

8701127
195
29

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**“EVALUACION DE LA PRUEBA DE CAMP PARA LA
IDENTIFICACION DE Streptococcus [GRUPO B] EN DIFERENTES .
CONDICIONES ATMOSFERICAS DE INCUBACION”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MARIA ENRIQUETA ARGUELLES ALCALA

ASESOR: Q.F.B. MA. DEL SOCORRO PULIDO GARCIA

GUADALAJARA JALISCO. 1986



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.

INDICE

1.-	INTRODUCCION	1
1.1	ANTECEDENTES HISTORICOS	3
1.2	JUSTIFICACION Y OBJETIVO DEL ESTUDIO	8
2.-	GENERALIDADES	9
2.1	TAXONOMIA Y NOMENCLATURA	9
2.2	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS	10
2.2.1	MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA ANTIGENICA	10
2.2.2	CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS	15
2.2.3	METODOLOGIA PARA EL REAISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL <i>Streptococcus agalactiae</i> .	23
2.2.4	IMPORTANCIA DE LA PRUEBA DE CAMP PARA LA DIFERENCIACION DEL <i>Streptococcus agalactiae</i>	29
3.-	MATERIAL Y METODO	41
3.1	PROCEDENCIA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	41
3.2	METODOLOGIA MICROBIOLÓGICA	41
3.2.1	REAISLAMIENTO	41
3.2.2	EVALUACION DE LA PRUEBA DE CAMP EN TRES CONDICIONES ATMOSFERICAS DE INCUBACION	42
4.-	RESULTADOS	44
5.-	CONCLUSIONES	53
6.-	BIBLIOGRAFIA	55

I.- INTRODUCCION

Actualmente existe importante interés sobre la identificación y erradicación del *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* beta hemolítico grupo "B"); ya que se ha reconocido como uno de los principales agentes etiológicos de serias enfermedades neonatales e infantiles tales como meningitis, septicemia y neumonía.

Ha sido implicado como causante de varias entidades clínicas participando en la elevada morbilidad existente entre los infantes.

Los sitios en donde se encuentra comunmente el *S. agalactiae* son: vías urinarias, cervix o vagina, faringe, heridas, en vías respiratorias altas, oído externo, en la piel de infantes sanos, cordón umbilical, líquido amniótico y placenta causando infecciones en recién nacidos (sangre, líquido cefalorraquídeo).

La presencia vaginal del *S. agalactiae* es común en la mayoría de las mujeres embarazadas, frecuentemente en forma asintomática; es por este motivo que el recién nacido al momento de atravesar el tracto genital materno durante la expulsión, se contamina con esta bacteria, la cual puede producir enfermedad durante las primeras horas de vida.

Sin embargo, se reconoce al *S. agalactiae* como flora normal cervico-vaginal en mujeres no embarazadas y como reservorio favorable la región ano-rectal.

Varios investigadores han intentado determinar el grado de colonización del *Streptococcus* del grupo "B" entre la madre y su bebé. Los porcentajes de prevalencia en el tracto vaginal reportados varían desde un 4.6% a un 35.9% (2). Existe gran divergencia debido a las diferentes áreas geográficas aun que también pueden influir diferentes factores.

Entre los principales obstáculos para el estudio microbiológico de este organismo es su aislamiento e identificación en el laboratorio clínico de diagnóstico.

Una de las principales pruebas presuntivas para su identificación es la prueba de CAMP (--- Christie, R., M. E. Atkins y Munch-Petersen) basada en un factor que el *Streptococcus* del grupo "B" produce (Factor CAMP), el cual actúa sinérgicamente con la beta-lisina del *Staphylococcus aureus* en el medio de agar sangre de carnero (7).

Dicha prueba se considera positiva cuando al unirse las dos hemolisinas producen un incremento de la hemólisis manifestado por un halo en forma de punta de flecha en el medio antes mencionado.

1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

En 1874 Billroth describió a los estreptococos como organismos esféricos formando cadenas, - obteniéndolos de exudados purulentos de lesiones erisipelatosas y heridas infectadas.

Años más tarde se demostró la existencia de organismos similares obtenidos de la sangre de - una paciente con fiebre puerperal grave, fue entonces cuando se los denominó "estreptococos" (del --- griego *streptos*, que significa sinuoso, torcionado)

Hacia el año de 1882 Fehleisen realizó -- pruebas inoculando voluntarios con cultivos puros - obtenidos a partir de lesiones de erisipela para -- comprobar la existencia del estreptococo.

Anteriormente se pensaba que las diferentes enfermedades causadas por el estreptococo eran producidas por variedades específicas, sin embargo, actualmente se ha comprobado que una sola especie - puede ser responsable de varias enfermedades.

En 1903 Schotmüller propuso clasificar -- las diferentes variedades del estreptococo de acuerdo a su capacidad para producir hemólisis en los eritrocitos.

Brown en 1909 introdujo los términos: alfa (α), beta (β) y gamma (γ) para distinguir las hemólisis anteriores.

Mediante los trabajos de Rebeca Lance----field en la década de los años treinta, los estreptococos beta hemolíticos fueron diferenciados por -

grupos inmunológicos nombrados con letras desde la "A" hasta la "O".

Los antígenos del estreptococo denominados grupo específico se identificaron como carbohidratos y los tipo específico como proteínas (10).

En relación a otras propiedades para la identificación del *Streptococcus agalactiae* se han realizado estudios importantes sobre la producción de pigmento en diferentes condiciones de cultivo.

Orla Jensen observó en 1919 una coloración rojiza en varias cepas de estreptococos patógenos sobre agar caseína-peptona; y en caldo con los mismos nutrientes más almidón el *Streptococcus agalactiae* desarrolló una tonalidad naranja.

Durand y Giraud en un estudio realizado con estreptococo cromogénico comprobaron la importancia del almidón y el mantenimiento de las condiciones anaeróbicas para la producción de dicho pigmento.

Robeca Lancefield describió varios estudios sobre una cepa del estreptococo grupo "B" beta hemolítico, la cual, desarrolló un pigmento amarillo-café (12).

En 1941 mediante un estudio de 522 cultivos de *Streptococcus haemolyticus* se encontró que el 68.4% de las cepas del estreptococo del grupo "B" produjeron pigmento (12).

En 1961; Hood, Jauney y Dameron publicaron la importancia del estreptococo del grupo "B" en la morbilidad y mortalidad humana, ya que en es-

ta década era apreciable el número de casos presentes (12).

En esa misma época otros trabajos fueron confirmados y ampliados por varios investigadores - como sigue:

- * Eickhoff y colaboradores en 1964 y 1972
- * Duma y colaboradores en 1969.
- * Jelinkova, Neubauer y Duben en 1970.
- * Baker, Barret, Yow y Gordon en 1973.
- * Barton, Reigin y Lins en 1973.
- * Franciosi, Knostman y Zimmerman en 1973
- * Wilkinson, Facklam y Wortham en 1973.

Actualmente desde 1974 se ha utilizado la producción del pigmento en condiciones anaeróbicas como una característica distintiva del estreptococo del grupo "B" (21).

En ese mismo año Yow realizó un estudio - en el cual comprobó que en la mayoría de las regiones de los Estados Unidos de Norteamérica predominaban las infecciones producidas por este organismo - al igual que las causadas por organismos entéricos (14).

Christie y colaboradores observaron el fenómeno lítico cuando el estreptococo del grupo "B" (hemolítico y no hemolítico) desarrolló en la zona de actividad de la beta lisina estafilocócica sobre placas de agar sangre de carnero. Bajo condiciones anaeróbicas el efecto fué más claro, pero no

confirmaron que atmósfera se utilizó para los grupos "A", "C" y "G", los cuales no producen este fenómeno (9).

Munch-Petersen y colaboradores describieron una beta-toxina producida por el *Staphylococcus aureus* para detectar el fenómeno lítico. Sembrándolo en el centro de la placa de agar sangre, formando ángulo recto con la cepa del estreptococo e incubando a 37°C durante 24 horas (9).

El nombre del factor y de la reacción: -- CAMP (Christie, Atkins, Munch y Petersen) fueron -- propuestos por Murphy y sus colegas, derivándolo de las iniciales de los nombres de los observadores originales que describieron el fenómeno. (9).

Maasso comprobó que la epsilon-toxina del estafilococo produce incremento hemolítico en la zona de actividad de la beta-toxina.

Esseveld, y sus colaboradores inocularon el estreptococo en un ángulo de 35° a 45° con referencia a una cepa de beta-toxina estafilocócica sobre placas de agar sangre de carnero y observaron áreas de hemólisis en forma de flecha o vela en una reacción CAMP positiva, seguida de una incubación a 37°C durante 18 a 24 horas. Reportando así un 99.5% de reacción positiva para el estreptococo del grupo "B" y un 80.0% para el grupo "A" (9).

Wilson y Miles reportaron que es mejor incubar las placas de agar sangre de carnero en ambiente anaeróbico.

Ayers y Rupp en 1922 confirmaron la capa-

cidad para hidrolizar el hipurato de sodio.

En 1945, los observadores originales del fenómeno de CAMP reportaron un 100% de positividad para la prueba por el estreptococo del grupo "B", pero en estudios posteriores se comprobó su sensibilidad y se determinó un promedio de 98.4% (21).

Heeschen y colaboradores en 1967, al igual que Lütticken y Fritsche en 1974; reportaron un escaso 20% del estreptococo del grupo "A" como CAMP positivo (21).

