

15 24



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

**“ESTUDIO DE UN MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO Y ENRIQUECIDO
PARA EL AISLAMIENTO DE ESTREPTOCOCOS
BETA HEMOLITICOS”**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

presentan:

**IRENE RAMIREZ MUÑOZ
RUBEN VAZQUEZ ZUÑIGA**

MEXICO, D. F. 1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

	Págs.
CAPITULO I	
A.- INTRODUCCION	2-3
B.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3-4
C.- OBJETIVOS	4-5
D.- HIPOTESIS	5
CAPITULO II	
GENERALIDADES	7-25
CAPITULO III	
MATERIALES Y METODOS	27-39
CAPITULO IV	
RESULTADOS	41-52
CAPITULO V	
DISCUSION DE RESULTADOS	54-61
CAPITULO VI	
CONCLUSION	63
CAPITULO VII	
BIBLIOGRAFIA	65-69

CAPITULO I

INTRODUCCION

Y

OBJETIVOS

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

Los estreptococos deben diferenciarse e identificarse por varias razones. Cerca del 35% de todas las infecciones de las vías respiratorias superiores son causadas por estreptococos beta hemolíticos; las restantes son causadas por virus (1,2) .

En vista de que no hay signos o síntomas clínicos específicos -- asociados con las infecciones de las vías respiratorias superiores -- por estreptococos o por virus, el cultivo y la confirmación de la presencia o ausencia de estreptococos beta hemolíticos son los únicos medios para determinar la causa de la enfermedad (1,2) .

Una cierta proporción de los pacientes con faringitis causada -- por estreptococos del grupo A desarrollan fiebre reumática aguda si no reciben el tratamiento adecuado (1,3) .

La fiebre reumática aguda puede prevenirse si se identifica y se da un tratamiento adecuado a los pacientes con infecciones estreptocócicas (4).

Cuando ocurren brotes de faringitis estreptocócica e impétigo se observan con más frecuencia las llamadas secuelas post-estreptocócicas: fiebre reumática y glomerulonefritis agudas (1) . Deben identificarse y tratarse los portadores al igual que los pacientes enfermos si se ha de controlar la diseminación de la enfermedad (1,2,4) .

Se ha observado últimamente un aumento de las enfermedades causadas por estreptococos del grupo B entre los recién nacidos, por lo -- cual se hace indispensable la identificación de portadoras maternas de estreptococos del grupo B, para evitar el riesgo de que los neonatos -- adquieran estos microorganismos (1,5) .

Butter y de Moor (6) encontraron que aproximadamente el 10% de --

individuos sanos actúan como portadores de estreptococos del grupo B, y el 9% de mujeres parturientas portan los microorganismos en garganta , vagina y pezones y además los recién nacidos los portan en ombligo.

La meningitis del recién nacido debida a estreptococos del grupo B se ha incrementado , y fué en 1978 la causa principal de meningitis durante los primeros dos meses de vida (6,7) .

En ciertas ocasiones, estreptococos de los grupos C y G están involucrados en infecciones humanas, como son infección del conducto -- respiratorio y del genital, además de que es frecuente en bacteremias e infecciones extrarrespiratorias (8,9) .

Planteamiento del problema :

Un problema que se ha venido planteando desde tiempo atrás, en cuanto al aislamiento de estreptococos beta hemolíticos , es su recuperación en los medios utilizados de rutina, durante el periodo de -- convalecencia o después de la terapia con antibióticos, así como también la presencia de un gran número de contaminantes, esto ha originado que los bacteriólogos fracasaran con frecuencia en sus intentos -- por aislarlos. Tales fracasos indicaron la necesidad de un mejor medio de cultivo y de procedimiento para estreptococos beta hemolíticos -- (10) .

Varios tipos de medios de cultivo enriquecidos o selectivos han sido recomendados, pero ninguno de ellos , con la excepción del caldo-Todd Hewitt, tienen éxito en cultivar estreptococos beta hemolíticos -- sin sangre animal (10) .

Nakamizo y Sato (10) idearon un nuevo medio de cultivo con el propósito de obtener selectivamente estreptococos beta hemolíticos en un número creciente de exudados faríngeos.

Este medio (10) consiste de : un caldo enriquecido y un medio de agar sangre modificado. El nuevo caldo reemplaza la sangre animal con carbón activado, usa una alta concentración de NaCl(3%), saponina, DL-alcanfor y acida de sodio como agentes inhibidores contra contaminantes e incluye ureasa como agente estimulante para el crecimiento de estreptococos beta hemolíticos. El agar sangre modificado contiene urea para promover el crecimiento de estreptococos beta hemolíticos y además cristal violeta , que inhibe la proliferación de estafilococos.

Objetivo :

Por la importancia de la identificación del agente etiológico de las infecciones del conducto respiratorio superior, este estudio evaluará un medio selectivo y enriquecido para incrementar el aislamiento de estreptococos beta hemolíticos , correlacionando la proporción de éxito en aislamiento de estreptococos beta hemolíticos en el medio estudiado con métodos de rutina.

La identificación de los estreptococos beta hemolíticos sospechosos de pertenecer al grupo A, se hará por métodos serológicos y por no serológicos.

Se determinará el título de antiestreptolisinas para correlacionarlo con el aislamiento e identificación de estreptococos beta hemo-

líticos.

Hipótesis :

Los estreptococos beta hemolíticos son bacterias muy exigentes - en sus necesidades nutricionales y por lo tanto muy difíciles de cultivar. Si se agregan al medio de cultivo sustancias de enriquecimiento , sustancias que inhiban la proliferación de otros microorganismos y además agentes estimulantes para su crecimiento, nosotros esperamos que la frecuencia de aislamientos selectivos de estreptococos beta hemolíticos , sea mayor en nuestro medio estudiado que en el método clásico de agar sangre .

CAPITULO II

GENERALIDADES

EL ESTREPTOCOCO

A.- Historia.

Los estreptococos son microorganismos que están involucrados en varios procesos y la complejidad de sus relaciones con el huésped, - los hacen de las bacterias patógenas más interesantes de la bacteriología médica .

Los estreptococos se describieron por primera vez en exudado purulento de enfermos de erisipela (Billroth, 1874) y de fiebre puerperal (Pasteur, 1875); desde entonces han sido objeto de estudio por varios autores (11, 12, 13) .

Fehleisen (1883) lo cultivó en el laboratorio y comprobó su relación con la producción de pus. Propuso una clasificación basada en el tipo de enfermedad para los patógenos y la fuente de aislamiento para los no patógenos, denominándolos : Streptococcus erysipelas, Streptococcus equi, Streptococcus lactis y Streptococcus epidermidis; los dos últimos todavía se aceptan como especies; microorganismos idénticos - se aíslan de diversas enfermedades y productos (11, 14) .

B.- Clasificación .

En la actualidad es difícil de diferenciarlos por simple morfología colonial o por observación de estreptococos en bacterioscopia directa de material purulento (11, 14) .

Brown (1919) propuso una clasificación basada en la capacidad de las cepas para lisar glóbulos en agar sangre encontrando 3 grupos : - alfa hemolítico o estreptococo viridans, beta hemolítico o estreptococo hemolítico y gama hemolítico o estreptococo anhemolítico, esta cla-

sificación se emplea actualmente desde el punto de vista práctico (9, 11, 12, 13) .

Lancefield(1928) propuso una clasificación en grupos serológicos de acuerdo a la presencia de un antígeno en la pared celular del estreptococo, de naturaleza polisacárida y lo denominó sustancia C por su analogía con la sustancia encontrada en el neumococo, con excepción del estreptococo viridans que no posee ningún grupo serológico específico de los conocidos hasta hoy (9, 11, 13, 14) .

Existe otra clasificación en grupos basada en la hemólisis en agar sangre, el efecto sobre diversos azúcares, la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas y valores distintos de pH, la hidrólisis del hipurato y otras pruebas ; resultando cuatro grupos: piogénico , viridans, enterococo y láctico . La especie se determina de acuerdo a la actividad bioquímica y características de crecimiento (1, 11, 14) (CUADRO I) .

Los estreptococos beta hemolíticos se clasifican en diferentes grupos, en relación con la estructura química del carbohidrato contenido en la pared celular; los diversos grupos se denominan A, B, C hasta la letra T. Existen aproximadamente 70 diferentes tipos de estreptococos beta hemolíticos del grupo A ; estas diferencias están dadas por la variedad de la proteína M dentro de la pared celular . Esta proteína M representa el antígeno más importante del estreptococo y su virulencia depende del mayor o menor contenido de esta proteína (12, 15) .

CUADRO I Identificación presuntiva de estreptococos sobre la base de observaciones fisiológicas .(1)

Hemólisis	Beta	Beta	Beta	Alfa beta ninguno	Alfa ninguno	Alfa ninguno	Alfa
Susceptibilidad a la bacitracina	+	-	-	-	-	-	+
Hidrólisis del - nipurato o reac- ción CAMP	-	+	-	-	-	-	-
Hidrólisis de la bilis esculina	-	-	-	+	+	-	-
Tolerancia al NaCl al 6.5%	-	+	-	+	-	-	-
Susceptibilidad a la optoquina o solubilidad en bilis	-	-	-	-	-	-	+
Identificación presuntiva	Grupo A	Grupo B	Beta he molíti- cos no pertene cientes a los - grupos A,B ni D	Enteroco cos del Grupo D	No entero cocos del Grupo D	Viri- dans	Pneumo- cocos.

C.- Morfología .

Los estreptococos pertenecen a la familia Streptococcaceae, género Streptococcus . Son cocos redondos u ovales, dispuestos en cadena . Esta disposición característica la presentan preferentemente cuando se cultivan en medios líquidos , en los exudados de las lesiones y en la sangre en los casos de septicemia (13,14) .

Frecuentemente se ven en parejas, como diplococos; esto debido a que a veces tienen forma oval, como algunos tipos de neumococos, cuya agrupación característica es en pares, hace necesario recurrir a otros procedimientos para diferenciar a estos dos microorganismos . Son gram positivos, no esporulados e inmóviles (13) .

D.- Fisiología y Metabolismo .

Son organismos exigentes que se desarrollan mejor en medios que contengan sangre, suero o líquidos que contengan sustancias indispensables para su crecimiento (16) .

