

16
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
(ZARAGOZA)

FORMULACION DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE
DE PULQUE PARA EL AISLAMIENTO DE ESTREPTO-
COCOS BETA HEMOLITICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ALMA LETICIA DIAZ LONGORIA.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

AGOSTO 1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

INDICE.

	Página
1. Introducción.	1
2. Fundamentación del tema.	27
3. Planteamiento del problema.	28
4. Objetivos.	29
5. Hipótesis.	30
6. Material, métodos y técnicas.	31
7. Resultados.	40
8. Discusión de resultados.	46
9. Conclusiones.	49
10. Anexos.	50
11. Bibliografía.	55

1.- INTRODUCCION.

1.1.- Medios de cultivo.

Las distintas mezclas de sustancias nutritivas empleadas en el laboratorio para cultivo de microbios se denominan genéricamente "medios de cultivo" (1,2). El medio de cultivo sirve de base o soporte sobre el que se siembra con fines de estudio.

Los medios sirven para uno de dos propósitos principales:

A) Fomentar el crecimiento microbiano en forma que puedan comprobarse las características de cultivo.

B) Facilitar algunas reacciones bioquímicas, que luego pueden ser demostrables por observación directa, o bien indirectamente por subsiguientes reacciones en presencia de algunos reactivos adicionales.

Los medios pueden clasificarse de acuerdo a su consistencia en: líquidos, sólidos y semisólidos (2). Para estudiar las características de las colonias, debemos estudiar organismos sobre medios sólidos, se puede lograr la solidificación, agregando agar, gelatina, suero o albúmina de huevo a los ingredientes precipitados (5). El propósito de utilizar medios sólidos en cajas de Petri, consiste en inocular cantidades menores de microorganismos en el medio, de manera que en algún tiempo los microorganismos crezcan en colonias individualmente aisladas, también se le llama cultivo de microorganismos puros.

Los medios inclinados son empleados principalmente para sembrar cepas aisladas, sea para identificación ulterior o para base de cultivo.

Los medios de cultivo semisólido se emplean principalmente para llevar a cabo cultivos de Acido para aminosalicílico o para propagar a los anaerobios.

Lo más frecuente es el uso del agar para solidificar un medio líquido, disolviendo en él de 15 a 20 g de agar por litro; es un polisacárido obtenible de algas marinas, llega al laboratorio en forma de tiras secas o en polvo grueso. Prácticamente no tiene valor alimenticio, pero tiene propiedades físicas que lo hacen ideal como base de un medio de cultivo sólido. Se disuelve lentamente en agua y sólo después de hervir algún tiempo. Pero, una vez en solución, permanece líquido hasta que la temperatura desciende a unos 40°C, que es cuando se solidifica; su punto de fusión es cercano a 92°C.

El medio de agar se maneja fácilmente en estado líquido y con sencillas precauciones puede transvasarse de un recipiente a otro sin peligro de contaminación. Los medios de agar se utilizan universalmente para cultivos en cajas de Petri, también puede permitirse que se solidifique en tubos de ensayo, se llama inclinado o de tope inclinado cuando sólo la mitad superior de agar está inclinada; también puede inocularse en estado líquido, inmediatamente antes de solidificarse, alrededor de los 45°C. Permanece sólido a 37°C, temperatura a la que se incuban la mayoría de los cultivos.

El medio de cultivo siempre debe de guardarse en una atmósfera fresca y húmeda para evitar la evaporación. Sin embargo, no puede recomendarse que se guarden por un periodo largo de tiempo los medios de cultivo estériles, si medios en tubos se han guardado por algún tiempo deberán recalentarse inmediatamente antes de emplearse. Los medios líquidos deberán calentarse en un baño de agua hirviendo o con vapores en circulación, durante unos minutos para eliminar los gases sueltos, y entonces se dejarán enfriar rápidamente en agua fría sin ninguna agitación justo antes de la inoculación. (1,2,3)

1.2.- Tipos de medios.

En bacteriología se emplean diferentes tipos de medios. Debe tenerse cuidado de emplear el medio más adecuado para el aislamiento o identificación de las colonias bacterianas.

Por la composición del medio y la naturaleza del cultivo que se estudie, los medios de cultivo pueden ser divididos en cinco grupos principales:

- 1) Medios básicos o simples, líquidos y sólidos.
- 2) Medios enriquecidos.
- 3) Medios selectivos, diferenciales y de enriquecimiento.
- 4) Medios especiales de azúcar y bioquímicos diversos.
- 5) Medios para transporte (3,5).

1) Medios básicos.

Estos son los medios más simples, que sólo contienen algún extracto de carne u otra infusión simple, peptona, sal y agua.

El extracto o la infusión de carne, proporciona al organismo los aminoácidos, vitaminas, sales y pequeñas cantidades (oligoelementos) de carbono, nitrógeno, hidrógeno y otros elementos.

Las sales, usualmente NaCl, sirven para obtener la isotonicidad requerida para el mantenimiento de presiones osmóticas constantes. El agua sirve como disolvente, como medio de transporte o para ambos fines. Como la mayoría de las aguas contienen gran cantidad de diversos minerales, de los cuales el cobre es un particular perjudicial a muchas bacterias, es aconsejable usar agua cuidadosamente destilada.

Ejemplos: Agua peptonada, Agar nutritivo, Caldo nutritivo, Caldo triptico de soya, Agar triptico de soya, Caldo de infusión de corazón, Agar de infusión de corazón, Agar de infusión de hígado (3,5).

2) Medios enriquecidos.

Son aquellos medios básicos que han sido complementados con líquidos corporales, vitaminas específicas, aminoácidos, proteínas y otros nutrientes claramente definidos como tales.

Ejemplos: Agar sangre, Agar chocolate, Agar con suero, Suero de Loeffler con sangre, Planos inclinados con suero, Agar con triptosa, Medio de G.C. (Medio de Thayer-Martin), Agar de Mueller Hinton, Medio de Robertson.

3) Medios selectivos, diferenciales y de enriquecimiento.

a.- Los medios selectivos son usualmente medios de agar básico, o enriquecidos, a los cuales se les han agregado ciertos reactivos que impiden el crecimiento de la mayoría de las bacterias, permitiendo por lo tanto el aislamiento de unas cuantas seleccionadas, en los especímenes que contengan grandes números de organismos indeseables.

b.- Los medios diferenciales son medios básicos o enriquecidos, a los cuales se han agregado ciertos reactivos que reaccionarán con algunos tipos específicos de bacterias en cierta forma observable.

Comunmente, estos cambios químicos se hacen evidentes por medio del empleo de indicadores coloreados; si un indicador con un color dado a pH específico es agregado al medio, y el cultivo de las especies deseadas cambia el pH alrededor de las colonias en desarrollo, aparecerá un color diferente. La mayoría de los llamados medios diferenciales son también selectivos.

c.- Los medios de enriquecimiento son por lo general medios líquidos enriquecidos, que contienen algunas sustancias inhibidoras, con lo que se crea un medio ambiente especialmente favorable para límites más bien estrechos de bacterias (1,2,3,5).

Ejemplos: Agar con feniletanol, Agar con sangre y bilis, Agar con sangre y telurito, Inclinados de agar de Loewenstein Jensen, Agar con sangre con azida, Agar sal y manitol, Agar MacConkey, Agar Salmonella-Shigella, Agar con eosina y azul de metileno (EMB.), Agar con citrato y desoxicolato, Agar de sulfito de bismuto, Caldo F de selenita, Caldo de tetrionato, Agar xilosa-lactosa-desoxicolato (X.L.D.).

4) Medios de azúcar y bioquímicos diversos (Especiales).

Son medios empleados para comprobar una o más características bioquímicas, estos medios se crearon con el fin de identificar y clasificar los microorganismos según sus actividades metabólicas particulares.

Ejemplos: Caldo de azúcar y rojo de fenol, Medio de fermentación para Clostridium, Agar con tripticasa y cistina, Agar con hierro y triptofano (T.S.), Medio de motilidad con indol y sulfuro (S.I.M.), Medio de rojo de metilo y Voges-Proskauer (M.R.-V.P.), Agar con urea, Agar con fenilalanina, Caldo para descarboxilación, Agar de Simmons con citrato, Caldo KCN, Medio basal OF (Medio de oxidación-fermentación de Hugh-Leifson), Leche tornasol, Gelatina (1,3,5).