1.2 JUSTIFICACION Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

En el presente estudio se evaluará la --- prueba de CAMP (Christie, Atkins, Munch y Petersen) bajo tres diferentes condiciones de incubación: Aerobiosis, atmósfera reducida de oxígeno (CO_2 del 5% al 10%) y Anaerobiosis estricta; ya que existe gran controversia sobre el ambiente de incubación al que deberá ser sometida dicha prueba, debido primeramente a la oxígeno-labilidad de las hemolisinas, y segundo porque las concentraciones elevadas de anhídrido carbónico en presencia de oxígeno aumenta la producción de peróxidos de los estreptococos beta-hemolíticos afectando de tal manera a los eritrocitos del medio de cultivo que los hace no susceptibles a las lisinas de estos microorganismos.

El motivo de este estudio es el de evaluar cuál de las tres condiciones de incubación anteriormente mencionadas es la más adecuada para desarrollar una prueba de CAMP óptima, mejor detectable y que pueda ser utilizada en forma rutinaria -- con mayor confiabilidad en los laboratorios de microbiología clínica.

2.- GENERALIDADES

2.1 TAXONOMIA Y NOMENCLATURA

COCOS GRAM POSITIVOS

A) Aerobios y anaerobios facultativos

Familia	I	<i>Micrococcaceae</i>
Género	I	<i>Micrococcus</i>
Género	II	<i>Staphylococcus</i>
Género	III	<i>Planococcus</i>

Familia	II	<i>Streptococcaceae</i>
Género	I	<i>Streptococcus</i>
Género	II	<i>Leuconostoc</i>
Género	III	<i>Pediococcus</i>
Género	IV	<i>Aeroecoccus</i>
Género	V	<i>Gemella</i>

B) Anaerobios

Familia	III	<i>Peptococcaceae</i>
Género	I	<i>Peptococcus</i>
Género	II	<i>Peptostreptococcus</i>
Género	III	<i>Ruminococcus</i>
Género	IV	<i>Sarcina</i>

2.2 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

2.2.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Son organismos de forma esférica denominados "cocos", generalmente miden de 0.8 a 1.0 micras.

Mediante la coloración de gram retienen el colorante básico debido a la composición de su pared celular por lo tanto son identificados como "cocos gram positivos". Son inmóviles y no forman esporas.

Se desarrollan formando cadenas lo cual es característico de este grupo, pero *in vivo* suelen formar diplococos.

La longitud de la cadena es influida por el enriquecimiento del medio en forma inversa, por lo que en lesiones recientes es bastante común encontrarlos en forma de diplococos o individualmente y en lesiones con abscesos o en medios de cultivo viejos o desfavorables por la presencia de calor, agones antimicrobianos, anticuerpos anti- M, etc., que dificultan el crecimiento, propiciando de esta manera la formación de cadenas.

Los cocos se encuentran unidos por compuestos propios de la pared celular y al formar cadenas en el medio de cultivo las colonias se tornan opacas en agar transparente. Para dividirse, los cocos se alargan hacia el eje de la cadena fraccionándose después en pares.

Varias cepas de estreptococos hemolíticos producen cápsulas y son demostrables exclusivamente en cultivos que tienen de 2 a 4 horas, debido a que

el gel capsular se difunde rápidamente en el medio.

Pueden existir tres tipos de colonias:

* MUCOIDES.- Formadas por cepas que producen cápsulas grandes debido al ácido hialurónico.

* MATE.- Se pensó que eran debido a la producción de la proteína M; en la actualidad se sabe que son colonias mucoides deshidratadas dando el aspecto de planas y rugosas.

* BRILLANTES.- Son de menor tamaño, formadas por bacterias que no producen hialuronato, o no lo integran en forma de gel capsular (10).

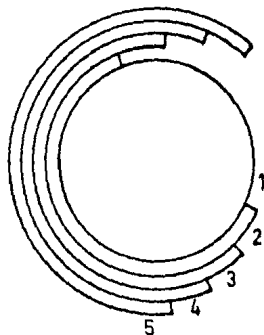
En la figura no. 1 se muestran diagramas esquemáticos sobre la constitución o estructura del estreptococo del grupo "A" y del grupo "B", con el fin de demostrar las diferencias que existen entre cada uno.

El estreptococo del grupo "B" beta hemolítico se diferencia inmunológicamente de los demás grupos por la presencia de ramnosa en su pared celular, la cual constituye su carbohidrato antigénico - específico, mientras que en el estreptococo del grupo "A" es N-acetil glucosamina.

El estreptococo del grupo "B" fué clasificado hacia el año de 1934 por Rebeca Lancefield en serotipos designados por números romanos debido a que cada uno tenía un polisacárido terminal diferente: Ia, Ib, II y III. Posteriormente se descubrieron otros dos serotipos: Ic y IIc (31,19). Tal clasificación fue determinada mediante pruebas de precipitación obteniendo el antisuero específico de rato-

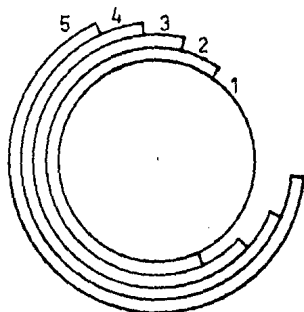
FIGURA Nº 1

ESTRUCTURA QUIMICA DEL *Streptococcus* A Y B



GRUPO A

- 1.- Membrana Citoplasmática
 - * Proteínas
 - * Lípidos
 - * Glucosa
- 2.- Muco péptido (Pentidoglicán)
 - * N- acetil glucosamina
 - * N- acetil ac. murámico
 - * Oligopéptido de D y L ala-
(nina.
 - * Ac. D-glutámico y L-lisina
- 3.- Carbohidrato Grupo Especí-
(fico.
 - * Ramnosa
 - * N- acetil glucosamina
- 4.- Pared Celular
 - * Proteína
 - * Antígenos: M, T y R
- 5.- Cápsula
 - * Ac. hialurónico



GRUPO B

- 1.- Membrana Citoplasmática
 - * Proteína
 - * Lípido
 - * Glucosa
- 2.- Muco péptido (Pentidoglicán)
 - * N-acetil glucosamina
 - * N-acetil ac. murámico
 - * Oligopéptido de D y L ala-
(nina.
 - * Ac. D-glutámico y L-lisina
- 3.- Carbohidrato Grupo Especí-
(fico.
 - * Ramnosa
- 4.- Pared Celular (Polisacárido)
 - * Ia, Ib, Ic, II, Iic y III.
- 5.- Cápsula
 - * Ac. hialurónico

nes inoculados con estreptococo tipo específico,

Los antígenos Ia y Ib poseen componentes antigénicos comunes entre sí. Estos tipos predominan en el hombre y las cepas tienden a ser más pequeñas y susceptibles a la bacitracina (Butter, -- 1967) (1) ya que existen algunas cepas que no contienen el antígeno tipo específico y son más frecuentes en los bovinos.

Los estreptococos que contienen el tipo II originan la producción de dos tipos de anticuerpos en el huésped. Esto fue observado por Rebeca Lancefield y Freimer en 1966 en estudios realizados con ratones (31).

En ese mismo año Freimer comprobó que -- los estreptococos del grupo "B" que contenían antígeno específico poseían cápsula sin ácido hialurónico como en los estreptococos del grupo "A"; sin embargo algunas cepas podían producir hialuronidasa (31).

Los tipos Ia, Ib, Ic y II producen neuroaminidasa a bajos niveles, mientras que las cepas del tipo III pueden no producir o la producen a altos niveles (28).

Actualmente se realizan estudios debido a que ciertas cepas poseen uno o dos antígenos que son proteínas llamadas 28R y 3R respectivamente. El primero es idéntico al del estreptococo del grupo "A", el cual es destruido por pepsina, el segundo es sensible a la tripsina y a la pepsina (4, 31)

En un estudio realizado en Brazil sobre -

la distribución serológica de los tipos del estreptococo del grupo "B" en las mujeres y sus recién nacidos se observó lo siguiente:

Los tipos Ib y Ic estuvieron presentes en un 21.3% de los casos cada uno; el tipo II en un 24.4% y el tipo III en un 19.0%. Doce cepas no fueron tipificables y sólo una se clasificó como Ibc.

Los tipos II y III fueron los más frecuentes en cultivos cervicales de mujeres no embarazadas y en individuos similares. Se sugirió que la zona rectal es un reservorio para la contaminación vaginal (3).

En un estudio similar en los Estados Unidos de Norteamérica realizado por Patricia Ferrieri (14) y colaboradores se observó que durante el tercer trimestre de embarazo los tipos Ic, II y III estuvieron presentes en un 23.9% cada uno. Un porcentaje semejante fué observado durante el parto; pero el tipo III fué el más común ya que se observó en cerca de un 33.3%.

En los recién nacidos la distribución fué paralela al de la madre, pero el tipo Ic (28.3%) -- fué un poco más común.

El tipo Ia tuvo un porcentaje muy bajo -- tanto en la madre como en su bebé (14).

Se ha reportado que la frecuencia de producción de una nucleasa extracelular (DNAsa) del estreptococo del grupo "B" es de un 38.0% a diferencia de un 100.0% en el estreptococo del grupo "A".

La mayoría de las cepas del estreptococo

del grupo "B" producen nucleasas extracelulares, re presentando los cinco serotipos (Ia, Ib, Ic, II y - III) principales siendo inmunológicamente diferen- tes de las del grupo "A" (denominadas como A, B, C y D).

Las nucleasas del grupo "B" han sido de- signadas como I, II y III mediante técnicas de difu- sión en agar verde de metilo en placa y parcialmen- te purificadas por cromatografía en carboximetil ce- lulosa. Son activadas en forma óptima por cationes de calcio (Ca^{+2}) y magnesio (Mg^{+2}), mostrando tanto actividad de RNAsa como de DNAsa.

Poseen pesos moleculares diferentes ya -- que el de la nucleasa tipo III es menor que el II, pero mayor que la del tipo I.