Para el aislamiento de los antígenos específicos y de las enzimas extracelulares debe utilizarse un medio que contenga sólo los componentes dializables del complejo de infusión de carne peptonada, para eliminar los componentes macromoleculares que podrían confundirse con los productos de los organismos. Algunos péptidos aportados por este medio han demostrado ser indispensables para el crecimiento óptimo, pero no existe un requerimiento específico de péptidos (13,16) .

Son quimioorganotrofos; de metabolismo fermentativo y el principal producto final de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico . Son benzidina y catalasa negativa. Son aerobios y anaerobios facul-

tativos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C; las temperaturas máximas y mínimas varía con la especie. El contenido de G+C del ADN (señalado para 15 especies) es de 33-42% de mol (9,13,14).

E.- Antígenos Celulares .

Además del antígeno que es base para la clasificación de Lancefield, tenemos que la virulencia de las cepas se considera que está relacionada con un antígeno de naturaleza proteica, tipo específico llamado proteína M, en parte se atribuye también a la presencia del ácido hialurónico (11,13,14).

El ácido hialurónico es un compuesto capsular, no antigénico, participa en forma muy importante impidiendo la fagocitosis de los estreptococos beta hemolíticos del grupo A que lo presentan (11,12).

La proteína M ha sido tema de recientes investigaciones en cuanto a especificidad y a la virulencia de las cepas aisladas, teniéndose conocimiento de 63 serotipos, mismos que se pueden diferenciar e identificar por medio de las pruebas siguientes: aglutinación, hemaglutinación poder bactericida, protección al ratón y fijación del complemento usando sueros específicos (11).

La especificidad de la proteína M se ha tratado de aprovechar en la elaboración de vacunas que estimulen una buena respuesta en anticuerpos y que alteren en alguna forma a los estreptococos infectantes, facilitando la fagocitosis, el empleo de vacunas es difícil debido a que pueden presentarse varios tipos serológicos en una población (11, 12, 17).

Desde el punto de vista epidemiológico se considera importante - la proteína M en cepas epidémicas relacionadas con casos de fiebre - reumática ;sin embargo ,todas ellas se consideran potencialmente reumatogénicas (11,18) .

Estudios recientes han demostrado que los serotipos potencialmente capaces de producir fiebre reumática son el 2,6,11 y 12;el serotipo 11 se presentó en casos asintomáticos y en glomerulonefritis aguda (19) .

La diferenciación de las cepas del grupo A de Lancefield se hace en base a la tipificación de antígenos M y T (9) .

La proteína T no es única, sino es una designación que agrupa a diferentes proteínas resistentes a la digestión por enzimas proteolíticas como son pepsina y tripsina (12,14) .

La proteína R que se describe en los tipos 3 y 28 participa en algunas reacciones de aglutinación ,se encuentra presente en algunas cepas de los grupos B,C y G (12,14) .

Los antígenos E y F son precipitógenos muy relacionados con la proteína M y se encuentra en el tipo 17,jugando un papel importante en la virulencia de las cepas de Streptococcus pyogenes (11) .

La proteína B aparentemente bloquea la formación de anticuerpos M (12) .

El polisacárido C ocupa el 10% del peso seco del organismo,está constituido de ramnosa y hexosamina con enlaces (α 1,3) unido al mucopéptido por puentes de alanina. La especificidad está dada por un residuo de n-acetil glucosamina en el grupo A y de n-acetil galactosamina en el grupo C (Fig. 1) .

Los diferentes polisacáridos pueden dar reacción cruzada entre - diversos tipos serológicos y algunos tejidos de mamíferos. Matsuno(12) estudió otro polisacárido compuesto de glucosa y n-acetil glucosamina además de un polímero de ácido teicoico en estreptococos del grupo A-tipo 3.

F.- Productos Extracelulares .

La gran variedad de procesos patológicos producidos en el hombre por los estreptococos beta hemolíticos del grupo A puede estar en relación con el elevado número de productos extracelulares que estos - organismos son capaces de producir (12,13,16) .

Se conocen alrededor de 30 ,la mayoría de ellos en experimenta - ción animal y utilizándolos a dosis elevadas pueden llevar a cuadros - de : vasculitis,carditis,necrosis miocárdica,artritis ,etc. (20) .

Muchos de estos metabolitos bacterianos extracelulares son anti - génicos y provocan en el organismo infectado la formación del anti - cuerpo específico correspondiente (TABLA I). De entre todos los - identificados ,los que se citan a continuación parecen tener mayor - significación patogénica (12,16) .

La estreptolisina O es antigénica y la determinación del título - correspondiente de anticuerpos es la prueba serológica más utilizada - para ayudar al diagnóstico de la infección estreptocócica .Las cepas - que la producen tienen como sustrato los eritrocitos y los leucocitos a los cuales lisa. La estreptolisina O se llama así por ser oxígeno - lábil.Oxidada es inactiva,pero al reducirse readquiere su actividad - (16) .

TABLA I
PRODUCTOS EXTRACELULARES DE LOS ESTREPTOCOCCUS ETA HEMO
LITICOS.

	ESTIMULA LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS.
TOXINAS ERITROGENICAS (A,B y C)	+
ESTREPTOLISINA O	+
ESTREPTOLISINA S	-
DIFISFOPIRIDINNUCLEOTIDASA	+
ESTREPTOCINASA (A y B)	+
DESOXIRRIBONUCLEASAS (A,B,C y D)	+
HYALURONIDASA	+
PROTEINASA	+
AMILASA	?
ESTERASA	-

Tomado de Davies, 1977.

La estreptolisina S (difusible en el suero) es hapténica, tiene por sustrato sólo a los glóbulos rojos, es oxígeno estable (16) .

Las toxinas eritrogénicas (A, B y C) causan el eritema característico de la escarlatina; además de las cepas del grupo A también la producen algunas cepas de los grupos C y G . Exhibe gran actividad pirogénica por la liberación de pirógeno endógeno, es antigénica produciendo anticuerpo neutralizable, esta toxina es capaz de bloquear la respuesta anamnésica y deprimir la respuesta del sistema retículo-endotelial, ambos considerados mecanismos antimicrobianos importantes del huésped (12,16,20) .

La estreptocinasa activa el plasminógeno del suero hacia plasmina, la cual digiere los coágulos de fibrina, facilitando la diseminación del estreptococo (16) .

La hialuronidasa permite la despolimerización del ácido hialurónico facilitando la diseminación del estreptococo (13,16,20) .

La desoxirribonucleasa está formada por 4 proteínas inmunológicamente diferentes al anticuerpo que se forma, tiene títulos más elevados en la glomerulonefritis y tiende a persistir durante más tiempo en el organismo que las antiestreptolisinas (20) .

G.- Patogenicidad .

Enfermedades tales como la erisipela, escarlatina, faringitis epidémica, impétigo estreptocócico, fiebre puerperal, caries dental, estomatitis, aftosa recurrente, endocarditis bacteriana subaguda, glomerulonefritis hemorrágica aguda y fiebre reumática, con sus tres manifestacio

nes clínicas principales de poliartritis, cardiopatía y corea de Sydenham, bastan para comprender la importancia que los estreptococos tienen para la patología humana, recordando también que el humano es el huésped más susceptible para uno de los grupos más importantes de estreptococos (16).

La infección estreptocócica se puede separar en dos grandes grupos.

- 1.- Infecciones estreptocócicas supurativas.
- 2.- Infecciones estreptocócicas no supurativas.

La infección supurativa está condicionada a la capacidad invasora del microorganismo y a la resistencia a la fagocitosis de las cepas virulentas producida por la presencia de proteína M o ácido hialurónico capsular.

Las lesiones supurativas pueden ser difusas como la celulitis o localizadas como el absceso. Se inicia en diversas puertas de entrada, desde donde se disemina por vías linfáticas y sanguínea, pudiendo provocar bacteremias graves (12).

En cuanto a su transmisión, es directa, el hacinamiento favorece en gran medida el contagio, que se realiza de boca a boca por secreciones respiratorias, en tanto que, los fomites son agentes menos efectivos, ya que de ellos se aíslan numerosas cepas avirulentas.

Las infecciones no supurativas son aquellas enfermedades que se presentan como secuelas tardías de una infección estreptocócica. Las dos entidades clínicas más importantes entre éstas son: Glomerulonefritis aguda y fiebre reumática. De la primera solo mencionaremos que unos cuantos tipos serológicos tienen capacidad nefritogénica con daño al nefrón. Entre éstas, las que más frecuentemente se citan son los tipos 4, 12, 49, 52 y 55 (12).

Durante un brote epidémico de faringitis, el 3% de la población infectada puede presentar un ataque reumático ; esta cifra disminuye - al 0.33% en escolares no tratados y durante las épocas endémicas(1,3).

Está demostrado que el ataque repetido de faringitis en individuos susceptibles con antecedentes reumáticos lleva a los enfermos a una recaída de consecuencias graves (1,12) .

La relación de la fiebre reumática con estreptococos beta hemolíticos del grupo A ha sido demostrada por datos clínicos, epidemiológicos , serológicos y terapéuticos. Al contrario de la escarlatina, en la fiebre reumática no se ha encontrado relación con un metabolito de terminado.

Son pues, los estreptococos beta hemolíticos y el terreno genético los que condicionan la presentación de fiebre reumática. Todavía - no se ha aclarado qué es lo que se hereda; muy probablemente sea la - condición de hiperreactor al estímulo antigénico de la proteína M que como ya se ha dicho , es la que provoca la formación de anticuerpos - protectores tipo específicos (16) .

Como el estreptococo es un microorganismo que está en nuestro ambiente , el individuo que responde normalmente a este estímulo antigénico en los años de la infancia habrá formado ya anticuerpos protectores para los distintos tipos de su ambiente, evitando así las infecciones repetidas y prolongadas (16) .

Por el contrario, en los individuos genéticamente predispuestos - estarían, según la hipótesis anterior, condicionados a las infecciones repetidas y prolongadas por los mismos tipos de estreptococos .

El hecho de que la fiebre reumática requiere de un periodo de in

incubación prolongado sugiere el establecimiento de un proceso inmunológico complejo, pero no de la naturaleza de la hipersensibilidad, por cuánto este periodo de incubación no se reduce con los brotes repetidos (1,4) .