5) Medios de transporte.

Son medios que se utilizan cuando no se tiene la posibilidad de trabajar las muestras inmediatamente, o bien, cuando se toman las muestras en un lugar que no sea el laboratorio y se tengan que enviar a éste, sirven para preservarlas y mantenerlas en buenas condiciones para su posterior estudio.

Ejemplo: Medio de Stuart, Solución salina glicerizada(1,2,3,5).

1.3.- Familia Streptococcaceae.

1.3.1.- Clasificación.

Clase: Schizomycetes

Orden: Eubacteriales

Familia: Streptococcaceae

Género: Streptococcus

Especies: pyogenes

viridans

faecalis

salivarius

mitis

mutans

lactis

otras 10 aprox.

1.3.2.- Morfología.

Definición de la familia: Células esféricas u ovoidales, Grampositivas, dispuestas en cadenas cortas o en pares. No esporógenas y usualmente no móviles, se dividen sólo sobre un plano (5).

El género que se considera de mayor importancia médica es el Streptococcus. Son cocos Grampositivos, miden de 0.5 a 1 micra de diámetro dependiendo de las condiciones de crecimiento y de la edad del cultivo.

Microscópicamente en cultivos líquidos aparecen como cadenas largas, más que en los cultivos de agar, son no móviles, pero han sido reportadas formas poco móviles. Las formas virulentas son usualmente encapsuladas, y contienen en abundancia ácido hialurónico y presentan fimbrias.

Crece bien sobre la mayoría de los medios enriquecidos.

El desarrollo macroscópico o colonial dá como resultado colonias pequeñas, translúcidas o ligeramente opacas, circulares, generalmente de menos de 1 mm de diámetro, convexas; también hay colonias mucoides, originadas por las cepas virulentas (6,7,8,9,13,15).

La consistencia de las colonias es un poco dura, lo que permite su desplazamiento sobre la placa sin romperse y dependiendo del grupo al que pertenezcan pueden o no estar rodeadas de un halo de beta ó alfa hemólisis en agar sangre de carnero al 5%.

1.3.3- Fisiología.

Son aerobios y anaerobios facultativos, catalasa y oxidasa negativa, metabolismo fermentativo en el que se producen ácido láctico, fórmico, etanol y bióxido de carbono.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, con marcada reducción del crecimiento por encima de 40°C y por debajo de 30°C.

Sus límites de pH son de 7.4 a 7.6. Son sensibles a 50°C por 30 min.

La mayor parte de los estreptococos no fermentan la inulina, no reducen los nitratos y no son solubles en sales biliares.

Se los considera más especializados que los estafilococos, y requieren aproximadamente media docena de vitaminas y más de una docena de aminoácidos. La sangre se incluye frecuentemente en los medios de cultivo como origen de nutrientes y también como indicador de la producción de hemolisina (3,6,7,8,9,13,15).

1.3.4- Estructuras antigénicas.

En los estreptococos podemos encontrar las siguientes sustancias antigénicas:

a) Carbohidrato C : Esta sustancia es elaborada por muchos estreptococos y proporciona la base para el agrupamiento serológico (Lancefield A-O). La extracción del carbohidrato C con fines de "agrupamiento" de los estreptococos puede realizarse por extracción de cultivo centrifugado con HCl caliente o con formamida, o por lisis enzimática de las células del estreptococo (por ejemplo, con pepsina, tripsina o enzimas elaboradas por *Streptomyces albus*); o sometiendo a la acción del autoclave, 15 lb de presión durante 15 minutos, suspensiones celulares.

La especificidad serológica del carbohidrato C es determinada por un aminoazúcar.

Para el grupo A de los estreptococos es ramosa-N-acetilglucosamina; para el grupo C es la ramosa-N-acetilgalactosamina; para el grupo F es una glucopiranosil-N-acetilgalactosamina.

b) Proteína M : Esta sustancia está íntimamente relacionada con la virulencia de los estreptococos del grupo A, y está presente principalmente en los organismos que producen colonias mate o colonias mucoides.

Las resiembas repetidas en medios artificiales pueden dar lugar a que el estreptococo pierda la capacidad de producir la proteína M, capacidad que puede restablecerse por pases rápidos y repetidos por animales. La proteína M interfiere la ingestión de estreptococos virulentos por células fagocitarias. Las formas L en crecimiento de los estreptococos también producen proteína M así como ácido hialurónico.

La proteína M está presente en extractos preparados con HCl caliente a partir de estreptococos del grupo A ; esta proteína es tipo específica, lo que se demuestra mediante reacciones de aglutinación o de precipitación con sueros tipo específicos absorbidos. Existen más de 50 tipos en el grupo A. Los números se designan con números arábigos.

c) Substancia T : Esta sustancia tipo-específica no guarda ninguna relación con la virulencia; se destruye tanto por extracción ácida como por el calor, y por lo tanto se puede separar de la proteína M.

Se obtiene por digestión proteolítica de los estreptococos (con lo que se destruyen rápidamente las proteínas M), y permite la diferenciación de ciertos tipos.

d) Nucleoproteínas : La extracción de los estreptococos con álcalis diluidos proporciona mezclas de proteínas y algunas otras substancias de poca especificidad serológica; se les denomina substancias P₁ y posiblemente formen la mayoría del cuerpo celular del estreptococo (10).

1.3.5.- Clasificación del género Streptococcus.

Se han utilizado varias clasificaciones del género :

- Clasificación de Brown
- Clasificación de Bergey
- Clasificación de Lancefield

- Brown clasifica a los estreptococos basándose en el tipo de reacción producida sobre el agar sangre (6).

La hemólisis es la característica más útil para la identificación de los estreptococos. La acción hemolítica en eritrocitos de mamíferos fue descrita y definida en 1919; dicha hemólisis involucra un sistema complejo de muchas variables, incluyendo la influencia del medio de cultivo, la producción de estreptolisinas O y S, el efecto de varios tipos de sangre (carnero, caballo, conejo, humano), incubación aeróbica o anaeróbica, etc. (6,13).

Sus conceptos son :

Alfa (α) : una zona indistinta de destrucción parcial de glóbulos rojos alrededor de la colonia, acompañada a menudo de una decoloración verdosa a parduzca del medio, o bien, la zona inmediatamente adyacente y que rodea a la zona de crecimiento puede contener una cantidad reducida de glóbulos rojos, pero la zona no es libre completamente de glóbulos rojos.

Beta (β) : una zona clara incolora alrededor de las colonias de estreptococos, en la que los eritrocitos han sufrido decoloración total, o bien, la zona inmediatamente adyacente a la zona de crecimiento está completamente libre de glóbulos rojos, ésta zona se extiende hacia afuera desde la zona de crecimiento.

Gamma (γ) : no hay actividad hemolítica ni decoloración aparentes hechas por la colonia.

Alfa prima o zona alfa amplia (α-) : un pequeño halo o envoltura de eritrocitos intactos o parcialmente lisados adyacente a la colonia bacteriana, con una zona de hemólisis total que se extiende más dentro del medio (6,10,12,13,14,20).

- El manual de Bergey de Determinación Bacteriológica enlista los siguientes grupos de acuerdo a : 1) su acción sobre los eritrocitos; 2) sus estructuras antigénicas; 3) resistencia a factores físicos y químicos; 4) reacciones bioquímicas; y son : a) Piogénico, b) Viridans, c) Enterococo, d) Láctico (6,10,19,24).

En la siguiente tabla se enlistan las características de cada grupo.

Grupo PIOGENICO VRIDANS ENTEROCOCCO LACTICO

	β	α	α β γ	α γ
Hemólisis en ASC 5%	NC	NC	C	NC
Crecimiento a pH 9.6	NC	NC	C	NC
Crecimiento en NaCl 6.5%	NC	NC	C	NC
Solubilidad en bilis	INSOL	V(1)	INSOL	INSOL
Crecimiento bilis 40%	NC	NC	C	C

Grupo

PIOGENICO VIRIDANS ENTEROCOCCO LACTICO

Crecimiento a 10°C	NC	NC	C	NC
Crecimiento a 45°C	NC	VAR	C	NC
Elaboración de hemolisinas solubles	+	-	-	-
Formación de Carbohidrato grupo específico	+	-	+	+
			D-espec.	N-espec.