El antisuero que neutraliza las nucleasas II y III con el mismo título no hace lo mismo con - la nucleasa I. Esto sugiere que puede existir un - determinante común para estas dos nucleasas (13).

2.2.1 CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

Como grupo, los estreptococos crecen en un amplio rango de temperatura que va desde 10°C -- hasta 50°C.

Los que son patógenos tanto para el hombre como para los animales son mesofílicos, teniendo una temperatura óptima de crecimiento de 37°C.

Los estreptococos del grupo láctico desarrollan en un rango de 10°C a 45°C.

Es de vital importancia conocer estos rangos de temperatura debido a que es una característica diferencial entre los diferentes grupos.

Los estreptococos son aerobios y anaerobios facultativos. Algunas cepas como el *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. mutans* y algunos neumococos son ampliamente estimulados por la tensión reducida de oxígeno, conteniendo dióxido de carbono al 10% (Capnofílicos).

Estas bacterias son las más exigentes con respecto a sus requerimientos nutritivos. Todos utilizan la glucosa, maltosa y la mayoría lactosa y sacarosa como fuente de energía, por lo tanto su metabolismo es fermentativo.

Para desarrollarse necesitan riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina, ácido nicotínico, -- biotina junto con 13 o 14 aminoácidos, ciertos metales divalentes y bases púricas y pirimidicas.

El estreptococo del grupo "A" también re-

quiere derivados de ácidos nucleicos; su crecimiento es fuertemente estimulado por péptidos. Algunas cepas han sido cultivadas en medios conteniendo albúmina o caseína hidrolizada suplementada con aminoácidos y vitaminas; unos cuantos pueden ser cultivados en medios químicamente definidos.

El producto más importante de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico con pequeñas cantidades de ácido fórmico, ácido acético y etanol.

La hidrólisis del hipurato de sodio y polímeros como la inulina, almidón y dextrina tienen significado diferencial, así como la fermentación de la trehalosa, sorbitol, glicerol, rafinosa, lactosa, arabinosa y la producción de amoníaco de la arginina.

Los estreptococos alfa hemolíticos o ---- *Streptococcus viridans* en raras ocasiones hidrolizan la inulina y no ocurre lisis celular por la presencia de sales biliares (desoxicolato de sodio), - esto permite diferenciarlo del neumococo.

Existe cierta correlación entre los grupos inmunológicos de los estreptococos hemolíticos y sus características fisiológicas.

Los estreptococos del grupo "A" muestran habitualmente homogeneidad bioquímica. Todos exhiben beta-hemólisis en agar sangre y forman hemolisinas solubles. El hipurato de sodio no es hidrolizado, la arginina produce amoníaco. Hay fermentación de la trehalosa pero no del sorbitol; no desarrolla en presencia de cloruro de sodio al 7,5% ni en 40% de bilis.

Los estreptococos del grupo "R" son también homogéneos, siendo diferentes de los del grupo "A" en que el hipurato de sodio es hidrolizado; hay desarrollo en 40% de agar bilis y no producen fibrinolisina. Fermenta la sacarosa y el glicerol pero no el sorbitol, manitol, rafinosa y la inulina.

Las reacciones en lactosa y salicina son variables. Producen hialuronidasa pero no ácido -- hialurónico. Son resistentes a la bacitracina y -- dan reacción negativa a las pruebas de catalasa y oxidasa debido a que no presentan estos sistemas enzimáticos.

El pH final producido por el estreptococo del grupo "B" inoculado en medio glucosado es más ácido que el del grupo "A" y ligeramente menos ácido que el del grupo "D". Los datos reportados en el "Manual Bergey" son los siguientes: 4.2 a 4.8 para el grupo "R", 5.2 a 5.8 para el grupo "A" y 4.0 a 4.4 para el grupo "D".

El pH producido por el *S. agalactiae* inoculado en caldo S.F. (Caldo *Streptococcus faecalis*) varía de 6.80 a 6.85; mientras que en caldo tripticasa soya adicionado con 5% de glucosa y 6.5% de -- cloruro de sodio, resultando un pH de 3.95 a 4.10 - (6).

El crecimiento de estas bacterias generalmente fracasa en medios preparados con productos -- deshidratados de carne; y desarrollan ligeramente -- en medios frescos de extractos de carno, el cual -- puede mejorarse con la adición de glucosa (1%) y solución buffer de fosfato.

Los medios más eficaces son las infusiones enriquecidas por la adición de sangre fresca o líquido ascítico. En la actualidad se utilizan cultivos con agar sangre de carnero (en Estados Unidos) o de caballo (en Inglaterra).

Los cultivos de estreptococo pueden ser mantenidos en caldo con suero, en ciertos medios de agar, o en infusión en gelatina. Siendo almacenados en refrigeración después de su inoculación.

Los medios más comunes son:

- * Agar tripticosa soya (BBL)
- * Agar estrepto-selectivo
- * Infusión cerebro-corazón
- * Infusión Todd-Hewitt

Para los medios sólidos se emplea sangre de carnero (5%) y para los líquidos es necesario añadir glucosa, soluciones buffer y enriquecerlos.

Existe un medio de cultivo (sólido o líquido) llamado "NPC", el cual contiene ácido nalidixico, polimixina y cristal violeta, siendo más sensible el medio líquido que el sólido. Es selectivo para el estreptococo del grupo "B" (22) sin necesidad de añadir sangre de carnero.

Otro medio de agar sangre para aislar al estreptococo de los grupos "A" y "B" es el llamado "SXT-BA" el cual contiene sulfametoxazol (23.75 ug/ml) y trimetropin (1.25 ug/ml). Se utiliza para inhibir el crecimiento de flora normal de orofaringe incluyendo al *S. viridans* y al estreptococo no grupo "A" ni "B" (17).

Por su efecto lítico en la sangre, los estreptococos se encuentran divididos en tres categorías:

* Alfa-Hemolíticos. Cuando exhiben una zona de decoloración verdosa y hemólisis parcial al rededor de la colonia.

* Beta-Hemolíticos. Al presentar una clara zona de hemólisis (Hemólisis completa).

* Gamma-Hemolíticos. Al no presentar hemólisis.

La capacidad del estreptococo del grupo "B" para producir beta-hemólisis en agar sangre radica en su habilidad para formar las estreptolisinas "S" y "O", las cuales son producidas como su nombre lo indica por el estreptococo, siendo elaboradas en diferentes circunstancias.

La primera de ellas es producida cuando es incubado en ambiente de 5% al 10% de CO₂ y la segunda cuando permanece en anaerobiosis estricta.

ESTREPTOLISINA "O"

Llamada así por ser oxígeno-lábil debido a que es inactivada irreversiblemente en aerobiosis; pero puede reducirse rápidamente por la acción de agentes reductores como la cisteína, beta-mercaptano e hidrosulfito de sodio.

Su actividad "*in vitro*" es demostrable solamente en la profundidad del medio o superficialmente cuando es incubado en anaerobiosis estricta.

La capacidad citotóxica es debida a los -

grupos sulfhidrilo que contiene, y es inhibida por el colesterol y otros esteroides. La iodoacetamida o peryodato ocasiona su destrucción irreversible.

A temperatura ambiental es inactivada irreversiblemente; en cambio permanece estable a bajas temperaturas.

Su importancia radica en que esta estreptolisina es tóxica tanto para eritrocitos como para leucocitos siendo además citotóxica para el miocardio provocando disfunción cardiaca.

Se ha propuesto el siguiente mecanismo de acción:

Mantiene un período de latencia de aproximadamente un minuto siendo menor cuando la concentración de la lisina es elevada.

Al ser reducida por los diferentes agentes se une a los eritrocitos del medio debido probablemente a la fijación del colesterol sobre la membrana plasmática afectándola en un principio; enseguida penetra y ocasiona lisis de los lisosomas de los leucocitos, liberando de esta forma las enzimas hidrolíticas y lesionando de manera irreversible a las células.

Otras enzimas atacan las mitocondrias aumentando así las lesiones.

Es antigénica tanto en forma oxidada como en reducida y estimula la formación de anticuerpos que neutralizan su acción hemolítica.

ESTREPTOLISINA "S"

Es una molécula estable frente al oxígeno manifestando sus propiedades hemolíticas tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" en agar sangre. Produce la beta-hemólisis superficial de las colonias de la mayoría de los estreptococos cuando se incuban aeróbicamente.

Su naturaleza bioquímica no se conoce muy bien todavía debido a que según se describe no es completamente una proteína ya que consta de una parte proteica (péptido hemolítico) y otra no proteica cuya naturaleza varía según las condiciones ambientales de incubación del medio de cultivo (29).

La parte no proteica se une a un vehículo molecular pudiendo ser: albúmina sérica, lipoproteína sérica, polinucleótidos de RNA (ac. ribonucleico) y detergentes no iónicos.

Su extracción depende de la formación del complejo péptido hemolítico-portador molecular.

Es sensible al calor y a los ácidos, pero puede mantenerse a bajas temperaturas. Por ser termolábil es difícil su purificación, aislándose solamente formando el complejo.

Se inactiva fuertemente por las beta-lipoproteínas y la lecitina pero no por el colesterol.

La fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina la inhiben.

Berheiner la considera como un compuesto peptídico formado por veintiocho moléculas de aminoácidos.

Su peso molecular es menor a 20,000, el -
cual se relaciona con su poca antigencidad; lo --
que explica la ausencia de anticuerpos neutralizan-
tes de su acción, considerándose la sustancia más -
tóxica de las producidas por el estreptococo.

Causa la muerte rápidamente a conejos in-
yectados intravenosamente debido a que produce hemó-
lisis intravascular y en ratones, necrosis de los -
túbulos renales al inyectarlos en forma intraperito-
neal.