Son varias las teorías que se han propuesto para explicar las lesiones de la fiebre reumática. Las de mayor aceptación son :

1) El mucopéptido tóxico, extraído de la pared celular de los estreptococos del grupo A y 2) La teoría de la autoinmunidad, según la cual hay glucoproteínas comunes de los estreptococos del grupo A y las válvulas del músculo cardíaco y que también se encuentran en las articulaciones (1,16) .

H.- Métodos generales de rutina para cultivo y aislamiento.

1.- Obtención :

a.- Hisopos.- Existen varias clases de hisopos para obtener muestras de la garganta, lesiones cutáneas y de heridas. Aunque varios investigadores han expresado preocupación acerca de la posibilidad de que sustancias tóxicas en los hisopos de algodón puedan matar algunas de las bacterias, no se ha sustentado la base para esa preocupación (1,21) .

Estudios en que se han comparado las tasas de recuperación de los estreptococos de los hisopos hechos de algodón, dacrón, fortrel, alginato de calcio y algodón tratado con fibras de alcohol polivinílico no muestran diferencias apreciables en los niveles de recuperación. En consecuencia pueden utilizarse los hisopos más económicos disponibles (21,22) .

b.- Toma de muestra faríngea .- El exudado de la garganta deberá tomarse con un aplicador con punta de algodón o de dacrón que se frota enérgicamente contra las dos regiones amigdalinas y la pared posterior de la faringe . La lengua deberá bajarse con un abatelenguas; la faringe debe ser claramente visible y estar bien iluminada; se evitará tocar la lengua o los carrillos con la punta del aplicador para que no se contamine con microorganismos no faríngeos que puedan diluir la flora faríngea o enmascararla en el cultivo (1,20) .

2.- Transporte .

El método de transporte del hisopo al laboratorio depende de :

a.- La fuente de la muestra.

b.- El tiempo que se espera que la muestra esté en tránsito.

c.- El criterio del médico que remite la muestra y el del Químico Analista , los cuales antes de iniciarse los procedimientos de laboratorio deben decidir la extensión del exámen bacteriológico necesario - para cada muestra de cada origen, así como de las bacterias que consideraran que son patógenas de las vías respiratorias superiores.

Pueden utilizarse procedimientos y medios especiales en algunas - situaciones pero no en otras . Si se toma la muestra de la garganta, - generalmente solo se consideran patógenos los estreptococos beta hemolíticos y el Corynebacterium diphtheriae .

A veces se considera patógeno el Haemophilus influenzae, especialmente en los niños pequeños , para lo cual se debe de realizar trabajos bacteriológicos especiales para las muestras de estos pacientes. Si los estreptococos son los únicos organismos que se buscan en los hisopos , puede utilizarse el sistema de transporte descrito en el CUADRO - II. (1) .

CUADRO II	
METODOS DE TRANSPORTE PARA HISOPOS CON ESTREPTOCOCOS	
PERIODO DE TRANSITO	SISTEMA DE TRANSPORTE
0-2 horas	NINGUNO
2-24 horas	STUART O AMIES
1 o varios días	GEL DE SILICE

Tomado de (1) .

3.- Selectividad y Enriquecimiento .

El enriquecimiento de los hisopos que se han de transportar aumenta la recuperación de estreptococos beta hemolíticos. Ello se realiza colocándolos en un medio de caldo de cultivo durante un periodo determinado antes de sembrarlos en agar sangre (21,23) .

Algunos médicos tienen dudas acerca de esta técnica , así como la utilización de inhibidores selectivos en los medios de caldo y de agar sobre la base de que el cultivo resultante no es verdaderamente representativo de la enfermedad del paciente. Sin embargo, no todos los clínicos o investigadores comparten este criterio (1) .

En realidad algunos han expresado la opinión de que todo paciente que presenta cultivos con estreptococos del grupo A debe ser tratado independientemente del número de colonias que aparezcan en las placas primarias de agar sangre (1,2) .

Cualquier buena base de caldo de infusión es satisfactoria para el enriquecimiento. La infusión de corazón, la infusión de soja y triplicasa, la infusión de Todd Hewitt y la infusión de cerebro corazón son algunos de los caldos de cultivo que se utilizan comúnmente (24) .

Se han utilizado inhibidores selectivos como cristal violeta y ácido de sodio (23), NaCl (25) y diversos antibióticos entre otros como inhibidores de cultivo de caldo o de agar sangre. Se han notificado la utilización de bases de agar y de caldos de cultivo como son: agar sangre con gentamicina (26), agar sangre que contiene polimixina, neomicina y ácido fusídico (27), caldo enriquecido que contiene colistina y ácido nalidixico (28), agar sangre con sulfamethoxazole y trimethoprim (29, 30, 31, 33, 34) , para aislar los estreptococos de hisopos altamente con-

taminados.

Estos medios selectivos y enriquecidos son útiles en estudios epidemiológicos de estreptococos aislados de quemaduras, vagina, recto y de otras partes (1) .

I.- Identificación .

En la identificación de estos organismos son aplicables los dos métodos generales específicos de las enfermedades infecciosas: Los bacteriológicos y los serológicos ,es decir el aislamiento e identificación de bacterias y la demostración en el suero de los enfermos de títulos altos de anticuerpos específicos para los componentes y metabolitos antígenicos de los estreptococos (16) .

1.- Identificación presuntiva de estreptococos por métodos no serológicos (bacteriológicos):

- Sensibilidad a la bacitracina
- Presencia del factor de monofosfato de adenina cíclica (CAMP) o
- hidrólisis del hipurato de sodio.
- Hidrólisis de la esculina en presencia de bilis al 40%.
- Tolerancia al caldo con NaCl al 6.5% (1,8) .

Una prueba usual presuntiva para la diferenciación de estreptococos beta hemolíticos grupo A, de otros grupos, es la prueba de la bacitracina ,introducida primero por Haxted y modificada por Levinson y Frank (1,3,11) .

La prueba depende de la inhibición selectiva de los estreptococos beta hemolíticos grupo A en una placa de agar sangre por un disco de papel conteniendo 0.04 unidades de bacitracina (1,3,9,11,24) .

Al efectuar la prueba de la bacitracina ,deben observarse los siguientes puntos :

- 1.- Emplear discos diferenciales, no de susceptibilidad.
- 2.- Emplear un inóculo abundante.
- 3.- Emplear un cultivo puro.
- 4.- Emplear solo estreptococos beta hemolíticos.
- 5.- Interpretar toda zona de inhibición de crecimiento como indicación positiva, independientemente de su tamaño.
- 6.- Emplear una base de agar de infusión con 5% de sangre de carnero (1,8,9) .

Para diferenciar grupos B,C y D, así como neumococos y viridans - se utilizan las pruebas de hidrólisis del hipurato de sodio, hidrólisis de la esculina ,tolerancia al caldo con NaCl al 6.5% y la prueba de la optoquina (1,8) .

2.- Identificación de estreptococos por métodos serológicos :

- Prueba de la precipitina .
- Anticuerpos fluorescentes .
- Contraelectroforesis .
- Coagulación .

El mejor método para identificar los estreptococos consiste en - cultivar colonias puras y aisladas del organismo infectante, extraer el carbohidrato del grupo y demostrar una reacción serológica entre el an tígeno extraído y el antisuero específico del grupo (1) .

Entre los métodos para extraer los antígenos de grupo de los es - treptococos ,tenemos los siguientes :

- Extracción con ácido caliente de Lancefield .
- Extracción con formalina caliente de Fuller .
- Extracción con autoclave de Rantz y Randall .
- Extracción con ácido nitroso de Kholy .
- Extracción con enzima de Streptomyces albus ,Maxted .
- Extracción con pronasa B de Ederer .
- Extracción con enzima lisozima de S. albus de Watson .

Estos métodos difieren considerablemente entre sí en complejidad y eficacia, teniéndose como método estándar al de Lancefield y al de Rantz y Randall como el más práctico (1) .

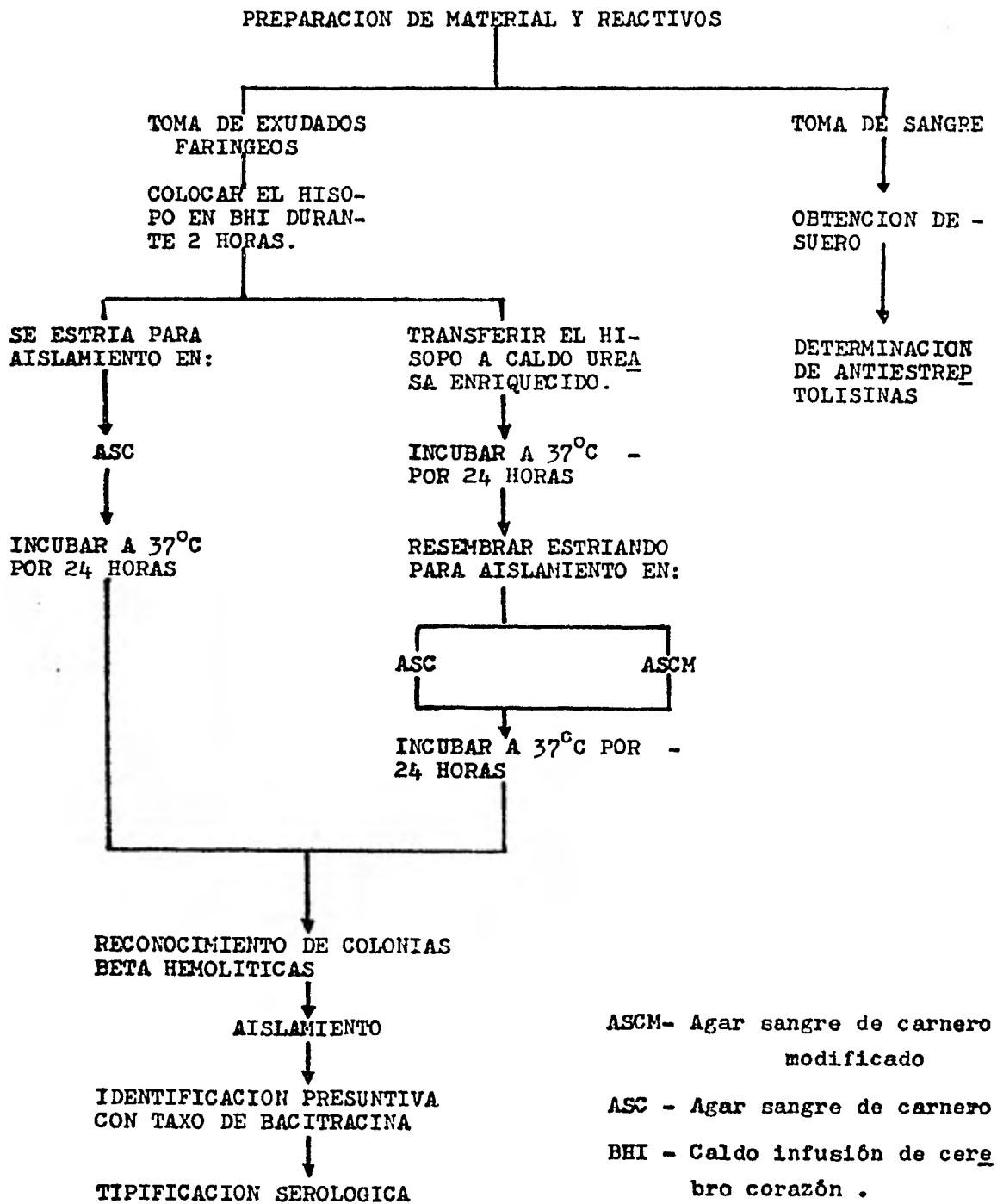
CAPITULO III

MATERIAL

Y

METODOS

" DIAGRAMA DE TRABAJO "