Notación : NC = No Crecimiento

INSOL = Insoluble

VAR = Variable

+ = Sí produce

- = No produce

C = Crecimiento

V(1) = El *S. pneumoniae* es la única especie soluble en bñs.

- El mejor método para identificar los estreptococos beta hemolíticos es extraer el polisacárido antigénico del estreptococo (Carbohidrato C) y hacer reaccionar el extracto con antisuero precipitante específico de grupo (14,25).

Lancefield describió las técnicas de diferenciación serológica para identificar los estreptococos beta-hemolíticos en 1933. Se ha intentado extender el sistema de agrupación serológica a los estreptococos alfa-hemolíticos, pero sólo para los estreptococos de los grupos D y N.

De acuerdo con la definición de Brown de hemólisis, los estreptococos pertenecientes a los grupos A,B,CEF,GLMP,U,V, y algunos estreptococos del grupo D son beta-hemolíticos. Los estreptococos pertenecientes a los grupos H,K,N,O,Q,R,S,T y la mayoría de los pertenecientes al grupo D son alfa-hemolíticos o no hemolíticos (14).

GRUPO A : Estas bacterias producen una gama amplia de enfermedades como la escarlatina, amigdalitis, otitis media, sepsis puerperal, infección de vías aéreas superiores, erisipela, impétigo, neumonía, septicemia o infección de heridas.

También produce enfermedades en algunos pacientes a consecuencia de reacciones antígeno-anticuerpo anormales como fiebre reumática y glomerulonefritis. La reacción antígeno-anticuerpo anormal es muy duradera, y causa daños tisulares en corazón o riñón. De ordinario, después de una infección por estreptococos, los anticuerpos disminuyen en el suero; pero en estas respuestas "alérgicas", los anticuerpos persisten mucho tiempo. Su presencia se manifiesta por la prueba de las antiestreptolisinas (3).

En agar sangre las colonias del grupo A son pequeñas (1 mm de diámetro) y duras; se pueden desplazar sobre la placa sin romperse. Son de un blanco gris opaco, y se rodean de una zona de hemólisis beta (cerca de 2 mm de ancho). Son muy sensibles a bacitracina (+++), no hidrolizan el hipurato, no crece a 10°C ni a 45°C. Ejemplo: *Str. pyogenes*. (3,11,24).

GRUPO B : Este grupo incluye tipos alfa y beta hemolíticos, producen coriamionitis, fiebre puerperal, meningitis, septicemia en neonato y mastitis bovina.

En agar sangre producen colonias grises, translúcidas, hemolíticas, estrechas e incompletas. No es sensible a bacitracina, presentan el factor CAMP, si hidroliza el hipurato y no crece a 10°C ni a 45°C.

Ejemplo: *Str. agalactiae*. (3,11)

GRUPO C : Estos estreptococos presentan el mismo aspecto que los del grupo A. Son patógenos para los animales y constituyen otra causa rara de fiebre puerperal (3).

Sus colonias en agar sangre son iguales a las del grupo A. No es sensible a bacitracina, no hidroliza hipurato y no crece a 10°C ni a 45°C. Ejemplos: Str. equi, Str. zooepidemicus, Str. equisimilis. (11)

GRUPO D: Suelen llamarse enterococos. Sobre agar sangre, las colonias son grises, bastante translúcidas y blandas; pueden ser beta hemolíticas o carecer de poder hemolítico. El microorganismo resiste a temperatura de 60°C durante 30 min., y se puede cultivar en medio de MacConkey. Forman parte de la flora normal del intestino grueso, pero producen algunas infecciones genitourinarias o de heridas, y en contados casos, endocarditis bacteriana (3).

No es sensible a bacitracina, no hidroliza hipurato y si crece a 10°C y a 45°C. Ejemplo: Str. faecalis (variantes). (11)

GRUPOS E y G: En agar sangre, estos estreptococos se presentan como colonias pequeñas que producen una zona de hemólisis beta. No es raro encontrarlos como comensales en garganta, vagina o colon; pero pueden producir cuadros patológicos en vías respiratorias altas. Ejemplo: Str. anginosus. (3,14,24).

1.4- Streptococcus pyogenes.

1.4.1- Clasificación.

Pertenece a los estreptococos beta hemolíticos del grupo A de Lancefield.

1.4.2- Morfología

Microscópicamente son cocos redondos u ovals, que debido a su forma de multiplicación, se encuentran solos, en pares, cadenas de cocos o de diplococos de longitud variable según las condiciones de cultivo.

Las células son pequeñas, generalmente menor de 1 micra de diámetro.

Son grampositivos, no esporulados e inmóviles, presentan fimbrias y forma cápsula compuesta por ácido hialurónico. (15)

Macroscópicamente, las colonias de estreptococos beta hemolítico son características en forma de punta de alfiler o de cabeza de alfiler, miden de 0.5 a 1.0 mm de diámetro, son translúcidas pero levemente opacas, más o blancas y convexas (20).

Hay tres tipos diferentes de colonias: brillante, mucóide y mate.

Colonias tipo brillante: La mayoría de las colonias de los estreptococos beta hemolíticos son en forma de punta de alfiler, rodeadas por una zona de beta hemólisis completa de dos a cuatro veces el largo del diámetro de la colonia. Esta característica es muy importante para distinguir el estreptococo beta hemolítico del estafilococo beta hemolítico y de las enterobacterias.

La zona hemolítica es usualmente limitada por la superficie del agar. Bajo la luz fluorescente, la picadura será usualmente iluminada, con una línea paralela de hemólisis clara extendiéndose a pocos milímetros de cada lado de la picadura. Este tipo de hemólisis profunda es causada por una enzima hemolítica oxígeno lábil en las colonias estreptocócicas abajo de la superficie del agar y protegida por la mayor parte del oxígeno atmosférico.

Esta hemolisina profunda ejerce un efecto lítico más poderoso sobre la membrana celular de los glóbulos rojos y crea una zona hemolítica transparente. Ocasionalmente, la picadura es el único sitio de beta hemólisis producida por el estreptococo del grupo A. A diferencia de la hemolisina oxígeno lábil, la hemolisina S es no inmunogénica y no puede ser detectada por pruebas serológicas. A veces los glóbulos rojos son tan hemolizados que se puede ver el papel impreso a través de la placa de agar (20).

Colonias tipo mucóide : Este tipo de colonias en forma de cabecilla de alfiler tienen un diámetro de 1 a 2 mm, son convexas, brillantes y translúcidas. La apariencia mucóide es debida a un denso contenido de ácido hialurónico, un gel en la cápsula alrededor de la pared celular.

Colonias tipo mate : Las colonias mucóides que tienen una apariencia seca, rugosa después de 24 horas de incubación, son llamadas colonias mate (20).

1.4.3.- Fisiología.

Son microorganismos difíciles de aislar y se requiere de medios enriquecidos (BH, soya triptícase, agar sangre, etc.) para su aislamiento. Son an aerobios facultativos, catalasa y oxidasa negativos y no reducen los nitratos, propiedades que los distinguen de los estafilococos. No fermentan la inulina y no son disueltos por bilis, circunstancias que los distinguen de Streptococcus pneumoniae. Estos microorganismos quimioorganótrofos por la fermentación de carbohidratos forman : ácido láctico (que acidifica el medio y limita el desarrollo), acético y fórmico; etanol y CO₂. Son sensibles a bacitracina y no hidrolizan el hipurato (7,8,9,15).

1.4.4.- Estructuras antigénicas.

La figura 1 presenta el esquema de un estreptococo.

El estreptococo patógeno tiene una cápsula formada por ácido hialurónico; como éste es un componente normal de los tejidos, no es antigénico y no hay respuesta inmunitaria. La cápsula es un factor de virulencia del estreptococo. En esta matriz capsular se encuentran fimbrias, proyecciones en forma de vellosidades que rodean la célula bacteriana. Están formadas principalmente por ácido lipoteicoico. Esta sustancia reconoce receptores específicos en las células epiteliales y es otro factor de virulencia relacionado con el mecanismo de adhesión del microorganismo del epitelio. El ácido lipoteicoico, a diferencia del hialurínido, es antigénico y se pueden reconocer anticuerpos contra él. Existen también diversos componentes proteicos en la pared de la bacteria, los cuales se resumen en el cuadro 1. (11)

1.4.5.- Toxinas y enzimas.