2.2.3 METODOLOGIA PARA EL PRIMOAISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL ESTREPTOCOCCO GRUPO "B"

A continuación se expondrán varios métodos presuntivos para la identificación y primoaislamiento del *Streptococcus agalactiae*.

* HIDROLISIS DE LA ESCULINA EN PRESENCIA DE BILIS

En estudios realizados (11,21) se demostró que es conveniente realizar esta prueba para diferenciar entre el estreptococo del grupo "D" y el del grupo "B", debido a que este último desarrolla sobre el medio de bilis-esculina en un 99% pero sin realizar la hidrólisis por lo que es considerada como negativa para dicho grupo.

El procedimiento bioquímico de ésta prueba es el siguiente:

Es considerado positivo cuando el glicósido (esculina) se hidroliza transformándose en esculetina y glucosa en presencia de bilis. (Esquema no. 1)

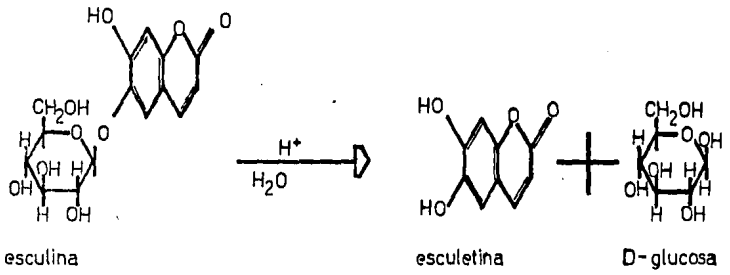
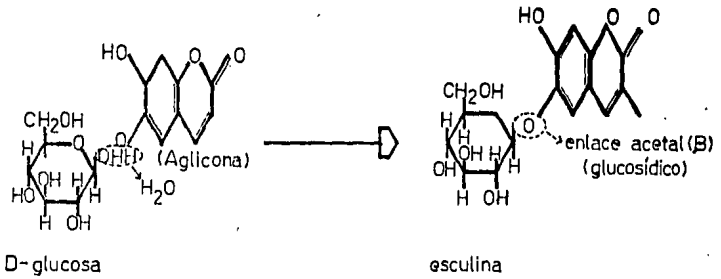
La coloración negruzca o parda es observada en el medio bioquímico cuando la reacción es positiva debido a que se agrega citrato amónico férrico al 0.05%; que al combinarse con la esculetina forma la sal férrica (esculetina férrica) en forma de precipitado.

* HIDROLISIS DEL HIPURATO DE SODIO

Esta técnica se utiliza mediante la capacidad que tiene el estreptococo grupo "B" beta-hemolif-

ESQUEMA No 1

HIDROLISIS DE LA ESCULINA



tico para hidrolizar el hipurato de sodio (ac. hipúrico) a ácido benzoico y glicina por medio de la enzima hipuricasa. Dependiendo de la concentración de los productos se determina su capacidad enzimática.

El ácido hipúrico como comunmente es llamado, es el ácido benzoil amino acético; derivado de la glicina. (Esquema no. 2).

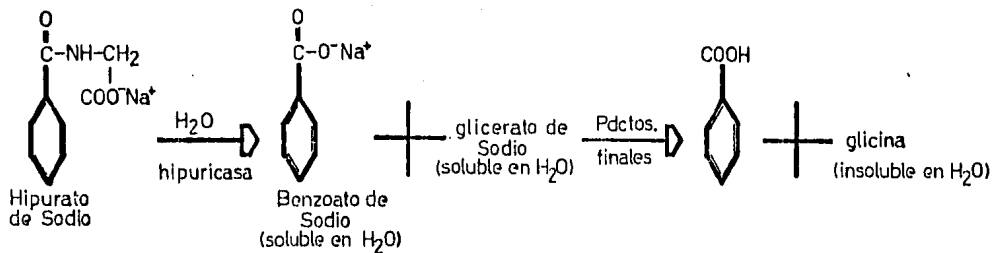
El hipurato de sodio es utilizado formando benzoato de sodio y glicerato de sodio para finalmente obtener ácido benzoico y glicina, los cuales son insolubles en agua.

En la década pasada se llegó a la conclusión de que la hidrólisis del hipurato de sodio era positiva desde un 96.1% a un 100.0% en las cepas del *Streptococcus agalactiae*, pudiendo identificarlo facilmente de otros grupos ya que el estreptococo grupo "D" solamente es positivo en un 19.1% pero se puede diferenciar mediante la hidrólisis de la esculina en bilis. (11,21).

Existe un método rápido para la determinación de la hidrólisis del hipurato de sodio utilizando un inóculo pesado en un substrato acuoso de hipurato de sodio, detectando como producto de la hidrólisis, la glicina: utilizando una solución de ninhidrina en lugar de ácido benzoico como se hace normalmente mediante la técnica empleada por Facklam y colaboradores para la cual se necesitan 48 horas incubando a 37°C, y en ésta solamente 2 horas dando un 100% de veracidad en el resultado (20).

ESQUEMA No2

HIDROLISIS DEL HIPURATO DE SODIO



* PRODUCCION DE PIGMENTO

La producción de pigmento en las colonias del estreptococo ha tenido muy poca atención desde que fué descrita originalmente por sus observadores como Orla Jensen en 1919, Durand y Giraud en 1923, Lancefield y varios mas (12).

Desde 1974 hasta la fecha se le ha dado - mayor importancia debido a los estudios realizados y publicados por Fallon en donde concluye que puede ser identificado el *Streptococcus agalactiae* inoculándolo en placas de agar columbia e incubándolas a 37°C durante la noche bajo atmósfera de hidrógeno - (H_2) y dióxido de carbono (CO_2).

Si se forman colonias beta hemolíticas -- con tonalidad naranja pueden ser identificadas con seguridad como grupo "B".

Las colonias pigmentadas deben ser observadas con luz de día o mediante lámpara de filamento de tungsteno, nunca con lámpara fluorescente (12, 26, 27).

A pesar de esto se ha observado que no todos los estreptococos del grupo "B" producen tal -- pigmento ya que se ha reportado desde un 67.0% a un 97.3% como positivas (21). Esto indica que no puede ser tomada como una prueba definitiva sino simplemente presuntiva del grupo "B" para identificarlo.

Se ha observado que la producción de pigmento es influenciado por el pH. A un pH de 7.3 se observa mayor producción de pigmento (12).

* PRUEBA DE CAMP

Esta prueba es una de las más certeras y -
fidedignas para la identificación del estreptococo -
del grupo "B" beta hemolítico.

Su nombre se derivó de sus observadores --
originales (Christie, R.; N. E. Atkins, y E. Munch-
-Peterson (CAMP) (24) quienes advirtieron y examina-
-ron el fenómeno en el que el *Streptococcus agalac-*
-*ticus* produce un factor llamado "Factor CAMP", el ---
cual actúa en combinación con la beta-lisina del ---
Staphylococcus aureus al ser inoculados en medio de
agar sangre de carnero e incubados a 37°C durante 24
horas.

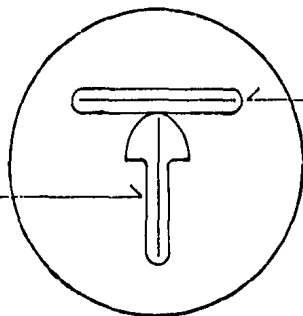
Dicha prueba es considerada positiva cuan-
do al unirse las dos hemolisinas producen un incre-
-mento de la hemólisis manifestado por un halo en for-
-ma de punta de flecha.

Las cepas, tanto del *Staphylococcus aureus*
como la que se trata de identificar deben ser sembra-
-das en forma perpendicular y estar separadas unos mi-
-límetros (1 a 2 mm). (Ver figura no. 2).

Se han reportado estudios en los cuales es-
-treptococos de otros grupos como el grupo "A" han da-
-do positiva esta reacción de CAMP hasta en un 80%, -
-aunque solamente en ambiente de anaerobiosis estricta.
-Sin embargo, esta prueba sigue siendo presuntiva
-para la identificación del grupo "B" en un alto -
-porcentaje debido a que pueden descartarse otros gru-
-pos con ayuda de otras pruebas sencillas, como la --
-sensibilidad a la bacitracina en el caso del grupo -
-"A" (9,17).

FIGURA Nº2

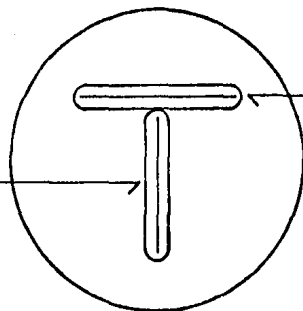
PRUEBA DE CAMP



CAMP (+)

Staphylococcus aureus

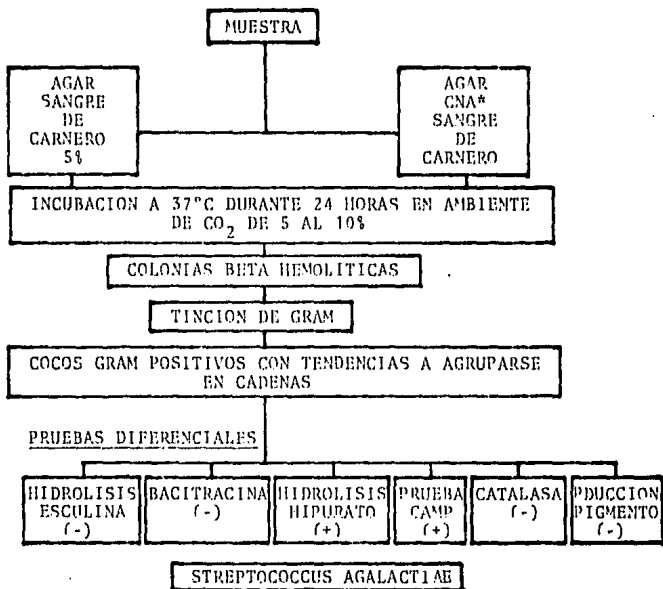
Streptococcus beta hemolítico



CAMP (-)

Tanto esta prueba como la hidrólisis del hipurato de sodio son altamente presuntivas para la identificación del *Streptococcus agalactiae*, sólo que con la primera se obtienen los resultados en 24 horas y con la segunda es necesario más tiempo de in cubación.