MATERIAL :

- Cajas de Petri (15x100)
- Caja de portaobjetos
- Frascos ámbar
- Matraces aforados (100 ml)
- Matraces Erlenmeyer graduados (50, 125, 500 y 1000 ml)
- Pipetas bacteriológicas
- Pipetas pasteur
- Probetas (125 ml)
- Termómetro(-10 a 200°C)
- Tubos capilares
- Tubos cónicos de 55 ml
- Tubos de ensaye (13x100)
- Tubos de ensaye con tapón de baquelita

- Algodón
- Asas bacteriológicas
- Espátula de acero(3 pulgadas de largo)
- Escobillones para tubos de ensaye y matraces
- Gradillas de alambre
- Guantes para esterilizar
- Marcadores
- Masking tape de 2 cm de ancho
- Papel cera film
- Papel pH
- Picetas de 200 ml de capacidad
- Plastilina

- Hisopos estériles
- Papel para lentes
- Pinzas

EQUIPO :

- Autoclave
- Balanza analítica Mettler
- Balanza granataria Beckman
- Baño maría
- Centrifuga clínica
- Estufa
- Incubadora
- Microscópio compuesto
- Refrigerador

REACTIVOS :

- Agua destilada
- Alcohol absoluto
- Antisueros para la determinación serológica de grupos de -
estreptococos
- Acida de sodio
- Carbón activado
- Cloruro de sodio
- Cristal violeta
- DL-alcanfor

- Estreptolisina "O"
- Glóbulos rojos
- Polvo de extracto de levadura de cerveza
- Sangre de carnero defibrinada y estéril
- Saponina
- Solución amortiguadora (NaCl 0.85%)
- Triptosa
- Urea
- Ureasa (Merck)

MEDIOS DE CULTIVO :

- Agar infusión cerebro corazón
- Base para agar sangre
- Caldo infusión cerebro corazón
- Caldo Todd Hewitt

PREPARACION DE REACTIVOS

1.- Preparación del caldo infusión cerebro corazón(BHI)

Medio BHI(Bioxón)	37 g
Agua destilada	1000 ml

Suspender el medio en el agua destilada, calentar ligeramente, distribuir 2 ml del medio en tubos de 13 x 100, esterilizar en autoclave - a 121°C durante 15 minutos (24) .

2.- Preparación del caldo Todd Hewitt.

Medio de Todd Hewitt	30 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver 30 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada
Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs. de presión) durante 15 minutos (24) .

3.- Preparación de agar sangre de carnero convencional.

Base de agar sangre(Bioxón)	40 g
Sangre de carnero desfibrinada(hemoderivados)	50 ml
Agua destilada	1000 ml

Disolver el agar en agua destilada,mezclar y remojar de 10 a 15 - minutos , calentar agitando constantemente,hervir durante 1 minuto ,esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos ,enfriar a 45°C,agregar la sangre .Distribuir en cajas de petri. Se conservan en refrigeración hasta por 2 semanas (24) .

4.- Preparación del caldo ureasa enriquecido .

Parte A:

Caldo infusión cerebro corazón(en polvo)	2.5 g
Triptosa	0.5 g
Extracto de levadura de cerveza(en polvo)	0.4 g
Cloruro de sodio	2.7 g
Carbón activado	0.2 g
Agua destilada	100 ml

Parte B :

Saponina	0.1 g
Ureasa (Merck)	0.1 g

Parte C :

Solución acuosa de acida de sodio al 0.1%	10 ml
Solución de DL-alcanfor al 10% en alcohol absoluto	0.5 ml

Esterilizar la parte A en autoclave a 121°C durante 15 minutos, - adicionar la parte B y mezclar, calentar a 100°C durante 7 minutos en baño maría y agitar vigorosamente para disolver completamente la ureasa y procurar que no se adhiera a la boca del matraz. Enfriar el caldo rápidamente con agua corriente y ya a la temperatura ambiente adicionar la parte C. Finalmente se colocan 5 ml de caldo ureasa enriquecido en tubos de ensayo con tapón de baquelita, estériles (10).

5.- Preparación del agar sangre de carnero modificado .

Parte A :

Agar infusión cerebro corazón	4.0 g
Extracto de levadura de cerveza(en polvo)	0.5 g
Cloruro de sodio	2.5 g
Agua destilada	100 ml

Parte B :

Solución acuosa de acida de sodio al 0.1%	10 ml
Solución acuosa de cristal violeta al 0.1%	0.2 ml
Urea	1.0 g

Después de que la parte A se esteriliza a 121°C durante 15 minu-

tos, se añade inmediatamente la parte B. Se enfría hasta 50°C y se --
añade la sangre de carnero en una proporción del 5%, se mezcla bien y --
se distribuye en cajas de petri estériles .

TOMA Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA .

La muestra se tomó utilizando un hisopo de algodón estéril; se le --
indicó al paciente que abriera la boca , se deprimió su lengua con un --
abatelenguas de madera, estéril, se hizo un raspado de faringe y amig --
dalas (o fosa amigdalina), sobre las áreas de exudación, inflamación y --
ulceración (1,20) . Enseguida se introdujo el hisopo en un tubo con --
dos ml de caldo infusión cerebro corazón, dándole movimiento rotatorio --
contra la pared del tubo para suspender la muestra; se incubaron a 37°C
durante 2 hr (10) .

Posteriormente se procedió a la inoculación de los medios , de la --
siguiente forma :

1.- Se realizó una resiembra directa en agar sangre convencional --
tomando una asada de la muestra en suspensión e inoculando en la cri --
lla de la caja, después con un asa estéril se sembró por dilución en es --
trías , hundiendo el asa bajo la superficie del agar, para observar me --
jor la hemólisis de las cepas que sólo produjeran estreptolisina O (1, --
9,20) .

2.- Se tomó el hisopo del tubo de caldo infusión cerebro corazón --
y se presionó contra la pared del tubo de ensaye para exprimir el exce --
so de muestra y enseguida se pasó a un tubo de ensaye con tapón de ba --
quelita, que contenía 5 ml de caldo urcasa enriquecido (10) .

Los tubos junto con las cajas inoculadas, se incubaron a 37°C durante 24 hr.

Una vez finalizado el periodo de incubación, se hizo la observación del crecimiento en las cajas de agar sangre, teniendo cuidado para detectar aquellas colonias con beta hemólisis, viéndolo a través de una lámpara luminosa.

El crecimiento de los tubos con caldo uroasa enriquecido, se inoculó en las cajas de agar sangre convencional y modificado, de la forma descrita en la parte 2. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 hr.

Transcurrido el tiempo de incubación se procede de igual forma que la de las cajas sembradas directamente.

IDENTIFICACION DE LOS ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLITICOS AISLADOS .

La identificación de los estreptococos beta hemolíticos aislados se llevó a cabo por medio de : Métodos Serológicos y por Métodos no Serológicos .

1.- Métodos no serológicos

Prueba de la Bacitracina .

A las colonias sospechosas se les hizo la prueba de sensibilidad a la bacitracina para determinar si eran del grupo A. La prueba se realizó sembrando el estreptococo en una caja de agar sangre de carnero convencional por estufa cerrada, enseguida se le colocó un disco de bacitracina (Bioclin A) de 0.04 unidades. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 hr , al cabo de las cuales se leyó la zona de inhibición (1, 9, 20, 30, 33, 35) .

2.- Métodos Serológicos .

Para el agrupamiento del estreptococo es necesario preparar el extracto antigénico del microorganismo, para lo cual existen diversos métodos de extracción, los que difieren considerablemente en complejidad y eficacia (1,9, 13) .

La técnica del ácido caliente de Lancefield se considera como de referencia para comparar los demás métodos. Desafortunadamente es complicada y consume mucho tiempo, por lo cual se prefirió la técnica de autoclave de Rantz y Randall , la cual es relativamente simple y puede ser utilizada efectivamente en la identificación de estreptococos (1 , 6,9) .

Extracción por autoclave de Rantz y Randall :

- Se inocularon estreptococos beta hemolíticos aislados en 40 ml de caldo Todd Hewitt y se incubaron durante 24 hr .
- Se centrifugó para sedimentar completamente las células bacterianas, decantando el sobrenadante .
- Se adicionó 0.5 ml de NaCl al 0.85% al sedimento.
- Se transfirió el sedimento a tubos estériles de floculación y se sometieron a autoclave a 121°C durante 15 minutos .
- Se centrifugó para completa sedimentación .
- Se transfirió el sobrenadante a tubos de ensayo limpios y estériles, descartando el sedimento .
- El extracto obtenido se puso en contacto con los antisueros .

Procedimiento de la prueba (Método de la Precipitina o capilar) .