Cuando se cultivan estreptococos en medio fluido se liberan diversas sustancias, toxinas y enzimas con gran variedad de acciones biológicas.

El hecho de que en el suero humano de individuos que han sufrido infección por estreptococos existan anticuerpos contra esas sustancias, prueba que se generan también "in vivo" y abre la posibilidad de que tengan capacidad patógena. (11)

Las diversas sustancias, toxinas y enzimas producidas por el estreptococo y los anticuerpos que producen se resumen en el cuadro 2. (15)

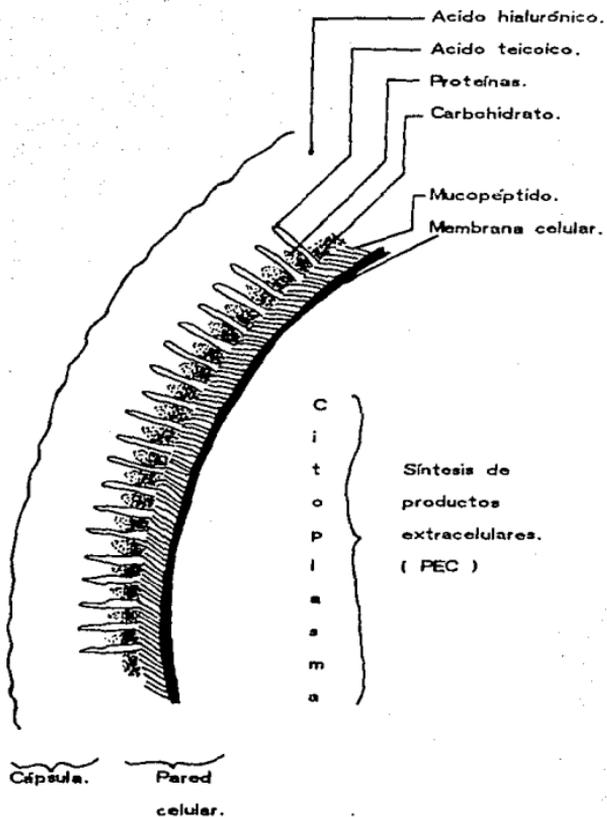


Figura 1.- Estructura esquemática del estreptococo grupo A beta hemolítico. (11)

Cuadro 1.- Componentes del Estreptococo grupo A beta hemolítico. (11)

COMPONENTE	COMPOSICION	DISTRIBUCION	COMENTARIO
Cápsula de ácido hialurónico.	Polímero de N-acetilglucosamina y Ácido glucourónico.	Cápsula de la mayoría de cepas grupo A y algunas gpo. C.	Efecto antifagocítico. El suero humano contrarresta ese efecto.
Acido teicoico.	Polímero de alfa glicero-fosfato.	Fimbrias.	Adherencia a mucosas.
Proteínas. M	Proteína	Antígeno tipo específico.	Efecto antifagocítico.
MAP	Proteína	Varias proteínas asociadas a M.	Efectos poco definidos.
T, R	Proteína	Antígenos de la pared.	Antígenos. Participan en reacciones de aglutinación.
Carbohidrato	Polisacárido, ramosa componente principal.	Parte integral de la pared, por abajo de las proteínas.	Antígeno de grupo. Factor tóxico.
Mucopéptido.	Polímero de ácido N-acetilmurámico.	Capa interna de la pared.	Exoesqueleto.
Membrana celular.	Proteínas, lípidos.		Membrana limitante de proto-plastos (L).

Cuadro 2.- Toxinas y enzimas estreptocócicas más importantes y su correspondiente anticuerpo. (15)

TOXINA O ENZIMA	ANTICUERPO
Acido hialurónico.	Sin poder antigénico.
Alfahemolisina.	
Desoxirribonucleasas.	Antiestreptodornasa.
Estreptoquinasa.	Antiestreptoquinasa.
Estreptolisina O.	Antiestreptolisina O.
Estreptolisina S.	Sin poder antigénico.
Hialuronidasa.	Antihialuronidasa.
Leucocidina.	Antileucocidina.
Nicotinamida-Adenina-Dinucleotidasa.	
Ribonucleasa.	Anti NAD-asa.
Toxina eritrogénica.	Antitoxina eritrogénica.

1.5.- Aislamiento.

La flora de la región faríngea presenta problemas peculiares para el aislamiento e identificación de microorganismos, tanto por lo que se refiere a los componentes de la flora normal, como a los microorganismos con acción patogénica.

Es importante recordar que algunos microorganismos tienen capacidad patogénica definida y su presencia es un indicio claro de enfermedades, en tanto que otros, llamados "oportunistas", guardan una posición ambigua y pueden encontrarse tanto como componentes de la flora normal, como asociados a procesos patológicos, causados por otros microorganismos que son los verdaderos responsables (por ejemplo virus).

Los métodos utilizados deben seleccionarse de tal manera que permitan tanto el aislamiento de microorganismos grampositivos como de gramnegativos, además de detectar algunos otros agentes específicos de enfermedades.

La selección de un esquema de aislamiento e identificación se deberá llevar a cabo de acuerdo con las necesidades y la orientación proporcionada por el clínico, o bien, de manera que permitan un examen amplio de la flora faríngea.

El aislamiento de grampositivos se deberá orientar al cultivo de estreptococos y estafilococos y determinación de sus características de hemólisis. (16).

Los estreptococos deben diferenciarse e identificarse por varias razones. Aproximadamente, el 35% de todas las infecciones de las vías respiratorias superiores son causadas por estreptococos beta hemolíticos; de las restantes, algunas son causadas por virus.

Dado que no hay signos o síntomas clínicos particulares asociados con las infecciones de las vías respiratorias superiores por estreptococos, o por virus, el cultivo y la confirmación de la presencia o la ausencia de estreptococos beta hemolíticos es el único método para determinar la causa de la enfermedad. (14).

El estreptococo puede estar presente en gran número como componente de la flora normal, pero bajo ciertas circunstancias puede estar asociado con infecciones o ser el responsable principal de las mismas. El aislamiento de estas bacterias presenta problemas para los laboratorios bacteriológicos en vista de que ese microorganismo puede encontrarse en diferentes partes del organismo, y por lo tanto mezclado a otras bacterias que entorpecen su desarrollo en los medios de cultivo, o bien, enmascaran su presencia.

Obtención, transporte, enriquecimiento y conservación de las muestras.

1.5.1.- Obtención.

a) Hisopos: Existen varias clases de hisopos para obtener muestras de la garganta, de lesiones cutáneas y de heridas.

Se ha dicho que las sustancias tóxicas de los hisopos de algodón pueden matar algunas de las bacterias, pero no se ha substanciado la base para esta preocupación. Estudios en que se han comparado las tasas de recuperación de estreptococos de hisopos hechos de algodón, dacrón, fortral, 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. (14)

b) Cultivos de la garganta: La figura 2 muestra el procedimiento correcto para obtener un cultivo de garganta.

Para obtener resultados óptimos deberán tomarse las muestras antes del inicio de la terapia antimicrobiana y de los sitios afectados. (16)

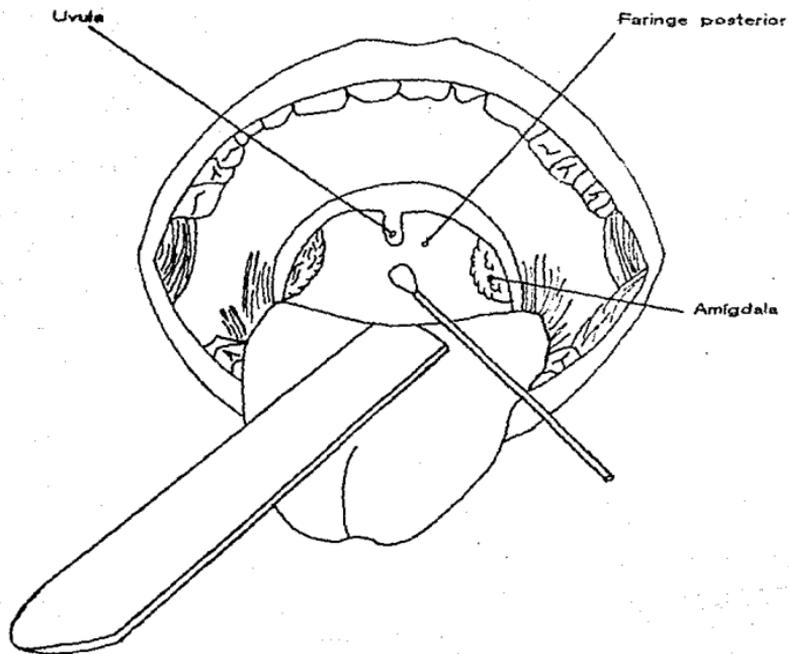


Figura 2.- Toma de muestra de un exudado faríngeo. (15)