Toda muestra biológica en la que interese el aislamiento del *Streptococcus agalactiae* habitualmente se procesa mediante el siguiente esquema de trabajo:



*Agar Columbia Base (Merck catálogo art. no. 10455) colimicina-ac nalidixico

2.2.4 IMPORTANCIA DE LA PRUEBA DE CAMP PARA LA DIFERENCIACION DEL *Streptococcus agalactiae*

Para hablar sobre la importancia de la prueba de CAMP es necesario conocer el mecanismo bioquímico y para ello estudiar cada uno de los factores que intervienen en ella, como son: el comportamiento de los eritrocitos y de cada una de las hemolisinas que actúan sobre ellos. Por este motivo a continuación se explicará de la forma más completa posible cada uno de estos factores.

Para realizar la prueba de CAMP se utiliza agar base con sangre de carnero al 5% en cajas de Petri (15X10 mm) con una profundidad de 1,5 mm. El estafilococo debe ser de una cepa conocida (por ejemplo la cepa 681 (9)) la cual produce un elevado nivel de beta-lisina manifestado en el medio de cultivo.

Las cepas de *S. aureus* que producen principalmente la beta-hemolisina difusible (también llamada beta-toxina, beta-lisina o beta-estafilolisina) son de origen animal ya que las cepas de origen humano que lo hacen son poco comunes (24).

Por estudios realizados de la beta-hemolisina se ha comprobado que contiene una fosfolipasa "C", que hemoliza al eritrocito tanto de carnero como de buey debido a que hidroliza la esfingomielina presente en ellos.

Esta fosfolipasa "C" está formada por dos beta-hemolisinas que actúan tanto en ambientes ca---

lientes como en fríos.

La principal hemolisina contiene una elevada concentración de cationes, y la menor una concentración menor de aniones; ésta última es activada solamente contra los eritrocitos de carnero ya lisados en la fase caliente-fría. Aún no se conoce la relación anión-cación.

La beta-hemolisina catiónica es una macromolécula termolábil cuya producción ocurre tanto en ambiente aeróbico como en anaeróbico, manteniendo su actividad máxima a un pH de 7.0 a 7.2.

El rango de temperatura para una actividad óptima es de 37°C a 40°C, teniendo una actividad mínima a 25°C e inhibiéndola a 50°C.

Los iones de Mg^{+2} y Mn^{+2} intensifican y aumentan la liberación del fósforo orgánico de la esfingomielina activando de esta forma la reacción a sus máximos niveles (24).

En estudios realizados por Wiseman (24) se encontró que el Co^{+2} es igualmente efectivo, --- mientras que los iones ferrosos son menos efectivos que el Mg^{+2} . El EDTA (ac. etilendiaminotetracético), el citrato, o los iones calcio inhiben la hemólisis debido a que impiden la liberación del fósforo orgánico de la esfingomielina.

En conclusión, la beta-hemolisina del --- *Staphylococcus aureus* es una hemolisina caliente-fría que actúa contra las células de carnero lisándose extensamente durante la primera incubación a 37°C, pero después de un enfriamiento ambiental has

ta 4°C, la lisis se hace evidente por una clara zona central de hemólisis en un área desconocida.

A 37°C se lleva a cabo la reacción lisina-substrato sin ocurrir lisis, pero el cambio brusco a 25°C o más bajo ocasiona una lisis más visible.

La hemólisis a 37°C no es característica de la beta-hemolisina del *Staphylococcus aureus* pero puede ocurrir si las condiciones ambientales de las células rojas sintetizadas por la beta-lisina son alteradas; como se puede deducir entonces; la reacción es favorecida de acuerdo a la concentración de la lisina y a la temperatura de incubación.

La beta-hemolisina actúa indirectamente con el substrato que ayuda a preservar los eritrocitos intactos.

En la fase tibia de la incubación, la beta-lisina potencia la lisis de los eritrocitos de carnero debido a otras hemolisinas como las producidas por el *Streptococcus* del grupo "B" (24).

* COMPOSICION DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO

El estroma del eritrocito está constituido por moléculas de proteínas y lípidos ordenados en forma de una capa bimolecular.

Esta red estromal o membrana limitante se encuentra formada por aproximadamente un 50% de proteínas, 40% de lípidos y un 10% de carbohidratos.

La bicapa lipídica contiene unidades asimétricas de fosfolípidos (50% a 70%) y una capa de glicolípidos (30% a 50%) proporcionando constantemente polaridad uniforme a la membrana, aún en ausencia de cualquier proteína asociada.

Los fosfolípidos son componentes lipídicos derivados del glicerol esterificado por ácidos grasos y ácido fosfórico unido a una base nitrogenada, son denominados "compuestos anfipáticos" puesto que poseen funciones tanto polares como no polares, de ahí su importancia en la permeabilidad celular ya que en combinación con las proteínas, mantienen el potencial físico de la membrana celular controlando el intercambio iónico de bicarbonato (HCO_3^-) y cloro (Cl^-); y la transferencia de agua entre el medio externo e interno.

El exterior de la capa lipídica se encuentra formada únicamente de fosfolípidos, existiendo en mayor proporción en la parte externa que interna; y glicolípidos conteniendo colina, esfingomieline y lecitina respectivamente.

La lecitina y la esfingomieline no obstruyen el intercambio de los iones Na^+ y K^+ , sin embar-

go, se ha sugerido que la función de la membrana celular reside en la interacción entre proteína-lípido, la relación lípido-lípido y que la ambiente-lípido es de menor significancia fisiológica.

Los fosfolípidos comunes a la mayoría de los eritrocitos son: fosfatidiletanolamina (cefalina), fosfatidilserina, esfingomiolina y fosfatidilinositol, además del ac. fosfatídico. Sin embargo su frecuencia y cantidad varía marcadamente en las diferentes especies.

Los eritrocitos de carnero están compuestos principalmente de esfingomiolina, mientras que en las de origen humano la mayor parte es lecitina y el resto esfingomiolina.

El sustrato de CAMP más frecuente es el eritrocito de carnero y bovino, ya que ninguno de ellos contiene lecitina en cantidades significantes. (24).

* FACTOR CAMP

El estreptococo del grupo "B" libera un producto extracelular y difusible llamado Factor -- CAMP, el cual tiene la capacidad de lisar los eritrocitos de rumiantes como el carnero al incubarlos con beta-hemolisina estafilocócica, formando un sinergismo especial al unirse con dicha hemolisina -- (esfingomielinasa C).

Desde hace varias décadas se ha venido investigando sobre el efecto responsable del Factor -- CAMP. Después de las investigaciones realizadas -- por los observadores de tal fenómeno, Brown y colaboradores trataron de purificarlo y llegaron a la -- conclusión de que era una sustancia activa, sensible a la tripsina, con un peso molecular de 33,000 y que tuviera una constitución fundamentalmente proteica (24).

Actualmente ha sido purificado, considerándose una proteína filtrable y termoestable, manteniendo un peso molecular de 23,500 y un pH isoelectrico de 8.3 (5).

En estudios posteriores Brown y colaboradores demostraron que los eritrocitos de carnero incubados previamente con esfingomielinasa estafilocócica, lavados y después expuestos a la proteína -- CAMP provocaban lisis mientras que cuando los eritrocitos de carnero se exponían al factor CAMP, se lavaban y luego se mantenían con la esfingomielinasa no ocurría lisis. Esto indicaba que el factor -- CAMP reaccionaba con los eritrocitos modificados --

por la esfingomielinasa únicamente (7).

La glucosa y varios carbohidratos fermentables en cantidades moderadas, estimulan la producción del factor CAMP, mientras que algunos inhibidores metabólicos como la fosfatidilcolina la reducen.

Se comprobó que agentes tales como fosfolípidos, proteasas, tripano azul y colesterol que inhiben otras hemolisinas estreptococales ("S" y "O") no inhiben al factor CAMP, únicamente los primeros (25).

En el siguiente cuadro se enumeran los aminoácidos contenidos en el factor CAMP y su porcentaje molar encontrado:

AMINOACIDO	PORCENTAJE MOLAR
Acido aspártico	14.8
Treonina	7.0
Serina	4.7
Acido glutámico	12.7
Prolina	2.6
Glicina	4.3
Alanina	8.7
Valina	10.8
Metionina	1.8
Isoleucina	7.9
Leucina	7.7
Tirosina	3.4
Fenilalanina	2.5
Histidina	1.1
Lisina	8.0
Arginina	1.9

La acción del factor CAMP es favorecida - al actuar simultáneamente con la hidrólisis de la - esfingomielina ya que su acción depende de la con- centración de éste y al tiempo de degradación del - substrato debido a la dilución de la esfingomielina sa.

El factor puede interferir con la precipi- tación de la ceramida "*in situ*" debido a que la eli- minación de la ceramida mantiene abiertos los espa- cios de la capa exterior devolviendo la presión in- terna de la célula a la capa interior de las célu- las susceptibles y un posible ataque enzimático, -- sin embargo en los eritrocitos de carnero el factor CAMP no reacciona enzimáticamente con la ceramida - de la membrana por la principal acción de la esfin- gomielinasa "C", y al unirse dicho factor con la ce- ramida desorganiza la bicapa lipídica provocando li- sis celular (5,24).