- Se limpió el exterior de un tubo capilar con papel suave.
- Se sumergió el capilar en el antisuero de estreptococo grupo A, permitiendo que se elevara el suero, hasta un tercio de longitud del tubo. Se limpió el exterior del tubo para remover el exceso de suero y para prevenir la adulteración del antígeno .
- De nuevo se sumergió el capilar en el extracto de antígeno, corriendo una cantidad igual a la del antisuero .
- Se limpió el exterior del capilar, se mezclaron bien el antígeno y el antisuero, invirtiendo el capilar varias veces, dejando espacio de aire arriba y abajo de la columna de líquido .
- Se colocó el capilar verticalmente en bloques de plastilina.
- Se repitió el procedimiento , usando los antisueros para los grupos B, C, D, F y G respectivamente .
- Se corrieron también dos testigos positivos : uno A y otro B, y además un negativo que consistió de antígeno solamente .
- Inmediatamente después de que las pruebas fueron montadas se examinaron los tubos usando una luz potente en frente de un fondo negro, después de 5 a 30 minutos .

Interpretación : un precipitado blanco en el centro de la columna representa un resultado positivo (1,6) .

DETERMINACION DE ANTIESTREPTOLISINAS .

La determinación del título de antiestreptolisinas se realizó -- usando el método de dilución utilizado en el IMSS (35) .

Diluciones del suero :

- a.- Poner 3 tubos de 15 x 125 mm en una gradilla y marcarlos 1:10
1:100 y 1:500 .
- b.- Poner 0.5 ml de suero con una pipeta de 1 ml en el tubo marcado 1:10 .
- c.- Añadirle a este tubo 4.5 ml de solución amortiguadora con una pipeta de 5 ml , de esta manera el suero queda diluido 1:10.
- d.- Pasar 1 ml de esta solución al tubo marcado 1:100 con una pipeta de 1 ml .
- e.- Añadirle a este tubo 9 ml de solución amortiguadora con una pipeta de 10 ml, en este tubo el suero queda diluido 1:100 .
- f.- Pasar 2 ml de esta solución al tubo marcado 1:500 .
- g.- Añadirle a este tubo 8 ml de solución amortiguadora, en este tubo el suero quedará diluido 1:500 .

Prueba :

- h.- Poner 14 tubos de 15 x 100 mm en una gradilla .
- i.- Poner 0.8 ml del suero diluido 1:10 con una pipeta de 1 ml en el primer tubo .
- j.- Poner 0.2 ml del suero diluido 1:10, con una pipeta de 0.2 ml en el segundo tubo .
- k.- Con una pipeta de 1 ml colocar 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.3 de la dilución de suero 1:100, a los tubos 3, 4, 5, 6, 7 respectivamente .
- l.- Con una pipeta de 1 ml colocar 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 de la dilución de suero 1:500, a los tubos 8, 9, 10, 11 y 12 respectivamente. A los tubos 13 y 14 no se les pone suero porque servirán-

de control .

- m.- Con una pipeta de 1 ml poner 0.2,0.8,0.2,0.4,0.6,0.7,0.2,0.4, 0.6,0.8 y 1.0 ml de la solución amortiguadora a los tubos 1,- 2,4,5,6,7,9,11,12 y 14 respectivamente, por lo que no se les añade solución amortiguadora .
- n.- Con una pipeta de 2 ml se ponen 1.5 ml de solución amortiguadora al tubo número 13.
- ñ.- Agítese cuidadosamente la gradilla para mezclar el contenido.
- o.- Con una pipeta de 1 ml poner con mucho cuidado 0.5 ml de reactivo de estreptolisina O a todos los tubos menos al 13.
- p.- Agítese la gradilla cuidadosamente .
- q.- Poner en baño de agua durante 15 minutos a 37°C .
- r.- Con una pipeta de 5 ml agregar 0.5 ml de la suspensión de eritrocitos a todos los 14 tubos y agítese cuidadosamente.
- s.- Incubar a 37°C en baño de agua durante 45 minutos ,agítese la gradilla transcurridos los primeros 15 minutos.
- t.- Centrifugar durante 1 minuto a 1500 rpm.
- u.- Léase hemólisis en el líquido sobrenadante .La dilución del último tubo en el que se encuentra hemólisis,al observarse -- los tubos con luz blanca de buena intensidad, se tomará como el número de unidades de antiestreptolisinas .

Controles :

El tubo número 13 es el control de los glóbulos rojos.Contiene - 1.5 ml de solución amortiguadora y 0.5 ml de suspensión de glóbulos rojos .

El sobrenadante centrifugado o después de dejarse sedimentar durante 2 hr no debe presentar hemólisis. Este tubo también puede emplearse como comparación para determinar grados mínimos de hemólisis en los tubos .

El tubo número 14 es el control de antiestreptolisina C. Contiene 1 ml de solución amortiguadora, 0.5 ml de estreptolisina C y 0.5 ml de suspensión de glóbulos rojos. En este tubo debe presentarse hemólisis-intensa o total .

CAPITULO IV

RESULTADOS

Se practicaron un total de 200 cultivos de exudados faringicos, de los cuales un total de 47 cultivos resultaron positivos, que corresponde al 23.5% (TABLA No. II). Lo anterior se determinó usando los tres métodos de cultivo ya mencionados: ASC, U-ASC y U-ASCM.

El 51.06% de los cultivos positivos corresponden a estreptococos beta hemolíticos del grupo A, el 27.65% al grupo B, el 12.76% al grupo C y el 8.51% a otros grupos (TABLA No. III).

En la TABLA No. IV se muestran las proporciones de especificidad en los medios empleados para los estreptococos beta hemolíticos. Se obtuvo un 51.06% de recuperación en el ASC convencional, un 89.36% en el U-ASC y un significativo 95.74% para el medio U-ASCM. Estos resultados se muestran graficamente en la FIG. No. 2.

En la TABLA No. V se observan las proporciones de cultivos positivos recobrados en los diferentes medios con respecto al mayor número encontrado en alguno de ellos, correspondiendo para el grupo A un 54.16% en ASC, un 100% para el U-ASC y un 100% para el U-ASCM. Para el grupo B se obtuvieron los siguientes resultados: 38.46% de recuperaciones hechas en el ASC, 100% para el U-ASC y un 100% para el U-ASCM. Los resultados obtenidos para los estreptococos beta hemolíticos pertenecientes al grupo C son: 33.33% en ASC, 33.33% para el U-ASC y un 83.33% para el U-ASCM. Finalmente para otros grupos tenemos: 100% para el ASC, 75% en U-ASC y un 75% para el U-ASCM. Estos resultados se muestran graficamente en las FIGS. 3, 4 y 5.

En la TABLA No. VI se tiene la proporción de aumento de recuperación en los medios experimentados con respecto al medio convencional,

observándose que para el ASC es de 12.5%, un 21% para el U-ASC y un -
22.5% en el U-ASCM . Estos resultados se muestran en la FIG. No. 6 .

La titulación de antiestreptolisinas se practicó únicamente en -
los 28 de los 47 casos positivos de los exudados faríngeos.

Si consideramos como significativo, títulos mayores a 1:250, el -
75% de los pacientes tenía elevada proporción de anticuerpos , aunque-
lo más conveniente, es que se hubiera hecho otras determinaciones para-
registrar los cambios que pudieran presentarse (TABLA No. VII) .

TABLA II		
PROPORCION DE CULTIVOS POSITIVOS		%
MUESTRAS PRACTICADAS	TOTAL POSITIVOS	
200	47	23.5

TABLA III
 CLASIFICACION SEROLOGICA DE LOS ESTREPTOCOCCOS
 BETA HEMOLITICOS AISLADOS.

GRUPO	MAYOR No.	%	TOTAL DE POSITIVOS DETECTADOS - PCR LA METODOLOGIA.
A	24	51.06	47
B	13	27.65	
C	6	12.76	
Otros	4	8.51	

TABLA IV

PROPORCION DE ESPECIFICIDAD EN LA RECUPERACION DE LOS ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLITICOS EN LOS DIFERENTES MEDIOS.

MEDIOS	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	OTROS	TOTAL	%
ASC	13	5	2	4	24	51.06
U-ASC	24	13	2	3	42	89.36
U-ASCM	24	13	5	3	45	95.74

TABLA V				
PROPORCIÓN DE CUMPLIDOS POSITIVOS RECOBRADOS				
EN LOS DIFERENTES MEDIOS.				
GRUPO	ASC	U-ASC	U-ASCM	HAYOR No. DE POSITIVOS RECOBRADOS
A	13(54.16%)	24(100%)	24(100%)	24
B	5(38.46%)	13(100%)	13(100%)	13
C	2(33.33%)	2(33.33%)	5(83.33%)	6
Otros	4(100%)	3(75%)	3(75%)	4
TOTAL	24	42	45	

TABLA VI

PROPORCIÓN DE AUMENTO DE RECUPERACIÓN CON
RESPECTO AL MEDIO CONVENCIONAL.

MUESTRAS PRACTICADAS	ASC	U-ASC	U-ASCM
200	25	42	45
100%	12.5	21	22.5

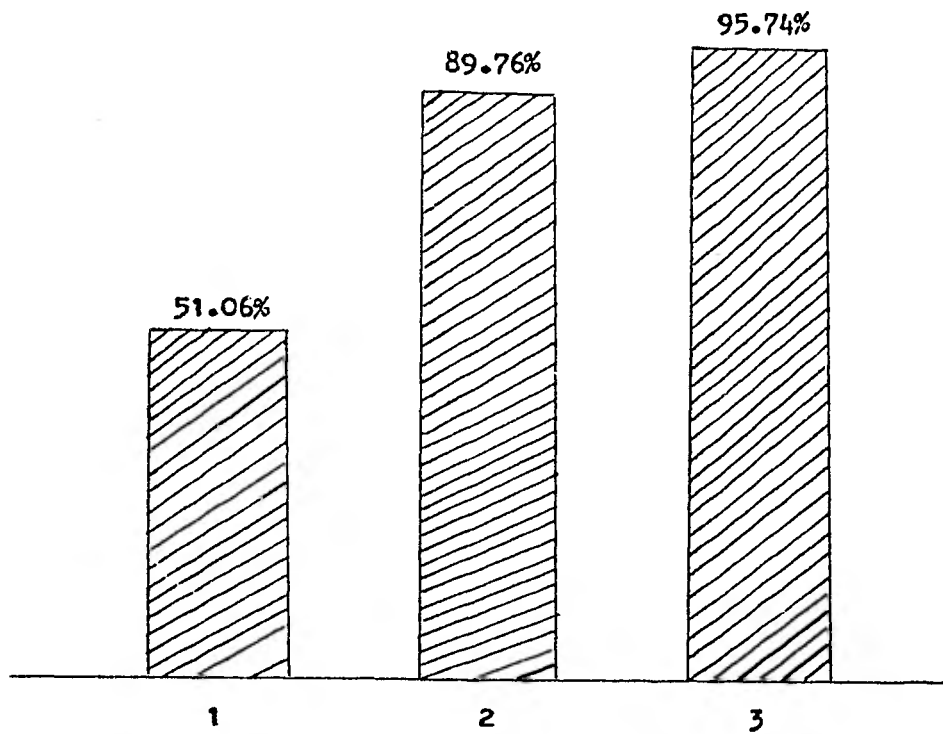
TABLA VII

TITULO DE ANTIESTREPTOLISINAS DE LOS PORTADORES DE ESTREPTO
COCOS BETA HEMOLITICOS .

