas dando falsos positivos o negativos.
- Un diagnóstico acertado y rápido de la presencia del Staphyloco -- ccus aureus se logra haciendo simultáneamente las pruebas de Coagu - lasa y DNasa, se comprobó que dan resultados semejantes.
- En incubación anaeróbica, la picadura del agar permite una mejor ex - presión de la beta hemólisis de los Streptococcus del grupo A.

- Los resultados de la prueba de bacitracina son mejor apreciados bajo las condiciones de anaerobiosis dadas por el sistema Gas Pak debido a que se inhibe el desarrollo de organismos que pueden alterar el resultado de esta prueba.

BIBLIOGRAFIA

1. BAKER JOHN S. Comparison of Various Methods for Differentiation-- of Staphylococci and Micrococci. J. Clin. Microbiol. 1984 -- 19: 875-879.
2. BELLI C. DOMINIQUE, PIERRE E. FERRIER, THRONT. Cultures for ---- Group A Beta-Hemolytic Streptococcus. A.J.D.C. 1984, 138: 274-- 276.
3. BREESE B.B., DISNEY F.A. The Accuracy of Diagnosis of Beta -- Streptococcal Infections on Clinical Grounds. J. Pediatrics --- 1984, 44: 670-672.
4. BUCHANAN R.E., GIBBONS N.E. Bergey's Manual of Determinative Bac-- teriology. Williams & Wilkins, 8th edition, Baltimore U.S.A. --- 1974. pág. 478-489.
5. CHRISTENSEN PAUL, DANIELSSON DAN, HOVELIUS BRIGITTA AND MIELLANDER JAN. Preliminary Identification of Beta-Hemolytic Streptococci in Throat Swab Cultures with a Commercial Blood Agar Slide. J. Clin. Microbiol. 1982, 15: 981-983.
6. CHRISTENSEN PAUL, HAEGER-ARONSEN BRIGITTA, KAMME KARL, NILSON I. - NILS AND WELINDER HANS. Staphylococcus aureus in the Throat: A -- Saprophyte or a Pathogen? Scand. J. Infect. Dis. 1977, 9: 27- 30.
7. COLMAN C. & BALL L. Identification of Streptococci in a Medical -- Laboratory. J. Appl. Bacter. 1984, 57: 1-14.
8. DAVIDSONH I. HENRY J.B. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio Sex-- ta edición, Salvat editores, Barcelona 1983.
9. DUKSTRA MARK A., MELAUGHLIN C. JAMES, AND BARTLETT C. RAYMOND. -- Comparison of Media and Techniques for Detection of Group A Strep -- tococci in Throat Swab Specimens. J. Clin. Microbiol. 1979. 98: - 236-238.
10. ESSERS LUDWIG AND RADEBOLD KLAUS. Rapid and Reliable Identification of Staphylococcus aureus by Latex Agglutination Test. J. Clin --- Microbiol. 1980, 12: 641-643.
11. FACKLAM R. RICHARD. Aislamiento e Identificación de Estreptococos, - Manual de Procedimientos. U.S. Department of Health, Education -- and Welfare/Public Health Service/Center for Disease Control, Atlan-- ta Georgia.
12. FACKLAM R. RICHARD, et al. Presumptive Identification of Groups A, - B, and D Streptococci. Appl. Microbiol 1974, 27: 107-113.

13. FACKLAM R.R., PAULA J.F., WORTHAM E.C., COOKSEY R.C. AND ROUN TREE - H.A. Presumptive Identification of Group A, B, and D Streptococci on agar Plate Media. J. Clin. Microbiol. 1979, 9: 665-672.
14. GRAY young G, Wittons Microbiology. Tercera edición, ed. C.E.C.S.A.- 1982.
15. GIONO CERESO S. Prueba de Kirby-Baver para sensibilidad a los Anti microbianos. Infectología. 1983, 7: 323-351.
16. GOLDSCHIEDER I. et al. Immunogenicity of Group A and Group C --- Meningococco Polysaccharides. J. Infectc. 1972, 125: 50_g/.
17. GOLKSTEIN JACK AND ROBERTS W. JOHN. Microtube Coagulase Positive - Staphylococci. J. Clin Microbiol. 1982, 15: 848-851.
18. GUNN B.A. Streptococci in Throat Cultures. J. Clin Microbiol. --- 1976, 4: 192-194.
19. Knight R.G., AND SHLORES D.M. Rapid Identification of Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae from Blood Cultures. 1983, -- 19: 97-99.
20. KONEMAN E.W., ALLEN S.D., DAWELL V.R., SOMMERS M.M. Diagnóstico -- Microbiológico. 1a. edición editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 1983.
21. KRUPP A. MARCUS, TURNEY M. LAWRENCE. Manual de Diagnóstico Clínico- y de Laboratorio. 8a. edición. Ed, El Manual Moderno. México, -- 1986.
22. Kurzynski T. MEISE C., DAGGS R., AND HELSTAD A. IMPROVED REALIBILITY of the Primary Plate Bacitracin Test on Throat Cultures with Sulfame thoxazole-Trimethoprim Blood Agar Plates. J. Clin. Microbiol. 1979, 9: 144-146.
23. LAVER A. BRIAN, RELLER L. BARTH, AND MIRRETT S. Effect of Atmos --- phere and Duration of Incubation on Primary Insolation fo Group A - Streptococci: from Throat Cultures. J. Clin Microbiol. 1983, --- 17: 338-340.
24. LENNETTE E.H., BALOWS A., HAUSLER W.J., TRUANT J.P. Manual de Micro biología Clínica. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Ar - gentina, 3a. edición, 1982.
25. LITTER M. Farmacología Experimental y Clínica. 6a edición 1980, - ed. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1980.
26. Lyerli H. William Jr., LIEUTENANT M., BAS W. JAMES., AND COLONEL M.- C. Identification of Group A Streptococci with Bacitracin Disc on the Primary Throat Culture Plate. J. Pediatrics. 1980, 96: 431 - 433.
27. MAC FADDIN J.F., Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacte rias de Importancia Clínica. Ed. Médica Panamericana. México 1984.