La esfingomielinasa "C" (esfingomielina - colinfosfohidrolasa) tiene capacidad para atacar la membrana exterior de los eritrocitos de mamíferos - intactos formando ceramidas insolubles en agua y -- fosforilcolina (5). La actividad óptima de la es- fingomielina para degradar su enzima ocurre en un - rango de pH de 7.8 a 8.8.

El rango de degradación de la esfingomie- lina nativa de los eritrocitos es más eficaz que -- cuando es purificada; lo mismo sucede entre las in- teracciones fosfolipasa-substrato debido al poten- cial electrocinético creado por los fosfolípidos na- tivos, los cuales son más susceptibles a la enzima

que cuando han sido purificados.

Los dos mecanismos mas lógicos para provocar la lisis celular son los siguientes:

- 1.- La protefna de CAMP reacciona con la ceramida, ya sea enzimáticamente o no.
- 2.- La unión de la protefna de CAMP a la ceramida - provoca cierta desorganización por un daño en la bicapa lipídica suficiente para inducir la lisis (5).

* DEGRADACION DE LA ESFINGOMIELINA

La fosfolipasa "C" atacó rápidamente las moléculas de lecitina después del tratamiento con esfingomielinasa para catalizar la hidrólisis de la unión del fosfato con la liberación de la fosforilcolina de los fosfátidos como: lecitina, cefalina y esfingomielina.

Después de dicha hidrólisis se forman --- principalmente fosforilcolina y la fosforiletanolamina, grasas neutras, diglicéridos y ceramidas (24)

La esfingomielina se hidroliza más lentamente que la lecitina.

* DEGRADACION DE LOS GLICEROFOSFOLIPIDOS

Los eritrocitos de carnero son resistentes a la fosfolipasa A_2 debido a que no tienen suficiente cantidad de lecitina; misma que se encuentra reemplazada por esfingomielina, mientras que los eritrocitos de otros mamíferos sí son lisados por esta enzima. Por lo tanto, en eritrocitos de carnero o de bovinos no hay rompimiento de los glicerofosfolípidos por la acción combinada de la esfingomielinasa y la acción de la fosfolipasa "C" se expresa por ausencia de hemólisis, aunque la degradación no lítica de los fosfolípidos sí disminuye la estabilidad de la membrana celular.

En los eritrocitos de humanos y de conejillos de indias incubados con una mezcla de esfingomielinasa y fosfolipasa "C" se produce hemólisis -- completa en una hora, aunque ninguna de estas enzi-

mas produce la lisis independientemente,

Cuando los estreptococos desarrollan cerca del borde de una de las zonas obscurecidas uniformemente por la beta-lisina estafilocócica, el aclaramiento del medio se observa en el punto más cercano a las colonias del estreptococo, sugiriendo que un agente invisible o productos de ese agente que se ha extendido hacia las células rojas ya alteradas por la beta-lisina estafilocócica; la lisis se produce en la sangre de carnero o de bovinos pero no en la sangre de caballo, conejo, conejillos de indias o humanos.

* DISPONIBILIDAD DEL FACTOR CAMP PARA LA EJECUCION
DE LA PRUEBA

Actualmente se han estado utilizando métodos que facilitan la ejecución de la prueba de CAMP basados en el mismo principio de dicha prueba.

Existe uno denominado "método replicador" en el que se pueden identificar más fácil y rápidamente hasta treinta y dos cepas en una placa de agar sangre de carnero al 5% como estreptococos del grupo "B", utilizando para ello un replicador inoculado previamente con los estreptococos problema. Una vez inoculado se siembra la cepa de *S. aureus* conocida como se indica en la metodología y se incuba aeróbicamente a 37°C durante la noche. Este sistema mantiene una sensibilidad de 99.7% (15).

Otro método en el que se modifica la prueba de CAMP consiste en la utilización de discos de papel impregnados de beta-lisina estafilocócica -- (actualmente comercializados) los cuales son colocados aproximadamente a 6 mm. de distancia del estreptococo inoculado en suficiente cantidad sobre agar sangre de carnero al 5% con un espesor de 5 mm. e incubado a 35°C en ambiente aeróbico durante 24 horas.

Se considera una reacción positiva cuando se forma la hemólisis característica de dicha prueba (32).

3.- MATERIAL Y METODO

3.1 PROCEDENCIA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

El trabajo de investigación se realizó -- con 57 cepas de *Streptococcus*, identificado presuntivamente como grupo "B" y proporcionadas por la -- Sección-Microbiología del Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Universitario "Dr. Angel Leañó". Dichas cepas procedieron de diferentes productos biológicos tales como: exudados vaginales y faríngeos, urocultivos, etc., y su identificación bioquímica se efectuó de acuerdo a lo establecido por Facklam (11).

3.2 METODOLOGIA MICROBIOLÓGICA

3.2.1 REAISLAMIENTO

Las cepas en estudio proporcionadas por el laboratorio fueron reaisladas en agar sangre de carnero al 5% e incubadas durante 24 horas a 37°C - en ambiente de CO₂ (5% al 10%).

3.2.2 EVALUACION DE LA PRUEBA DE CAMP EN LAS TRES CONDICIONES ATMOSFERICAS DE INCUBACION

La cepa de *Staphylococcus aureus* productor de beta-lisina utilizada para dicha evaluación fué ATCC 13598 proporcionada por el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. (Monterrey, N.L., México).

* ESTANDARIZACION DE LOS INOCULOS

Con la finalidad de estandarizar las poblaciones bacterianas utilizadas en el estudio, tanto de la cepa control del estafilococo como la del estreptococo se procedió a preparar suspensiones de acuerdo al grado de turbidez correspondiente al tubo no. 5 del nefelómetro de Mac Farland, equivalente a una densidad de 15×10^8 colonias.

1.) Evaluación de la Prueba de CAMP en ambiente de Aerobiosis

Mediante la utilización del asa calibrada de 0.001 se procedió a inocular las cepas de acuerdo a los patrones establecidos con anterioridad (señalados en la sección 2.2.4) y posteriormente incubadas en ambiente de aerobiosis absoluta, a 37°C durante 24 horas.

2.) Evaluación de la Prueba de CAMP en CO₂

Siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior se inocularon las cepas, cambiando

Únicamente el ambiente de incubación. Para este caso correspondió a presión reducida de oxígeno manteniendo un ambiente de 5 al 10% de CO_2 , el cual se logró con un brocal de cristal en el que se introdujo una vela encendida, misma que al sellarlo produce CO_2 por el consumo de oxígeno.

3.) Evaluación de la Prueba de CAMP en Anaerobiosis

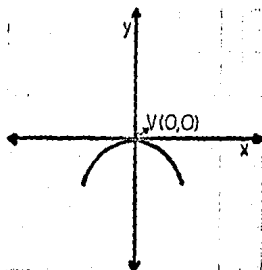
Para este fin se empleó la técnica de -- Carl Quist en la cual se utiliza ac. pirogálico y bicarbonato de sodio que al mezclarlos reaccionan consumiendo el oxígeno presente en el espacio contenido formando pirogalato como resultado final. El oxígeno se transforma en CO_2 y CO , mientras que el álcali en exceso absorbe el O_2 .

4.- RESULTADOS

En la tabla no. 1 se muestra en las columnas relacionadas el número de la cepa probada así como el área aproximada en milímetros cuadrados de la hemólisis observada en forma de "punta de flecha" en cada una de las atmósferas evaluadas para la prueba de CAMP.

Para obtener una evaluación más confiable sobre la eficacia de cada una de las atmósferas de incubación probadas en este estudio; se procedió a determinar las áreas de hemólisis formadas por el sinergismo de las hemolisinas previamente descritas empleando la fórmula general de una parábola con vértice en el punto $V(0,0)$ e integrándola posteriormente para obtener el área:

$$x^2 = -4py$$



Con la finalidad de estandarizar las formas de hemólisis observadas, se clasificaron las -- pruebas positivas en dos grupos:

1.- Aquellas en que las cepas formaron una hemólisis semejante a una parábola con vértice $V(0,0)$ y que aproximadamente correspondieron a la gráfica -- no. 1 se aplicó la siguiente fórmula:

$$\boxed{X^2 = 2Y}$$

$$\underline{-2 \leq X \leq 2}$$

$$Y = -1/2 X^2$$

El área limitada por esta parábola y la -- recta $Y = -2$, que semeja la hemólisis, la obtenemos mediante integración de la siguiente forma:

$$A = \int_{-2}^2 \left(-2 + \frac{X^2}{2}\right) dx = 2 \int_0^2 \left(-2 + \frac{X^2}{2}\right) dx = 2\left(-2x + \frac{X^3}{6}\right)$$

$$= 2(-4 + 8/6) = -16/3 \text{ cm}^2 \approx 533.3 \text{ mm}^2$$

NOTA: El signo negativo sólo indica que el área se encuentra bajo el eje "x", pero se toma su valor absoluto. El valor de la recta y los límites para

el eje "x" cambian de acuerdo a cada caso.