TITULO DE ANTIESTREPTOLISINAS	NUMERO DE PORTADORES	%
100	2	7.14
125	-	-
166	3	10.71
250	2	7.14
333	3	10.71
500	4	14.28
833	6	21.42
1250	2	7.14
2500	6	21.42
TOTAL ESTUDIADOS	28	100

FIG. 2

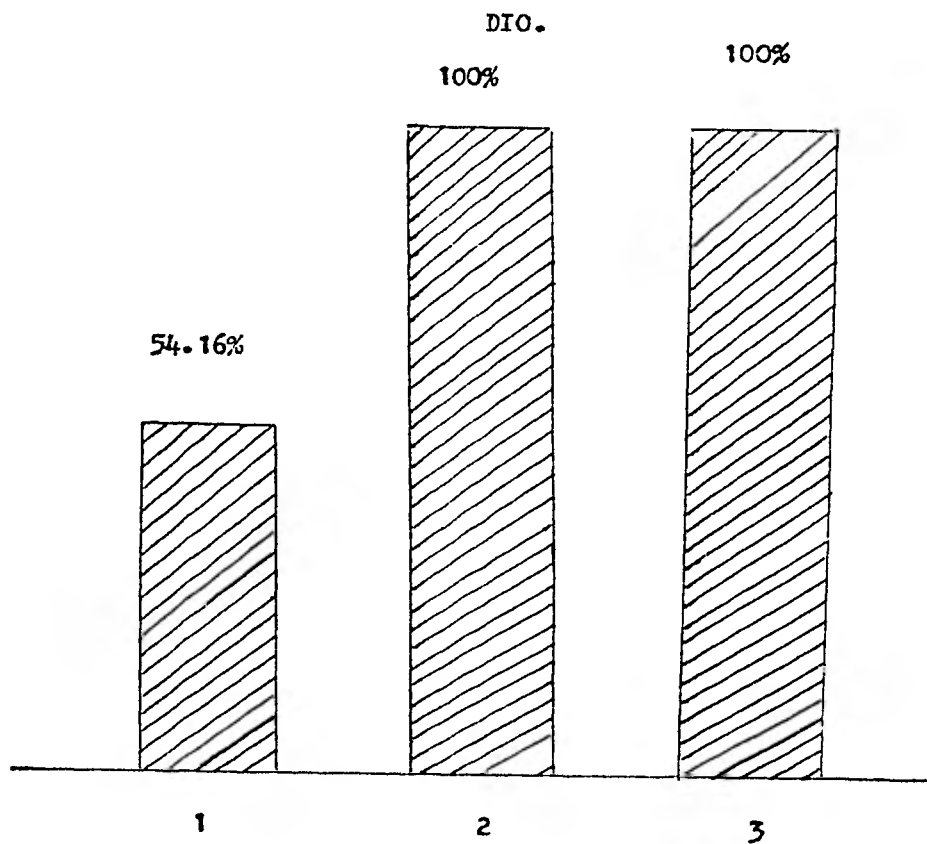
REPRESENTACION GRAFICA DE LA PROPORCION DE
ESPECIFICIDAD EN LOS DIFERENTES MEDIOS



- 1.- Agar Sangre de Carnero Convencional (ASC)
- 2.- Ureasa + ASC
- 3.- Ureasa + ASCM

FIG. 3

PROPORCION DE CULTIVOS CON ESTREPTOCOCOS BETA
HEMOLITICOS DEL GRUPO A RECOBRADOS EN CADA ME



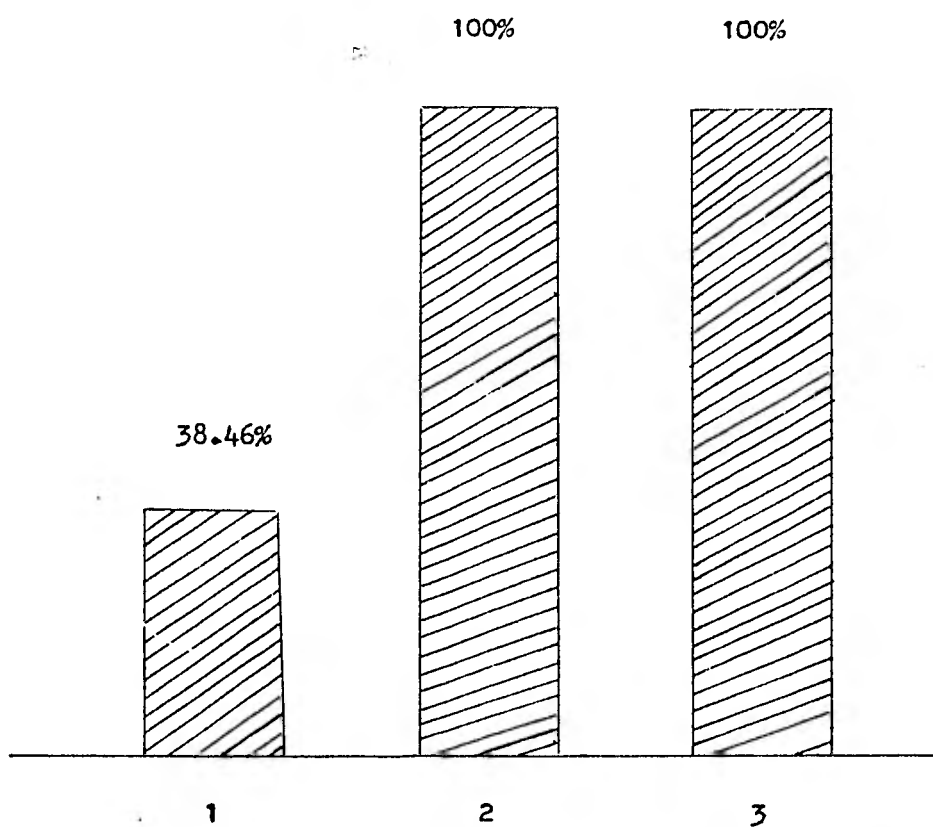
1.- Agar Sangre de Carnero Convencional (ASC)

2.- Ureasa + ASC

3.- Ureasa + ASCM

FIG. 4

PROPORCION DE CULTIVOS CON ESTREPTOCOCOS BETA
HEMOLITICOS DEL GRUPO B RECOBRADOS EN CADA ME
DIO



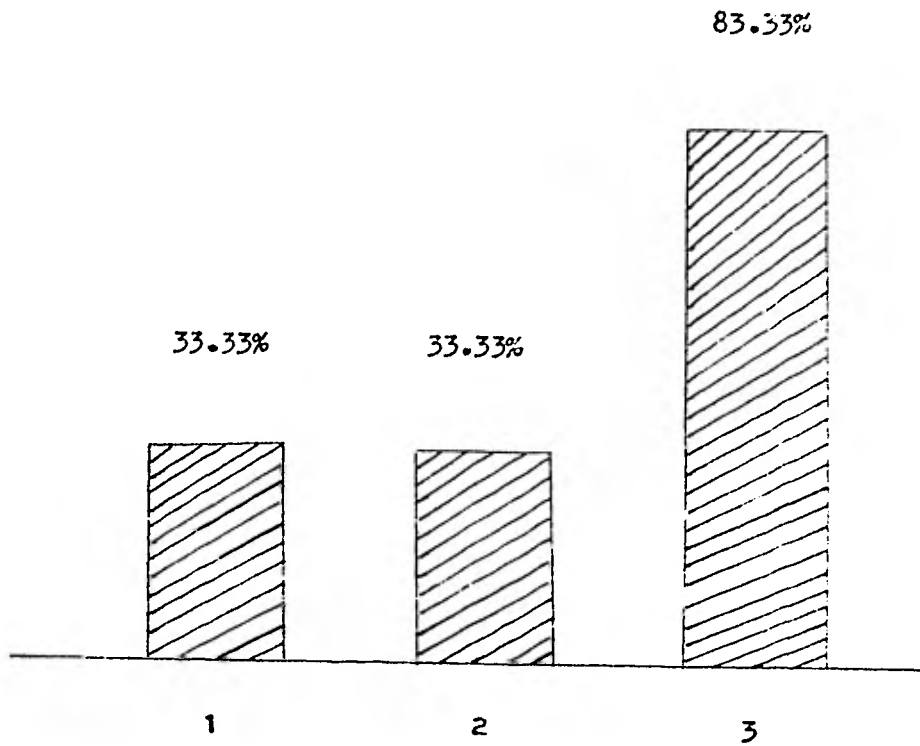
1.- Agar Sangre de Carnero Convencional (ASC) .

2.- Ureasa + ASC .

3.- Ureasa + ASCM .

FIG. 5

PROPORCION DE CULTIVOS CON ESTREPTOCOCOS BETA
HEMOLITICOS DEL GRUPO C RECOBRADOS EN CADA ME
DIO



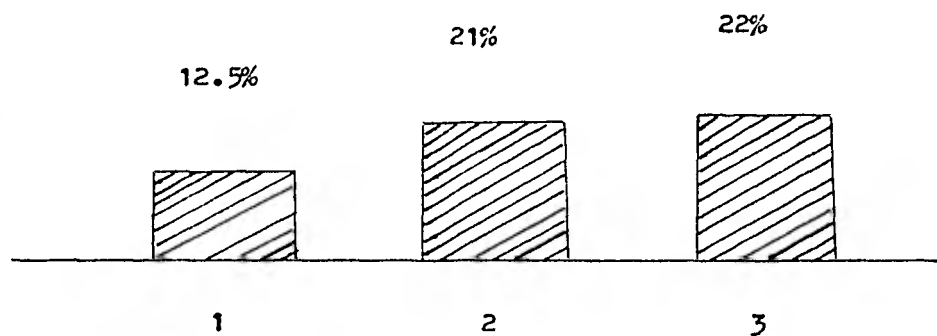
1.- Agar Sangre de Carnero Convencional (ASC)

2.- Ureasa + ASC

3.- Ureasa + ASCM

FIG. 6

PROPORCION DE AUMENTO DE RECUPERACION
CON RESPECTO AL MEDIO CONVENCIONAL



1.- Agar Sangre de Carnero Convencional (ASC)

2.- Ureasa + ASC

3.- Ureasa + ASCM

CAPITULO V

DISCUSION

DE

RESULTADOS

El diagnóstico de una infección estreptocócica se establece tradicionalmente mediante los hallazgos clínicos, y solo en forma ocasional el médico busca el apoyo del laboratorio .