Se inclina hacia atrás la cabeza del paciente y se ilumina bien la garganta. Se empuja la lengua hacia abajo de modo que pueda observarse la parte posterior de la garganta. Se frota el hisopo de arbié abajo contra la parte posterior de la garganta y contra cualquier mancha blanca que se encuentre en la zona de las amígdalas. (14)

También deberán tocarse otros sitios afectados de la faringe y en general, cualquier área que manifieste signos de inflamación exudados y úlceras, procurando no tocar con el hisopo la lengua, labios, ni los otros anexos de la cavidad bucal del paciente.

Es preferible emplear dos hisopos, con el primero haga frotis y con el segundo siembre el producto en los medios adecuados.

El tiempo máximo para hacer las siembras será de 1 a 2 horas después de la recolección del material clínico, salvo cuando se utilicen medios de transporte. (16)

Los dos errores más comunes que dan lugar a muestras inadecuadas son: 1) Pasar el hisopo por los tejidos de la lengua o de la úvula, en lugar de la faringe, y 2) Exponer inadecuadamente a la faringe, ya que ésta deberá estar adecuadamente expuesta e iluminada. (13)

c) Cultivos de piel y heridas : La piel con costra se retira asepticamente con un escalpelo estéril. Se limpia la lesión con gasa y se presiona firmemente el hisopo contra la lesión, haciéndolo girar sobre toda la superficie de la lesión. Las heridas pueden tratarse de la misma manera. Se separe la costra externa y se introduce el hisopo en la parte más profunda de la herida, teniendo cuidado de no desgarrar las membranas. (14)

d) Cultivos de nariz : Los cultivos nasales deben tomarse con un miembro flexible estéril con punta de algodón. El hisopo puede humedecerse con agua estéril o solución salina antes de introducirlo. La punta de la nariz se levanta con una mano, y el hisopo se introduce suavemente a lo largo del piso de la cavidad nasal, por debajo del cornete mediano, hasta llegar a la pared faríngea. No debe usarse la fuerza; si se encuentra alguna obstrucción, el cultivo nasofaríngeo no puede tomarse de ese lado. (13)

15.2.- Transporte.

El método de transporte del hisopo al laboratorio bacteriológico depende: 1) de la fuente de la muestra, 2) del tiempo que se espera que la muestra esté en tránsito, y 3) de las ideas del médico que remite la muestra y del director del laboratorio, es decir, de las bacterias que consideran que son patógenas de las vías respiratorias superiores.

Si los estreptococos son los únicos organismos patógenos que se buscan en los hisopos, puede utilizarse el sistema de transporte descrito en el cuadro 3.

Si se espera que no transcurran más de 2 horas entre el momento de obtención de la muestra en el hisopo y el momento en que éste se examina en el laboratorio, no es necesario adoptar precauciones especiales.

Los estreptococos sobreviven bien en un medio seco. (13,14)

15.3.- Enriquecimiento.

El transporte de los hisopos en un medio de enriquecimiento aumenta la recuperación de estreptococos beta hemolíticos. El enriquecimiento se hace colocándolos en un medio de caldo de cultivo durante un periodo determinado (4 a 24 horas) antes de sembrarlos en placas de agar sangre. Cualquier buena base de caldo de infusión es satisfactoria para el enriquecimiento. La infusión de cerebro corazón, la infusión de soya y tripticasa, la infusión de Todd-Hewitt y la infusión de corazón son algunos de los caldos de cultivo utilizados comúnmente.

Se han utilizado inhibidores selectivos tales como cristal violeta (1 $\mu\text{g/ml}$), neomicina (30 $\mu\text{g/ml}$) y gentamicina (5.5 $\mu\text{g/ml}$) satisfactoriamente como inhibidores en medios de cultivo de caldo o de agar sangre. Se ha comunicado la utilización de bases de agar y de caldos de cultivo con una combinación de inhibidores selectivos, tales como el de colistina-ácido nalidixico y el de gentamicina-ácido nalidixico para aislar los estreptococos de hisopos altamente contaminados. (14)

Cuadro 3.- Métodos de transporte para hisopos con estreptococos (14)

Periodo de tránsito	Sistema de transporte
0 a 2 horas	Ninguno
2 a 24 horas	Medio de transporte de Stuart o de Amies.
1 a varios días	Silica gel

1.5.4.- Conservación.

La mayoría de los estreptococos sobrevive durante varios meses en agar sangre bien tapado y conservado a 4°C. Son excepciones la cepa neumocócica y algunas cepas viridans que no sobreviven más de una semana. Ninguna cepa de estreptococos sobrevive bien en caldos de cultivo, algunas mueren ya a los 3 o 4 días. Todos los estreptococos sobreviven de 1 a 2 años congelados en sangre a -70°C y durante 20 años si están liofilizados. (13)

1.5.5.- Exámen directo.

El exámen de las muestras recibidas en el laboratorio microbiológico comprende dos tipos de procedimientos generales.

Primero, el exámen directo en una extensión teñida o sin teñir y, en segundo lugar, el cultivo de los medios adecuados. (4)

El exámen directo de muestras de garganta y nariz tiene poco valor para identificar estreptococos patógenos. Los no patógenos son habitantes normales de éstas áreas y no difieren de los patógenos en su forma de teñirse ni en su morfología celular. (13)

Los frotis hechos a partir de raspados faríngeos o de exudados purulentos frecuentemente muestran más bien cocos aislados o puros de ellos que cadenas bien definidas.

Los frotis de cultivo en caldo de exudado faríngeo pueden ser teñidos después de 2 o 3 horas de incubación con el anticuerpo específico fluorescente grupo A, para identificación más rápida de los estreptococos del grupo A en los casos clínicos o en los portadores. (10)

1.5.6.- Cultivo.

Como se mencionó anteriormente, los estreptococos son selectivos en cuanto a sus necesidades nutritivas. La infusión enriquecida de agar y caldo, como soya triptícasea, la infusión cardiaca, el medio de Todd-Hewitt o la peptona proteosa son los que deben usarse. Estos medios están libres de azúcares reductores, sustancias que influyen en la expresión de la beta hemólisis de los estreptococos. (13)

Este microorganismo se aísla de nasofaríngeo, faríngeo, pus, expectoración, líquido cefalorraquídeo, lesiones de piel, exudados, orina, sangre y algunas veces de leche.

Para el primoaislamiento se recomienda utilizar un caldo enriquecido de los mencionados arriba, en el cual se coloque el hisopo con la muestra y se incuba a 37°C por un espacio mínimo de 2 horas y un máximo de 4 horas. Después de esto se quita el medio en exceso del hisopo y se siembra en una placa de agar sangre de carnero al 5%, se estría la caja con un asa bacteriológica y con la misma se hacen picaduras en el medio, en un ángulo aproximado de 45° para poner de manifiesto la hemólisis O. También pueden ser cultivados, depositando el inóculo directamente en la placa de agar sangre de carnero al 5%, inmediatamente después de su obtención. (15)

Se incuban las placas en posición invertida con los medios hacia arriba a 37°C y se examinan a intervalos de 24 y 48 horas, se observa la morfología colonial. (4)

Típicamente, después de 18 a 24 horas de incubación en agar sangre, las colonias de estreptococos grupo A son pequeñas, elevadas, de 0.5 mm de diámetro, transparentes o translúcidas, a veces opacas, superficie lisa y borde entero, duras y secas.

Están rodeadas de una zona bien definida de hemólisis total, generalmente de diámetro del doble al cuádruple del de la colonia misma.

Tienen la característica de que al tratar de levantarlas con el asa bacteriológica, resbalan sobre el medio.