2.- Aquellas en las cuales las cepas formaron una hemólisis semejante a una parábola con vértice $V(0,0)$ y que aproximadamente correspondieron a la gráfica no. 2 se aplicó la siguiente fórmula:

$$X^2 = -4Y$$

$$\underline{-2 \leq X \leq 2}$$

$$Y = -1/4 X^2$$

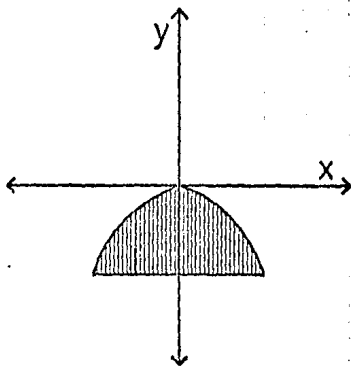
El área limitada por esta parábola y la recta $Y = -1$, que semeja la hemólisis está dada por la siguiente forma:

$$A = \int_{-2}^2 (-1 + 1/4 x) dx = 2 \int_0^2 (-1 + 1/4 x^2) dx = 2(-x + x^3/12) \Big|_0^2$$

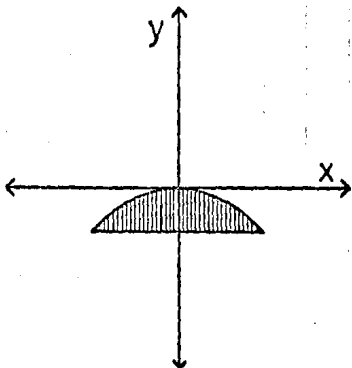
$$2(-2 + 8/12) = -8/3 \text{ cm}^2 \approx \underline{266.6 \text{ mm}^2}$$

NOTA: El signo negativo sólo indica que el área se encuentra bajo el eje "x", pero se toma su valor absoluto. El valor de la recta y los límites para el eje "x" varían de acuerdo a cada caso.

GRAFICA N° 1



GRAFICA N° 2



GRAFICAS PARA DETERMINAR EL AREA GEOMETRICA DEL -
SINERGISMO HEMOLITICO,

TABLA No 1

EVALUACION DE LA PRUEBA DE CAMP EN TRES CONDICIONES ATMOSFERICAS DE INCUBACION EN 57 CEPAS DEL <i>Streptococcus</i> GRUPO "B"			
CASO No	ATMOSFERAS DE INCUBACION (Arca de hemólisis en mm ²)		
	ANAEROBIOSIS	CO ₂ (5-10%)	AEROBIOSIS
1	64.3	51.0	56.4
2	123.3	57.9	-
3	108.8	92.3	71.5
4	64.3	-	-
5	135.5	75.8	69.0
6	163.3	60.0	60.9
7	113.9	115.4	85.8
8	69.0	29.5	53.9
9	143.3	82.5	82.5
10	108.9	78.0	95.8
11	123.3	19.7	19.7
12	113.9	53.9	53.9
13	113.9	104.5	82.5
14	135.7	135.9	135.9

CONTINUACION DE LA TABLA Nº 1

CASO Nº	ATMOSFERAS DE INCUBACION (Area de hemólisis en mm ²)		
	ANAEROBIOSIS	CO ₂ (5-10%)	AEROBIOSIS
15	347.7	297.4	226.7
16	83.0	38.0	17.6
17	73.4	17.6	25.5
18	98.0	15.7	27.9
19	333.8	180.9	126.4
20	333.8	107.8	58.6
21	267.8	68.6	136.8
22	87.5	19.7	11.8
23	49.5	24.4	29.1
24	118.7	19.7	33.6
25	186.7	132.5	114.6
26	176.7	94.9	137.7
27	167.4	95.9	85.8
28	167.4	155.7	60.0
29	163.2	166.7	137.7
30	158.7	115.5	76.0
31	77.9	56.4	41.2
32	135.7	132.5	87.5

INSTITUTO VETEROINFORMATICO
 DE LA ESCUELA NACIONAL DE INGENIERIA
 DE LA UNAM

CONTINUACION DE LA TABLA N° 1

CASO N°	ATMOSFERAS DE INCUBACION (Area de hemólisis en mm ²)		
	ANAEROBIOSIS	CO ₂ (5-10%)	AEROBIOSIS
33	192.4	163.3	119.5
34	142.4	169.7	105.5
35	167.4	192.4	119.7
36	176.7	199.4	115.5
37	100.6	-	-
38	135.9	126.9	105.9
39	192.4	103.5	87.5
40	143.3	76.8	55.8
41	143.3	132.5	143.3
42	106.7	94.9	58.6
43	123.3	106.3	68.8
44	91.8	85.8	83.0
45	251.7	268.2	235.2
46	370.8	297.2	347.8
47	99.7	92.3	52.5
48	113.9	78.3	64.3
49	59.9	45.8	47.4
50	80.7	68.4	78.3

CONTINUACION DE LA TABLA Nº 1

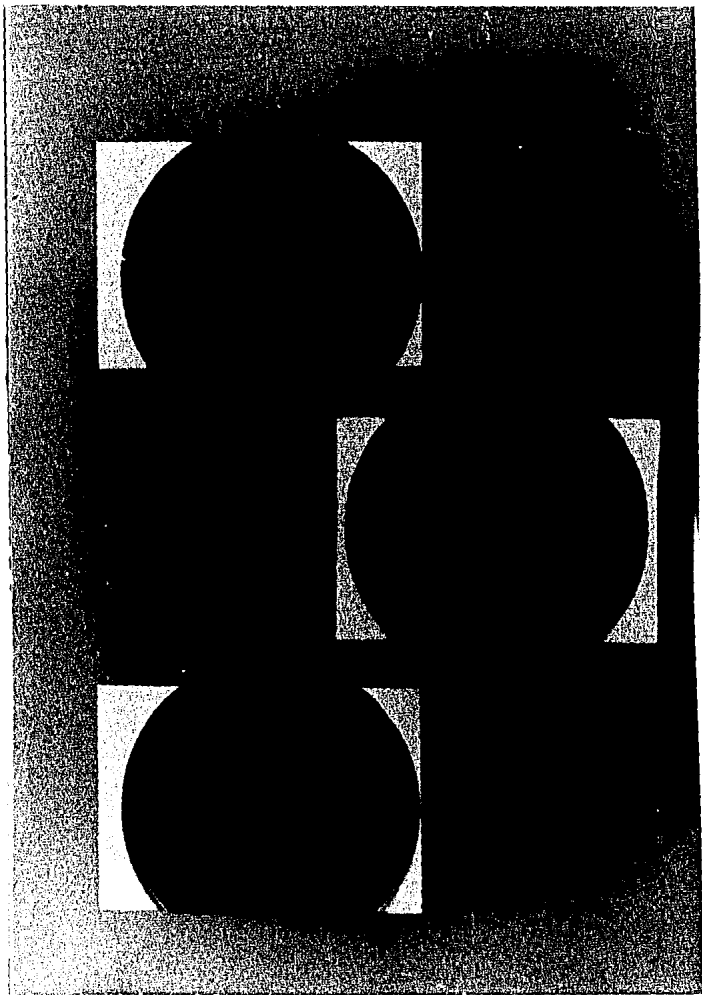
CASO Nº	ATMOSFERAS DE INCUBACION (Área de hemólisis en mm ²)		
	ANAEROBIOSIS	CO ₂ (5-10%)	AEROBIOSIS
51	87.5	60.4	34.4
52	113.9	98.0	86.4
53	135.7	78.3	73.4
54	95.9	73.4	64.3
55	137.7	73.4	60.4
56	80.7	51.0	9.7
57	74.8	25.5	-
Σ	8,027.4	5,458.0	4,581.8

Para fines estadísticos se tomaron todos los valores que dieron alguna medida en el área de sinergismo hemolítico y se excluyeron aquellos casos que no marcaron la prueba de CAMP como positiva.

De acuerdo a los resultados obtenidos hemos notado que de las cepas procesadas en atmósfera de aerobiosis, cuatro de ellas no desarrollaron ningún tipo de hemólisis y fueron reportados con valor de cero (6 negativos), así como dos casos incubados en atmósfera de CO₂ (5-10%) que también dieron negativos. Por otro lado señalamos de manera importante que este fenómeno no sucedió en ninguna

de las pruebas que se metieron a la evaluación en la atmósfera de anaerobiosis estricta.

En las siguientes figuras correspondientes al caso no. 48 se ilustra claramente las diferencias obtenidas en la prueba de CAMP en las condiciones de incubación evaluadas donde se observan -- las diferentes áreas de hemólisis cuyos valores se obtienen por las fórmulas descritas anteriormente.



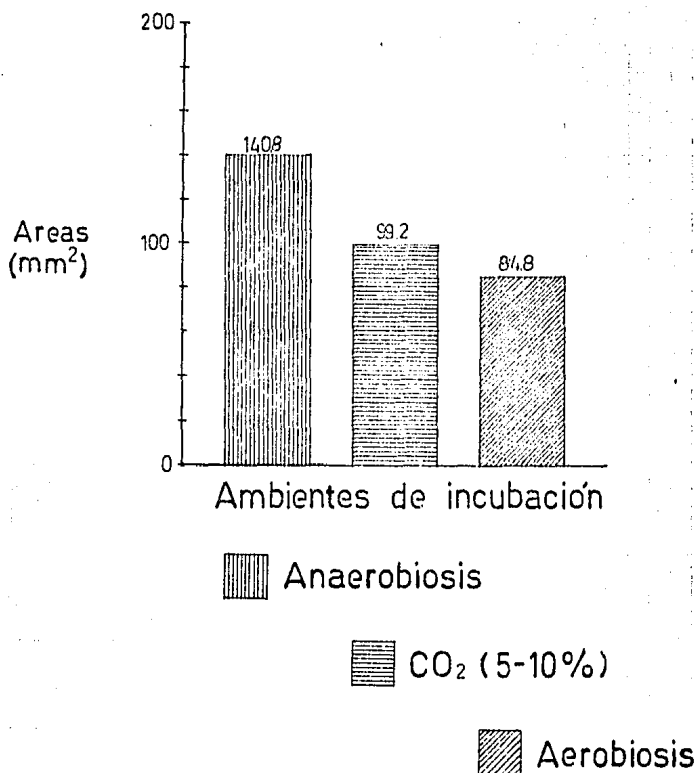
5.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de la prueba de CAMP en las tres diferentes condiciones atmosféricas de incubación, la positividad de la prueba de CAMP fué mucho más clara y evidente en el ambiente de anaerobiosis ya que el promedio del área de sinergismo hemolítico observado en el agar sangre fué mayor para esta atmósfera, correspondiendo a 140.8 mm^2 , mientras -- que para CO_2 (5 - 10%) fué de 99.2 mm^2 y para aerobiosis 84.8 mm^2 , existiendo notable diferencia entre el primero y los dos últimos, demostrando -- con esto que el ambiente de anaerobiosis es mucho más efectivo.