Este diagnóstico tiene ciertas dificultades, ya que muchas veces éste se lleva a cabo cuando el paciente se queja de dolor faríngeo, sin que haya signos definidos de enrojecimiento, exudado o ulceración de la faringe y que algunas veces se trata de irritación traqueal o tal vez la faringitis sea de otra etiología (2) .

Varios autores han señalado la falta de precisión del diagnóstico de la enfermedad estreptocócica basado solo en los datos clínicos y recomiendan que se intente sistemáticamente el cultivo del microorganismo. Norman y Mc. Farlane (36) calcularon la frecuencia del 26% de diagnósticos falsos negativos y de 54% de falsos positivos cuando la identificación de faringitis estreptocócica se hizo a través del cuadro clínico; Breese y col. obtuvieron resultados similares (25% de errores del diagnóstico) (37) y Dymont y col. (26% de falsos negativos) (38). Stollerman (39) acentúa el papel del cultivo faríngeo selectivo de estreptococos beta hemolíticos para ayudar a distinguir entre infección viral y bacteriana .

El éxito de un cultivo de exudado faríngeo depende de varios factores , como pueden ser, la técnica para tomar el producto y la forma de procesamiento del cultivo (34) .

La toma de muestra es un factor decisivo, ya que si ésta no se hace adecuadamente todos los esfuerzos para recuperar el microorganismo causal de la enfermedad serán inútiles (1,20) .

En el procesamiento de la muestra, los medios de cultivo usados - y su preparación, constituyen un punto de vital importancia, por lo - que hay que tener en cuenta factores como : esterilidad, estabilidad, humedad adecuada, etc. (9) .

El cultivo faríngeo debe ser utilizado en todo aquel paciente en - que se sospeche una infección estreptocócica. Sin embargo, debido a su - costo y otros factores, esto no siempre es posible. Pero independiente - mente de esto es posible resumir algunos casos en que el cultivo farin - geo pudiera estar indicado :

- a.- Deberán cultivarse todos aquellos casos de glomerulonefritis - aguda o fiebre reumática, que sean vistos y diagnosticados por el médico. La experiencia en el Hospital Infantil de México - ha mostrado que no es raro que después de un caso de nefritis aguda, se presenten otros en la misma familia. Por lo tanto si - se comprueba mediante el cultivo la presencia de este germen - en el núcleo familiar, se tomarían medidas preventivas, lo - mismo sería aplicable si el caso es de fiebre reumática.
- b.- En todo niño menor con exudado purulento, pues en estos casos . es probable que dicho exudado no sea estreptocócico, sino por - adenovirus y un resultado negativo sugiere confirmación del - diagnóstico y daría confianza al médico familiar .
- c.- En todos aquellos niños con exudado purulento sin importar la edad , en que se contemplen otros diagnósticos diferentes del - estreptococo, por ejemplo difteria o mononucleosis infecciosa.

En estos casos un cultivo negativo orientará más en otra dirección .

d.- Se sugiere el cultivo en aquellos niños que aunque asintomáticos pudieran ser la fuente de contagio repetido de algún miembro familiar con amigdalitis de repetición .

e.- Todos aquellos casos de amigdalitis de repetición con el fin de comprobar su etiología verdadera , pues a menudo dichos casos no tienen como etiología al estreptococo, sino más bien - corresponden a enfermedades virales, o el dolor faríngeo tiene otra etiología no infecciosa. En todos los casos un cultivo negativo evitará el uso indiscriminado de antibióticos .

f.- Un cultivo está indicado en todos aquellos casos en que por - no existir el cuadro clásico de la infección estreptocócica - el médico tenga duda del diagnóstico . En estos casos un cultivo positivo aclarará el problema (2) .

Por otra parte, las relaciones ecológicas del S. pyogenes con bacterias no patógenas de la garganta son interesantes y complejas. Sanders y Crowe (19) , reportaron que la colonización con estreptococos - grupo A, varía de acuerdo al grado de interferencia que la flora normal orofaríngea era capaz de ejercer, y que únicamente los estreptococos viridans, eran capaces de ejercer interferencia bacteriana .

Se ha observado también que entre las causas que inhiben a los estreptococos beta hemolíticos se tienen a : las bacteriocinas de los estreptococos viridans , productos metabólicos tóxicos (peróxido de hidró-

geno) ,disminución de sustrato, creación de un medio ambiente hostil (29) .

Muchas de las interacciones bacterianas que ocurren en vivo también suceden in vitro (medios de cultivo) (29) .

Por consiguiente, para maximizar la recuperación de S. pyogenes de cultivos faríngeos, es necesario eliminar tanto como sea posible ,a la flora inhibidora .

Ya que los estreptococos viridans han sido los más frecuentemente asociados con la inhibición de los estreptococos del grupo A, todo medio selectivo debe de estar diseñado para suprimir su crecimiento. Sin embargo , este no ha sido el caso de muchos medios , debido a que cuando inhiben a los estreptococos viridans usualmente también inhiben a los S. pyogenes .

En este estudio, el caldo ureasa enriquecido y el agar sangre modificado mostraron ser la excepción .

En cuanto a los resultados, se obtuvo un 23.5% de cultivos positivos , basados en el total de cultivos obtenidos por el empleo de los medios indicados en la metodología en estudio .

Dos estudios realizados en México, Escamilla (11) y Giono y col.- (12), informaron un 10.7%, el cual representa un 54.5% menos que el nuestro. Recientemente también en México, García M.A. usando medios selectivos a base de Sulfamethoxazole y Trimethoprim (34), publicó un 11.33%, el cual representa un 51.79% menor al nuestro .

Del 23.5%, un 51.06% corresponde a estreptococos del grupo A, 27.65% del grupo B, 12.76% al grupo C y un 8.51% a otros grupos .

La proporción obtenida para los grupos A y B concuerdan con otros resultados antes obtenidos (11,34). Con respecto al grupo C y otros grupos (34) reporta una proporción ligeramente superior a la nuestra, - 30.8% contra 21.27% (nuestra proporción sumando grupo C y otros grupos).

Los resultados obtenidos en la TABLA No. IV nos muestran claramente el incremento notable en la recuperación del estreptococo beta hemolítico de los grupos A y B, de los medios de experimentación con respecto al medio convencional de agar sangre. Así nos da la especificidad de los medios. Esto es importante porque estos dos grupos: A y B, producen aproximadamente el 90% de las infecciones del conducto respiratorio superior causadas por los estreptococos, y una cierta proporción de las infecciones neonatales (1,34).

Vale la pena hacer notar que de todos los medios empleados, el U-ASCM y el U-ASC, es donde se obtiene la mayor recuperación de los estreptococos beta hemolíticos de los grupos A y B.

En la TABLA No. V se obtienen la proporción de cultivos recobrados en cada medio de cultivo experimentado, con respecto al mayor número encontrado en alguno de ellos y nos muestra también que en los medios U-ASCM y U-ASC se obtienen las proporciones más elevadas de recuperación de los estreptococos, con excepción de la proporción de otros grupos, cuya proporción fue mayor para el ASC y para el U-ASCM y U-ASC fue igual.

Otro de los resultados de mayor relevancia son los de la TABLA No. VI en donde se observa el aumento de recuperación de los estreptococos beta hemolíticos.

El ASC tuvo una recuperación del 12.5%, el U-ASC un 21% y el - -

U-ASCM un 22.5%, lo cual quiere decir que el U-ASCM tuvo un aumento de recuperación del 6.7% con respecto al U-ASC y un 44.5% frente al ASC . El U-ASC tuvo un aumento del 40.5% con respecto al ASC .

Nakamizo y Sato (10), usando la misma metodología, encontraron en un estudio con personas que tenían fiebre escarlatina recuperación de estreptococos beta hemolíticos de 23.6% para ASC y de 49.8% para el U-ASCM , el cual representa un aumento del 52.62% de recuperación con respecto al ASC .

El aumento obtenido por Nakamizo y Sato (10), de U-ASCM sobre ASC concuerda con el que nosotros obtuvimos de una población donde la infección del paciente podría haber sido de etiología viral o estreptocócica .

El medio U-ASCM inhibió el crecimiento de gran parte de la flora normal, incluyendo los estreptococos viridans , en el cual la competencia bacteriana es grandemente modificada y la recuperación de S. pyogenes es incrementada. En el medio U-ASC cerca del 15% de los cultivos que resultaron ser positivos para el aislamiento de estreptococos beta hemolíticos, tuvieron crecimiento de flora normal, principalmente de estafilococos. Estos estafilococos no aparecieron en el medio U-ASCM , debido a la presencia del cristal violeta que los inhibe .

En cuanto al medio ASC, el crecimiento de flora normal como es estreptococos viridans, estafilococos, pseudomonas, neisserias, entre las más importantes, fué abundante . Lo anterior representa un gran problema, tanto para su identificación como para su aislamiento, lo cual no aconteció con los medios U-ASCM y U-ASC tanto en cultivo puro como en la pequeña proporción de cultivo contaminado .

El número de colonias de estreptococos beta hemolíticos en el medio U-ASCM fué generalmente mayor que en el medio U-ASC. En el medio -ASC el número de colonias observable fué generalmente muy pequeño, pues el crecimiento de la flora normal faríngea llegaba a enmascararlas - cuando estas estaban presentes en el medio .