El aspecto de las colonias depende marcadamente del medio usado, y no todas las características coloniales se manifiestan en un solo medio. (13,16)

1.5.7.- Identificación.

Después de observar la morfología colonial se pueden hacer pruebas microbiológicas basadas en su fisiología, su sensibilidad y/o sus características antigénicas.

Basándose en su sensibilidad se realizan:

- I) - Prueba de la Bacitracina.
- Pruebas del Sulfametoxazol-trimetoprim (SXT).

De acuerdo a su fisiología:

- II) - Determinación de la presencia del factor CAMP.
- Hidrólisis del hipurato de sodio.
- Hidrólisis de esculina en presencia de bilis al 4%.
- Capacidad para desarrollar en presencia de NaCl al 6.5%.

Por sus características antigénicas:

- III) - Prueba de precipitinas.
- Coagulación.
- Aglutinación con látex.
- Contrainmunolectroforesis.
- Inmunofluorescencia.

1) a.- Prueba de la bacitracina.

En 1953, Maxted observó que estreptococos del grupo A eran más sensibles que los demás beta hemolíticos a un rango determinado de concentración de bacitracina (0.02 a 0.04 unidades).

Para realizar de manera conveniente la prueba de la bacitracina se recomienda seguir las siguientes instrucciones:

1. Emplear discos diferenciales y no de susceptibilidad; habrá que asegurarse de adquirir discos que contengan de 0.02 a 0.04 U y no de concentraciones mayores; los discos que se utilizan para la prueba de susceptibilidad poseen una concentración elevada para diferenciar entre estreptococos del grupo A y los demás.

Para el primoaisamiento se recomienda utilizar un caldo enriquecido de los mencionados arriba, en el cual se coloque el hisopo con la muestra y se incuba a 37°C por un espacio mínimo de 2 horas y un máximo de 4 horas. Después de esto se quita el medio en exceso del hisopo y se siembra en una placa de agar sangre de carnero al 5%, se estria la caja con un asa bacteriológica y con la misma se hacen picaduras en el medio, en un ángulo aproximado de 45° para poner de manifiesto la hemólisis O. También pueden ser cultivados, depositando el inóculo directamente en la placa de agar sangre de carnero al 5%, inmediatamente después de su obtención. (15)

Se incuban las placas en posición invertida con los medios hacia arriba a 37°C y se examinan a intervalos de 24 y 48 horas, se observa la morfología colonial. (4)

Típicamente, después de 18 a 24 horas de incubación en agar sangre, las colonias de estreptococos grupo A son pequeñas, elevadas, de 0.5 mm de diámetro, transparentes o translúcidas, a veces opacas, superficie lisa y borde entero, duras y secas.

Están rodeadas de una zona bien definida de hemólisis total, generalmente de diámetro del doble al cuádruple del de la colonia misma.

Tienen la característica de que al tratar de levantarlas con el asa bacteriológica, resbalan sobre el medio.

El aspecto de las colonias depende marcadamente del medio usado, y no todas las características coloniales se manifiestan en un solo medio. (13,16)

1.5.7.- Identificación.

Después de observar la morfología colonial se pueden hacer pruebas microbiológicas basadas en su fisiología, su sensibilidad y/o sus características antigénicas.

Basándose en su sensibilidad se realizan:

- I) - Prueba de la Bacitracina.
- Pruebas del Sulfametoxazol-trimetoprim (SXT).

De acuerdo a su fisiología:

- II) - Determinación de la presencia del factor CAMP.
- Hidrólisis del hipurato de sodio.
- Hidrólisis de osculina en presencia de bilis al 4%.
- Capacidad para desarrollar en presencia de NaCl al 6.5%.

Por sus características antigénicas:

- III) - Prueba de precipitinas.
- Coagulación.
- Aglutinación con látex.
- Contraelectroforesis.
- Inmunofluorescencia.

I) a.- Prueba de la bacitracina.

En 1953, Maxted observó que estreptococos del grupo A eran más sensibles que los demás beta hemolíticos a un rango determinado de concentración de bacitracina (0.02 a 0.04 unidades).

Para realizar de manera conveniente la prueba de la bacitracina se recomienda seguir las siguientes instrucciones:

1. Emplear discos diferenciales y no de susceptibilidad; habrá que asegurarse de adquirir discos que contengan de 0.02 a 0.04 U y no de concentraciones mayores; los discos que se utilizan para la prueba de susceptibilidad poseen una concentración elevada para diferenciar entre estreptococos del grupo A y los demás.

2. Se recomienda emplear un inóculo abundante de un cultivo puro pues, de otro modo, las cepas de estreptococos que no pertenezcan al grupo A podrían aparecer como sensibles a la bacitracina.

3. La prueba ha sido diseñada para realizarse en cultivos puros y no mixtos: el uso de discos diferenciales en placas primarias inoculadas con hisopos de faringe, sólo ha permitido lograr un 70% de precisión en la identificación del estreptococo del grupo A.

4. La prueba está destinada a diferenciar estreptococos beta hemolíticos. Debe determinarse el tipo de hemólisis porque muchos estreptococos alfa hemolíticos, incluso los neumococos, son sensibles a la concentración diferencial de bacitracina.

5. Interpretar como positiva la prueba cuando exista cualquier zona de inhibición, independientemente de su tamaño.

Para efectuar la lectura de la prueba, deben aplicarse los siguientes criterios: (a) toda zona de inhibición, cualquiera que sea su diámetro, indica que el cultivo es sensible, (b) la ausencia de zonas de inhibición (crecimiento hasta la orilla misma del disco) significa que el cultivo es resistente.

Maxted no especificó que la zona debía tener tal o cual tamaño; además, no se conocen datos experimentales que digan que los diámetros de la zona deban medirse con el fin de diferenciar a estreptococos del grupo A de los demás.

6. Utilizar una base de agar de infusión con un 5% de sangre de carnero.

La prueba de bacitracina se realiza de la siguiente forma:

Se toma un inóculo abundante (de tres a cuatro colonias de un caldo incubado durante toda la noche) de un cultivo puro de estreptococos beta hemolíticos y se estra en agar de infusión con 5% de sangre de carnero. Una vez colocado el disco, se incuba a 37°C y, al día siguiente, se efectúa la lectura e interpretación de la prueba. (Fig. 3)

Se debe tener presente que otras cepas de estreptococos beta hemolíticos distintas del grupo A también pueden producir una reacción positiva, por lo cual el informe de laboratorio deberá decir: "identificación presuntiva de estreptococos beta hemolíticos del grupo A por bacitracina" o "estreptococos beta hemolíticos no pertenecientes al grupo A por bacitracina". (17,20,26,31)

b.- Pruebas de SXT.

Los estreptococos beta hemolíticos de grupos A y B muestran un patrón de resistencia cuando se les hace crecer con un disco que contiene 1.25 mg de trimetoprim y 23.75 mg de sulfametoxazol; por su parte, la mayoría de las cepas de los grupos C, F y G son susceptibles.

El procedimiento y lectura de esta prueba son análogos a los descritos para la bacitracina con la única diferencia de que el medio se elabora con una base de agar de tripticasa y soya. (18,21,31)

II) c.- Determinación de la presencia del factor CAMP.

El fenómeno provocado por el factor CAMP (proteína extracelular termolabile producida por estreptococos del grupo B y, bajo ciertas condiciones, por algunos miembros del A), fue descrito en 1944 por los investigadores Christie, Atkins y Munch-Peterson, cuya contribución se reconoce en las siglas CAMP.