En la revisión de los mecanismos de acción de las estreptolisinas "S" y "O" (sección --- 2.2.2) se señaló que esta última requería un ambiente reducido para su acción; de la misma forma lo demuestran estos resultados debido a que la atmósfera de anaerobiosis influye determinadamente en la realización de la prueba de CAMP.

En este estudio de investigación se confirmaron varios estudios realizados sobre el Factor CAMP y los ambientes de incubación apropiados para la identificación del *Streptococcus agalactiae*; como el realizado por Darling (9) en el que comparó las diferentes condiciones atmosféricas de incubación donde demostró que la zona de hemólisis característica era más evidente a las 5 ó 6 horas en los ambientes de anaerobiosis y CO_2 , mientras -

GRAFICA N° 3



PROMEDIO DEL VALOR DEL AREA DE SINERGISMO HEMOLITICO EN LA PRUEBA DE CAMP OBTENIDO EN LAS DIFERENTES CONDICIONES ATMOSFERICAS DE INCUBACION EN 57 CEPAS DE *Streptococcus agalactiae*.

que en aerobiosis fueron necesarias 18 horas de incubación observando también que la zona de sinergismo hemolítico era dos veces mayor en anaerobiosis, tanto para el estreptococo grupo "B" como para el "A" (9,24).

Conviene señalar sobre un hallazgo posterior al presente estudio ocurrido en el Laboratorio de Patología Clínica del Hospital "Dr. Angel Leaño" de una cepa del grupo "B" clasificada con antisueños específicos, no desarrolló prueba de CAMP positiva en ambiente de aerobiosis, sin embargo, al incubar la misma cepa en ambiente de anaerobiosis desarrolló dicha prueba con bastante claridad (33).

Aunque actualmente se utilizan antisueños específicos para la identificación de los diferentes grupos de estreptococos que facilitan demasiado el trabajo de identificación, hacemos notar que por su elevado costo es muchas veces imposible utilizarlo para este fin en laboratorios de diagnóstico pequeños.

Finalmente concluimos que el ambiente de anaerobiosis es el más adecuado para la identificación del *Streptococcus agalactiae* mediante la prueba de CAMP ya que hay menor probabilidad de obtener falsos negativos en 24 horas, por lo que recomendamos incubar las placas de agar en este ambiente utilizando el método más accesible para el laboratorio de diagnóstico pudiendo ser el de Carl Quist o el de Gas Pack, etc. de acuerdo a las necesidades y facilidades del laboratorio.

6.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anthony, Bascom F. "Carriage of group B streptococcy during pregnancy: A Puzzler". J. Infect. Dis. 1982. 146:6:789-793.
- 2.- Baker, Carol J. et al. "Comparison of bacteriological methods for the isolation of group B -- *Streptococcus* from vaginal cultures". J. Clin. Microbiol. 1976. 4:1:46-48.
- 3.- Benchetrit, Leslie C. et al. "Carriage of ----- *Streptococcus agalactiae* in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil". J. Clin. Microbiol. 1982. 15:5:787-798.
- 4.- Bergey's Manual of Determination Bacteriology. Williams e Wilkins. U.S.A. Seventh edition. --- 1968.
- 5.- Bernheimer, Alan W. et al. "Nature and mecha--- nism of action of the CAMP protein of group B - streptococci". Infect. Immun. 1979. 23:3:833-44
- 6.- Braunstein, Herbert et al. "Identification and significance of *Streptococcus agalactiae* (Lance field group B)". Am. J. Clin. Pathol. 1969. 51: 2:207-213.
- 7.- Brown, J. et al. "CAMP factor of group B streptococci: production, assay, and neutralization by sera from immunized rabbits and experimenta-

- lly infected cows". *Infect. Immun.* 1974. 9:2:--377-383.
- 8.- Burrows Freeman. "Textbook of Microbiology". --- E.U.A. 1979. Cap. 16
 - 9.- Darling, Charles L. "Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material" *J. Clin. Microbiol.* 1975. 1:2:171-174.
 - 10.- Davis, M. D., Bernard, D. et al. "Tratado de Microbiología". Barcelona, España. Segunda edición. Ed. Salvat. 1983. Pp. 730-749.
 - 11.- Facklam, R.R. et al. "Presumptive Identification of group A, B, and D streptococci". 1974. 27:1:107-113. *App. Microbiol.*
 - 12.- Fallon, R.J. "The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic streptococci". *J. Clin Pathol.* 1974.27.902-905.
 - 13.- Ferrieri, Patricia. et al. "Biochemical and immunological characterization of the extracellular nucleases of group B streptococci". *J. Exp. Med.* 1980. 151:56-68.
 - 14.- Ferrieri, Patricia. et al. "Epidemiology of group B streptococcal carriage in pregnant women and newborn infants". *J. Med. Microbiol.* 1977. 10:103-113.
 - 15.- Fuchs, Peter C. et al. "Multiple-inocula (repli

- cator) CAMP test for presumptive identification of group B streptococci". J. Clin. Microbiol. - 1978. 7:2:232-233.
- 16.- Gray, Barry M. et al. "Laboratory and field evaluation of selective media for isolation of --- group B streptococci". J. Clin. Microbiol. 1979 9:4:466-470.
- 17.- Gunn, Bruce. A. et al. "Selective and enhanced recovery of group A and B streptococci from --- throat cultures with sheep blood agar containing sulfamethoxazole and trimethoprim". J. Clin Microbiol. 1977. 5:6:650-655.
- 18.- Gubash, Stevan M. "Synergistic Hemolysis Phenomenon Shown by an Alpha-Toxin-Producing *Clostridium perfringens* and Streptococcal CAMP Factor in Presumptive Streptococcal Grouping". J. Clin Microbiol. 1978. 8:5:480-488.
- 19.- Hoogkamp-Korstanje, Jacomina A. A. et al. "Maternal carriage and neonatal acquisition of --- group B streptococci". J. Infect. Dis. 1982. -- 145:6:800-803.
- 20.- Hwang, Mei-na and Ederer, Grace Mary. "Rapid -- hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci". J. Clin Microbiol. 1975. 1:1:114-115.
- 21.- Jokipii, A.M.M. and Jokipii, Liisa. "Presumptive identification and antibiotic susceptibility of group B streptococci". J. Clin. Pathol. 1976 29:736-739.

- 22.- Jones, Douglas E., et al. "Rapid Identification of pregnant women heavily colonized with group B streptococci". *J. Clin. Microbiol.* 1983. 18:1 558-560.
- 23.- Lynch, M.J. et al. "Métodos de Laboratorio". México. Segunda edición. Editorial Interamericana
- 24.- Mac Faddin, J.F. "Biochemical test for identification of medical bacteria". Second Edition. -- (Williams & Wilkins). Baltimore/London. U.S.A. 1981. Pp. 18-36.
- 25.- Marchlewicz, Ben A. and Duncan, James L. "Properties of a hemolysin produced by group B streptococci". *Infect. Immun.* 1980. 30:3:805-813.
- 26.- Merritt, Katharine and Jacobs, Nicholas J. "Improved medium for detecting pigment production by group B streptococci". *J. Clin. Microbiol.* - 1976. 4:4:379-380.
- 27.- Merritt, Katharine et al. "Rapid recognition of group B streptococci by pigment production and counterimmunoelectrophoresis". *J. Clin. Microbiol.* 1976. 3:3:387-290.
- 28.- Milligan, Thomas W. et al. "Extracellular Neuroaminidase production by group B streptococci". *Infect. Immun.* 1977. 18:1:189-195.
- 29.- Salas M. T. "Alteraciones en la producción de beta hemólisis del Estreptococo grupo A en diferentes condiciones atmosféricas de incubación" Tesis recepcional para obtener el título de ---

Q.F.B. Guadalajara, Jal. 1982.

- 30.- Topley and Wilson's. "Principles of Bacteriology" Virology and Immunity. Vol. 1, U.S.A. Seventh edition. Ed. Arnold. 1961.
- 31.- Villalobos A. L. V. "Evaluación de un medio de cultivo selectivo para el primoaislamiento del estreptococo del grupo B en 100 muestras de exudado vaginal". Tesis recepcional para obtener el título de Q.F.B. Guadalajara, Jal. 1984.
- 32.- Wilkinson, Hazel W. "CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci", J. Clin. Microbiol. 1977. 6:1:42-45.
- 33.- Comunicación verbal. Dr. Alejandro Humberto -- Cruz Luna. Sección Microbiología. Lab. de Patología Clínica Hospital "Dr. Angel Leño". Enero 1986.

copi•offset express

TESINAS • MEMORIAS • INFORMES
AV. MEXICO No. 2210
Casi Esquina Con America
Tel. 15-19-68

GUADALAJARA, JAL.
COPIAS Y TESIS
TRANSCRIPCIONES
HELIOGRAFICAS
ENCUADERNACION
ENGARGOLADOS
REDUCCIONES
ENMICADOS
IMPRESIONES DE:
FORMAS INTERNAS
FACTURAS, VOLANTES
PASAJOS, BU TIPS
EN MAQUINA OH



USAMOS EQUIPO XEROX Y OFFSET

• SERVICIO DE
• SERVICIO DE
• SERVICIO DE

HELIOGRAFICAS

• COPIAS ISO
• PAPELERA PARA SU EMPRESA
• REDUCCIONES
• AMPLIFICACIONES