29. MURRAY R. PATRICK, WOLD D.A., HALL M., Bacitracin Differentiation - from Presumptive Identification of Group A beta-Hemolytic Streptococci. Comparison of primary and purified Plate Testing. J. Pediatrics. 1976, 89: 576-579.
30. MUSHER D.M. et al. Infections Dueto Staphylococcus aureus. J. Med. 1972, 56: 383-386.
31. Pelezar J. Michael, Jr. Elementos de Microbiología. 1a. edición, Ed. Mc Grawhill México 1984.
32. PICHANDO R. EFREN A., Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos. Infectología. 1982, 3: 215-221.
33. PIEN D. FRANCIS, L. CATHY, ISSACSON S. NAONI, GOTO T. NORMA, AND RUDAY C. RAUL. Evaluation of Anaerobic Incubation for Recovery of Group A Streptococci from Throat Cultures. J. Clin Microbiol. -- 1979, 10: 392-393.
35. RANDOLPH F. MARTIN. REDYS J. JONH, COPE B JOHN. Evaluation of -- Aerobic and Anaerobic Methods for Recovery of Streptococci from --- Throat Cultures. J. Pediatrics 1984, 7: 256-260.
36. ROBINS R.M. BROUNE, KARSHANY A.B., AND RAMSAROOP Y.G. Detection of pneumococci in the Upper Respiratory Tract Comparison of Media and Culture Techniques. J. Clin Microbiol. 1982, 16: 1-3.
37. Ross P.W. The isolation of Streptococcus pyogenes from Throat -- from Throat Swabs. J. Med Microbiol. 1977, 10: 69-76.
38. Ruiz PALMA M.S. Pruebas para la Identificación de Estreptococos. - Infectología. 1986, 9: 373-386.
39. SHANTHOLTZER J. CAROL, PETERSON R. LANCE J. Clin Pathol. 1982 -- 77; 587-591.
40. SKINNER C. OTEN. Introduction to Diagnostic Microbiology. 1975 -- MOSBY COMPANY, U.S.A. 8th edition.
41. SLFKIN M. AND GIL M. GAIL. Rapid Biochemical Test for the Identification of Groups A, B, C, F, and G Streptococci from Throat Cultures. J. Clin Microbiol. 1983, 18: 29-32.
42. SLOLLERMAN G., Rheumatic Fever and Streptococcal Infection. Journal-Clin. Microbiol. 1978, 534-538.
43. SWITH H. The Biochemical Challenge of Microbial Pathogenicity. - J. Appl. Bacteriol. 1984, 47; 395-404.
44. WASELAUSKAS B.L., AND ELLNER P.D. Presumptive Identification of -- Bacteria from Blood Cultures in 24 hours. J. Infect. Dis. 1971, - 124: 499-504.
45. WASHINGTON J. Nutritionally Variant Streptococci. Ann. Intern. Med. 1977, 87: 793-796.

46. WILLIAM J.W., SYDNEY M.F. Bailey-Scott: Diagnóstico Microbiológico. 6a. edición 1983 Ed. Médica Panamericana.
47. YOUMANS G.R. PATTERSON P.V. SOMMERS H.M. Infectología Clínica 2a. edición 1982. Editorial Interamericana, México, D.F.
48. ZARZOUR J. AND BELLE A. E. Evaluation of Three Test Procedures for Identification of Staphylococcus aureus from Clinical Sources. J. Clin. Microbiol. 1978, 7: 133-136.