El factor CAMP intensifica la actividad hemolítica de hemolisina beta de Staphylococcus aureus cuando ésta actúa sobre eritrocitos de carnero o bovino; tal propiedad se utiliza para identificar a estreptococos del grupo B

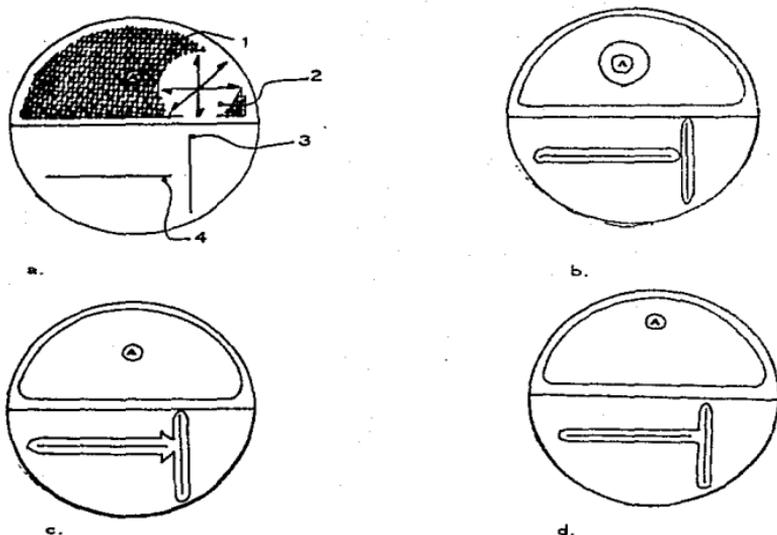


Figura 3.- Procedimiento e interpretación de las pruebas de sensibilidad a bacitracina y CAMP.

- a. 1 Disco A de Bacitracina (0.02 a 0.04 U).
 - 2 Dirección de las estrías de Streptococcus beta hemolítico.
 - 3 Estría de Staphylococcus aureus beta hemolítico.
 - 4 Estría de Streptococcus beta hemolítico.
- b. Strep. beta hemolítico grupo A presuntivo por bacitracina
 - c. Strep. beta hemolítico grupo B presuntivo por CAMP.
 - d. Strep. beta hemolítico diferente del grupo A y B por bacitracina y CAMP. respectivamente. (15)

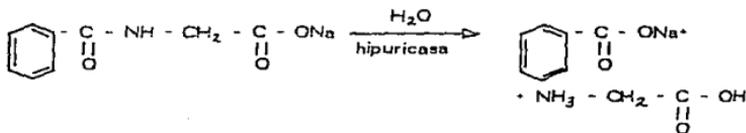
La prueba se efectúa trazando una sola estría del cultivo de estreptococos en sentido perpendicular a una estría de una cepa de Staphylococcus aureus productora de hemolisina beta. Las estriadas de ambos microorganismos no deben estar en contacto sino separadas aproximadamente 1 cm, como se muestra en la figura 3.

Para realizar la prueba, se utiliza, una base de agar de tripticasa y soya adicionada de sangre de carnero que ha sido resuspendida en solución salina. Una vez que se ha inoculado la placa, se incuba aeróbicamente por 18 horas. Aunque la reacción de CAMP ocurre para los estreptococos del grupo B tanto en condiciones aerobias como anaerobias, si la incubación es en atmósfera parcial de CO₂, se observarán algunas cepas del grupo A como CAMP positivas, y si se incuba anaeróbicamente, habrá un mayor número de reacciones falsas positivas producidas por el grupo A. Por esta razón, la prueba debe realizarse, en aerobiosis.

Las lecturas podrán hacerse desde las cinco o seis horas de incubación; en una prueba positiva, la región donde se intensifica la lisis assume la forma de una punta de flecha como se aprecia en la figura. 3. (3)

d.- Hidrólisis del hipurato de sodio.

Las cepas beta hemolíticas y no hemolíticas del grupo B, poseen la enzima hipuricasa, la cual hidroliza al hipurato de sodio provocando la formación de benzoato de sodio y glicina, como se muestra en la siguiente reacción :



La hidrólisis del hipurato de sodio se puede hacer evidente detectando la producción del benzoato de sodio o de la glicina.

Para demostrar la presencia del benzoato de sodio se efectúa una reacción con cloruro férrico al 7%, éste precipita proteínas, hipurato y benzoato; sin embargo, las proteínas y el hipurato se disuelven con más facilidad en exceso de reactivo, por lo tanto, la persistencia de un precipitado en el caldo hipurato después de añadir un exceso de cloruro férrico, indica la existencia de benzoato.

La prueba del hipurato se realiza inoculando un tubo de caldo hipurato con dos o tres colonias del microorganismo sospechoso, enseguida se incuba a 35°C durante 20 horas o más. Después de este tiempo, se centrifuga el medio para sedimentar las células y se transfieren 0.8 ml del sobrenadante a un tubo limpio al que se le agregan 0.2 ml del reactivo acidificado de cloruro férrico.

Si el precipitado que se forma después de agregar el cloruro férrico persiste más de 10 minutos, es que se ha formado benzoato de sodio, lo cual indica que hubo hidrólisis y, por ello, la prueba se considera positiva.

Para identificar la glicina, se utiliza el reactivo de ninhidrina: este compuesto es un oxidante energético que desamina grupos alfa amino, liberando NH_3 y CO_2 . El amoniaco reacciona con la ninhidrina residual dando un color púrpura.

En esta prueba se incula una asada de una suspensión de cultivo del microorganismo a investigar en 0.4 ml de reactivo de hipurato de sodio al 1% y se incuba durante 2 horas a 35°C .

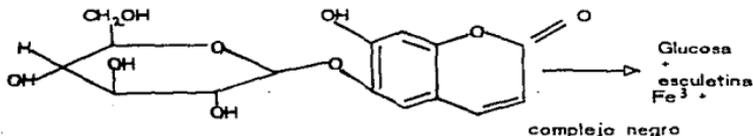
Después se agregan 0.2 ml del reactivo de ninhidrina; si aparece un color púrpura intenso, la prueba es positiva. (31)

e.- Hidrólisis de esculina en presencia de bilis al 4%.

La prueba se basa en la capacidad que poseen ciertas bacterias, en particular los estreptococos del grupo D, de hidrolizar esculina en presencia de bilis al 1 o 4%. La esculina químicamente es un derivado de la cumarina (6-beta-glucósido-hidroxicumarina), que por su estructura pertenece a la clase de compuestos conocidos como glucósidos.

Los productos de la hidrólisis de la esculina son la glucosa y la esculetina (7,7 dihidroxicumarina), esta última reacciona con sal de hierro para formar un complejo marrón oscuro o negro, lo que produce ennegrecimiento del medio bilia-esculina, ya que éste contiene citrato férrico como revelador.

La reacción es la siguiente:



Se desconoce la fórmula química exacta del complejo de hierro formado por la esculetina.

La prueba se efectúa en un tubo con agar inclinado o en placa. En ambos casos, se inoculan en el medio de agar bilia-esculina, dos o tres colonias del microorganismo a probar y se incuba a 35°C ; la prueba es positiva si el agar se ennegrece en 24 o 48 horas. (31)

f.- Capacidad para desarrollar en presencia de NaCl al 6.5%.

Esta prueba permite clasificar a los estreptococos del grupo D en enterococos y no enterococos.

Los enterococos (*S. faecalis* y sus variedades *zymogenes* y *liquefaciens*, *S. faecium* y *S. durans*) se desarrollan tanto en medios líquidos como sólidos que se emplean para la prueba y, aunque producen la modificación del indicador en un plazo de 24 horas, algunas cepas tardan en hacerlo hasta 48 o 72 horas e incluso puede ocurrir que no se produzca el vir del indicador a pesar del desarrollo bacteriano. Aparte de los enterococos, cerca del 80% de estreptococos del grupo B crecen en este medio provocando el vir del indicador; otros grupos como A, C, F y G en general no se desarrollan en él.

Los microorganismos no enterocócicos del grupo D como *S. bovis* y *S. equinus*, así como *S. viridans* no crecen en este medio.

Cuadro 4 - Criterios para agrupar a los estreptococos cuando sólo se realizan pruebas microbiológicas. (31)

GRUPO	PRUEBA MICROBIOLÓGICA
A	Beta hemolíticos. Sensibles a bacitracina. Resistentes a SXT. Reacción de CAMP (-). Bilis-esculina (-).
B	Beta hemolíticos. Bacitracina (variable). SXT (variable). Reacción de CAMP (+). Bilis-esculina (-).
B	No beta hemolíticos. Reacciones similares a los ant.
C, F y G	Beta hemolíticos. Reaccionan de 3 formas a bacitracina y al SXT: a) La mayor parte de la cepas son: Resistentes a bacitracina. Sensibles a SXT. b) Un número considerable de cepas: Sensibles a bacitracina. Sensibles a SXT. c) Pocas son: Resistentes a bacitracina. Resistentes a SXT. Reacción de CAMP (-). Bilis-esculina (-).
D	La mayoría no hemolíticos. Algunos alfa o beta hemolíticos. Resistentes a bacitracina. Reacción de CAMP (-).
D - Enterococos	a) Gran número de cepas: Bilis-esculina (+). Desarrollo en NaCl al 65%. Resistentes a SXT. b) Algunas cepas: Bilis-esculina (+). Desarrollo en NaCl al 65%. Sensibles a SXT. c) Bilis-esculina (-). Desarrollo en NaCl al 65%. Resistentes a SXT.