El caldo infusión cerebro corazón empleado en nuestra metodología no lo utilizamos como medio de transporte como a primera vista aparece, sino que únicamente lo usamos para homogeneizar la muestra, de esta ma - nera al inocular los medios nos aseguramos de que esta era más repre - sentativa , lo cul no sucedía utilizando el hisopo para inocular prime - ro un medio y después el otro y tener que alternar el turno para ver - que medio era primero inoculado y cual después. De esta forma también - nos evitamos tener que tomar dos muestras y los problemas que esto - trae consigo. En consecuencia, ya en la práctica de rutina no hay nece - sidad de utilizarlo .

Finalmente en la TABLA No. VII se observan los títulos de anties - treptolisinas , clasificando los 28 casos en los diferentes títulos - junto con el por ciento de cada uno de ellos .

El problema más importante acerca del título de antiestreptolási - nas, es el de definir los valores "normales" del mismo en relación a - las diferentes características de los grupos humanos que se pretendie - ra estudiar y de ahí aplicarla al individuo en estudio. En forma gene - ral, se habla para los grupos . Se puede decir que un título de 400 U, es elevado, pero para el individuo, un título de 200 U. podría ya re - presentar una elevación significativa si viniese cursando previamente - con 50-100 U .

Se considera que un cambio significativo del título de anties --
treptolisinas, debe variar no menos de dos tubos y, en ese aspecto, --
tiene el mismo significado la elevación de 100 U. , a 200 U. , que la-
de 500 a 1000 U.. Es en base a este cambio en el título de antiestrep-
tolisinas, como se determina si se trata de una infección estreptocóci-
ca o de un caso de portador . De ahí la necesidad de realizar varias -
determinaciones, para saber de que se trata .

El IMSS (35) considera 250 U. , como títulos elevados de anties -
treptolisinas .Partiendo de esto, el 75% de los pacientes tenían títu-
los elevados de antiestrep-tolisinas .

CAPITULO VI

C O N C L U S I O N

Este estudio demostró claramente que siguiendo la metodología indicada se aumentan considerablemente los aislamientos de estreptococos beta hemolíticos, cumpliéndose así el objetivo .

La introducción de un tubo ureasa enriquecido y un agar sangre modificado no había sido incluido en la metodología de aislamiento de - otros autores, habiéndose obtenido de este medio la mayor recuperación.

Respecto al medio U-ASC, se obtuvo una recuperación bastante aceptable y que puede resultar cómoda, ya que utilizándolo tendría la ventaja de que únicamente se prepararía el caldo ureasa enriquecido como medio adicional al método de rutina .

Por lo que respecta al costo del cultivo, este es bajo, debido a que las sustancias con que se preparan los medios son baratas y se adicionan a los medios en cantidades muy pequeñas, y en cambio los beneficios que traería introducirlos en el laboratorio de rutina serían bastante buenos .

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

- 1.- O M S ., 1980. Prevención y control de la fiebre reumática en la comunidad . Publicación Científica No. 399 .
- 2.- Rodríguez, R. S., 1969 . Diagnóstico y tratamiento de las infecciones estreptocóccicas. Bol. Med. Hosp. Infant. - (Méx.) 493-502 .
- 3.- Amézcuca, F. J., 1979. Aspectos epidemiológicos de la fiebre reumática. Bol. Of. Sanit. Panam. 87(3):200-207 .
- 4.- Amézcuca, F. J., 1973 . Prevención primaria de la fiebre reumática. Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx.) 143-189 .
- 5.- Baker, C. J., 1977. Summary of the workshop in perinatal infection due to group B streptococcus. J. Infect. Dis. 136:137-152 .
- 6.- Sohnerwirth, A.C. y Jarret, L., 1980. Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. The C.V. Mosby Company .
- 7.- Koch, A. E. y Burchall, J. J. , 1971. Reversal of the antimicrobial activity of Trimethoprim by trimidine in commercially prepared media. Appl. Microbiol. 22:812-817 .
- 8.- Hardy, M. A., Dalton, H.P. y Allison, H. J., 1978. Laboratory identification and epidemiology of streptococcal hospital isolates . J. Clin. Microbiol. 8:534-544 .
- 9.- Finegold, S. M., Martin, W. S. y Scott, E. G., 1978. Bayley and Scott's Diagnostic Microbiology. The C.V. Mosby Company .

- 10.- Nakamizo, Y. y Sato, M., 1972. New Selective Media for the -
Isolation of Streptococcus hemolyticus . Amer. J. -
Clin. Path., 57: 228-235 .
- 11.- Escamilla, E. A., 1975. Clasificación serológica de estrepto-
cocos beta hemolíticos en grupos de Lancefield y an-
tígenos M y T . Tesis IPN. México .
- 12.- Giono, S. C., Barraza, A.S. y Castro, H. A., 1974. El estrepto-
coco y la fiebre reumática . Rev. Lat-Am. Microbiol.
16: 111-122 .
- 13.- Davies, B. D. y Dulbeco, R., 1977. Tratado de Microbiología.-
Salvat Editores.
- 14.- Breed, R. S., Murray, R. G. y Smith, N. R., 1967. Bergey's -
manual of determinative bacteriology. 8a. ed. Balti-
more, The Williams & Wilkins Co. E U A. pp. 491-509.
- 15.- Krauze, R. M., 1973. Symposium on the relationship of structu-
re of microorganism to their immunological proper --
ties. IV. Antigenic and Biochemical Composition of -
hemolytic Streptococcal cell wall. Bact. Rev. 27: 1-
369-380 .
- 16.- Bojalil, L. F., 1981. Microbiología Médica. Tomo I. ed. Men-
des Oteo .
- 17.- Krauze, R. M. y MacCarty, M., 1962. Studies on the chemical -
structure of Streptococcal Cell Wall. 11. The compo-
sición of group C cell walls and the chemical base -
for serologic specificity of carbohydrate moiety. J. -

Exp. Med. 115: 49-62 .

- 18.- Rodríguez, R. S., 1975. Estudios sobre la prevención primaria de fiebre reumática. Bo. Med. Hosp. Infant. (Méx.) - 991-1002 .
- 19.- Crowe, Ch. C. y Sanders, W. E., 1973. Bacterial Interference. II. Role of the normal throat flora in prevention of colonization and Group A Streptococcus. J. Infect. - Dis. 128: 527-532 .
- 20.- IMSS ., 1979 . Programa de control de fiebre reumática. Taller "El Estreptococo". No. 42. pp. 1-12 .
- 21.- Barry, A. L. y Sauer, R. L., 1972. Efficiency of a Transport-Medium for the Recovery of Aerobic and Anaerobic Bacteria from Applicator Swabs. Appl. Microbiol. 24:31-33.
- 22.- Ellner, P. D. y Ellner, C. J., 1966. Survival of Bacteria on Swabs. L. of Bacteriol. 91: 905-906 .
- 23.- Pike, R. M., 1944 . The Isolation of Hemolytic Streptococci - from Throat Swabs. Experiments with sodium azide and crystal violet in enrichment broth. Amer. J. Hyg. 41: 211-220 .
- 24.- BIOXON. 1980. Medios de cultivo y reactivos de diagnóstico. Tomo I .
- 25.- Mastromatteo, L. y Baldini, I., 1963. Simple Medium for Rapid Screening and Isolation of Group A Streptococci from Contaminated Materials. J. Bacteriol. 86:1131-1133 .

- 26.- Black, W. A. y Buskirk, F. V., 1973. Gentamicin as a Selective Agent for the Isolation of beta hemolytic Streptococci. J. Clin. Path. 26: 154-156 .
- 27.- Lowbury, E. J. L., Kidson, A. y Lilly, H. A., 1964. A New Selective Blood Agar Medium for Streptococcus pyogenes - and other Haemolytic Streptococci. J. Clin. Path. - 17: 231-235 .
- 28.- Fenton, L.J. y Harper, M. H., 1979. Evaluation of Colistin - and Nalidixic Acid in Todd Hewitt Broth for Selective Isolation of Group B Streptococci. J. Clin. Microbiol. 9: 167-169 .
- 29.- Gunn, B. C., Ohashi, D. K., Gaydos, Ch. A. y Holt, E. S. Selective and Enhanced Recovery of Group A and B Streptococci from Throat Cultures with Sheep Blood Agar - Containing Sulfamethoxazole and Trimethoprim , J. - Clin. Microbiol. 5: 650-655 .
- 30.- Kurzynski, T., Meise, R. y Helstad, A., 1979 . Improved reliability of the Primary Bacitracin Test on Throat Cultures with Sulfamethoxazole- Trimethoprim. J. Clin.- Microbiol. 9: 144-146 .
- 31.- Kurzynski, T. y Meise, C., 1979 . Evaluation of Sulfamethoxazole- Trimethoprim Blood Agar Plates for Recovery - Group A Streptococci from Throat Cultures. J. Clin.- Microbiol. 9: 189-193 .
- 32.- Dykstra, M. A., MacLaughlin, J. C. y Bartlet, R. C., 1978. Comparison of Media and Techniques for detection of -

- Group A Streptococci in Throat Swabs Specimens. J. Clin. Microbiol. 9: 236-238 .
- 33.- Baron, E. J. y Gates, J. W., 1979 . Primary Plate Identification of Group A Beta Hemolytic Streptococci Utilizing a Two-Disk Technique. J. Clin. Microbiol. 10:80-84.
- 34.- García, M. A., 1982. Diseño de un Método Selectivo para Aumentar la Recuperación de Estreptococos Beta Hemolíticos de los Grupos A y B en Cultivos de Exudados Faríngeos. Tesis, Universidad de Orizaba, Veracruz .
- 35.- IMSS ., 1980. Procedimientos de Laboratorio Clínico. Subdirección General Médica, México .
- 36.- Norman, G.R. y McFarlane, A. H., 1971. Throat Infections in Children. Can. Med. Assoc. J. 105: 559-565 .
- 37.- Breesse, B. B. y Disney, F. A., 1954 . The accuracy of Diagnosis of Beta Streptococcal Infections of Clinical Groups . J. Pediatrics . 44: 670-673 .
- 38.- Dyment, P. G. y Klink, L. B., 1968 . Hoarseness and Palatal Petechiae as Clues in Identifying Streptococcal Throat Infections . Pediatrics. 41: 821-823 .
- 39.- Stollerman, G. H. , 1962. The Role of the Selective Throat Culture for Beta Hemolytic Streptococci in the Diagnosis of Acute Pharyngitis . Am. J. Clin. Path. 37:36-40.