Para la prueba en caldo, se inoculan dos o tres colonias y se incuban a 35°C. La reacción es positiva si el indicador cambia de color púrpura a amarillo en 24 o 48 horas o cuando el crecimiento es evidente aunque el indicador no viere.

En la prueba en placa, se inoculan dos o tres colonias en el medio y se incuban toda la noche en una atmósfera normal o con CO₂ a 35°C. La prueba es positiva si el crecimiento es visible en la superficie y es negativa si no hay desarrollo después de 24 horas.

La prueba bñs esculina positiva y el crecimiento en caldo con NaCl al 6.5% confirman la presencia de enterococos. (31)

III) La mejor opción que hay para identificar a los estreptococos, es demostrar la presencia del carbohidrato específico de grupo mediante una reacción entre el antígeno y suero correspondiente (pruebas serológicas). De esta forma se puede detectar a cual de los 21 grupos (designados de la letra A a la W excepto la letra I y J) pertenece el microorganismo en cuestión. (25,26,31)

Cuadro 5.- Técnicas de extracción antigénica para agrupar serológicamente a los estreptococos.. (31)

INVESTIGADOR	TECNICA	VENTAJAS	LIMITACIONES
Lancefield	Acido caliente	Extrae antígenos de tipo proteico, carbohidratos y ácidos teicoicos.	Es compleja, requiere tiempo y dos ajustes de pH.
Fuller	Formamida caliente	Extrae a todos los antígenos de grupo.	Es compleja, requiere un ajuste de pH y destruye los antígenos proteicos de los grupos A y B.
Rantz y Randall	Autoclave	Extrae a todos los antígenos de grupo.	Es sencilla.
El Kholy	Acido nitroso	Relativamente sencilla.	No se sabe que tan bien funciona con los grupos D y F, requiere un ajuste de pH.
Maxted	Enzima de <u>Streptomyces albus</u> .	Es sencilla.	No extrae el antígeno de la mayoría de las cepas grupo D.
Ederer	Enzima pronasa B	Es sencilla.	No extrae bien los antígenos de los grupos D y F.

INVESTIGADOR
Watson

TECNICA
Mezcla enzimática:
Streptomyces
albus-lisozima.

VENTAJAS
Es sencilla,
extrae todos los
antígenos de
grupo.

LIMITACIONES
Es la más costosa.

1.5.8.- Evaluación de los cultivos.

La información que debe reportar un laboratorio de un cultivo positivo es:

1) La identidad del microorganismo aislado o su probable identidad.

2) El número relativo de microorganismos presentes.

La estimación del número de microorganismos presentes puede realizarse por cruces de la siguiente manera:

- - Negativo.
- /+ - Muy escaso crecimiento.
- /- - Escaso crecimiento.
- + - Poco crecimiento.
- ++ - Moderado crecimiento.
- +++ - Excelente crecimiento.

1.6.- Patogenia.

A la infección por estreptococos están asociados una diversidad de procesos patológicos.

Influyen grandemente en la imagen de la enfermedad las propiedades biológicas del organismo infectante, la naturaleza de la respuesta del huésped, así como la puerta de entrada de la infección.

Las infecciones estreptocócicas pueden ser divididas arbitrariamente en varias categorías:

A.- Enfermedades atribuibles a la invasión por estreptococos beta hemolíticos del grupo A.

- 1) Erisipela.
- 2) Fiebre puerperal.
- 3) Infección generalizada.

B.- Enfermedades atribuibles a la infección local por estreptococos beta hemolíticos del grupo A y a sus productos.

- 1) Faringitis estreptocócica.
- 2) Impétigo.

C.- Endocarditis bacteriana.

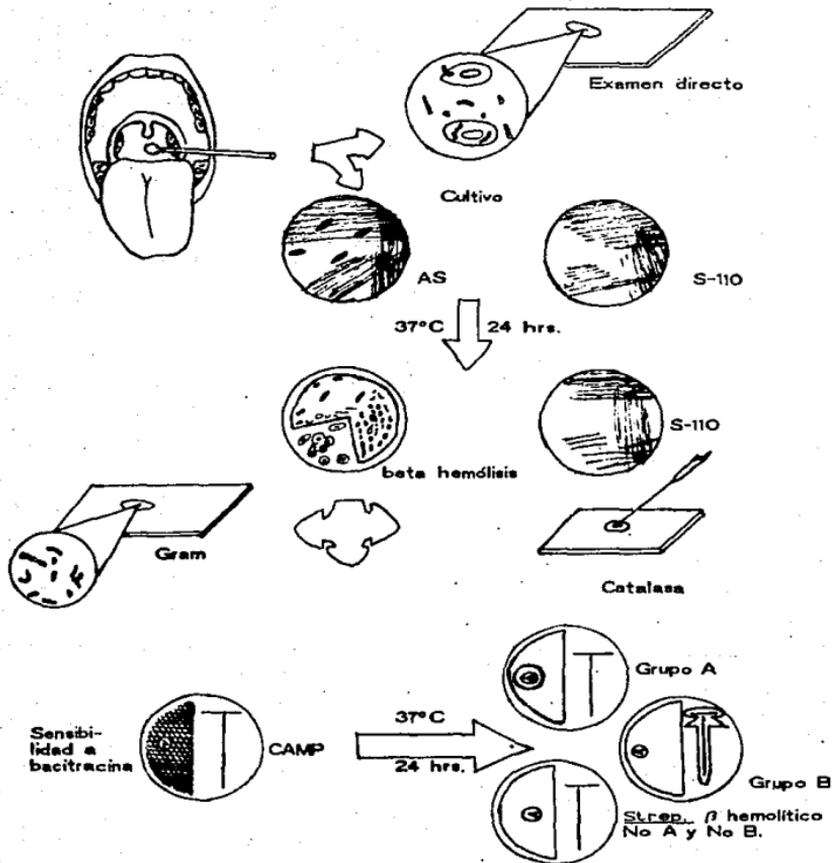
- 1) Endocarditis bacteriana aguda.
- 2) Endocarditis bacteriana subaguda.

D.- Otras infecciones.

- 1) Tracto urinario.
- 2) Genitales femeninos.
- 3) Boca.
- 4) Intestino.

E.- Enfermedades postestreptocócicas.

- 1) Glomerulonefritis.
- 2) Fiebre reumática.
(10,32-42).



Resumen ilustrativo.- Aislamiento e identificación de *Streptococcus* β hemolítico. (15)

1.7.- Epidemiología.

Algunos estreptococos son miembros de la flora normal del cuerpo humano; provocan enfermedades solamente cuando son introducidos en sitios del cuerpo en los que se encuentran en condiciones naturales.

En el caso de los estreptococos beta hemolíticos del grupo A, la fuente original es siempre una persona que hospeda a estos organismos; dicha persona puede padecer una infección demostrable o subclínica, o bien puede tratarse de un portador permanente. Esta persona puede infectar directamente a otras personas por medio de gotitas de Flugge lanzadas a partir de su aparato respiratorio, puede contaminar ropas, ropa de cama, utensilios diversos; incluso puede infectar a un huésped intermediario, por ejemplo, la ubre de una vaca, cuya leche a partir de entonces provocará una diseminación epidémica de los estreptococos.

Las descargas nasales de una persona que hospeda estreptococos hemolíticos parecen ser las fuentes más peligrosas de contaminación masiva del medio ambiente.

El agrupamiento y la tipificación de los estreptococos beta hemolíticos del grupo A, siguiendo el esquema de Lancefield, constituye un procedimiento epidemiológico valioso para determinar la transmisión de las infecciones.

Los procedimientos de control se dirigen contra el medio ambiente contaminado, así como hacia la fuente humana que da origen a dicha contaminación; el tratamiento de sábanas, cobertores y pisos con aceite disminuye la dispersión del polvo contaminado; la ventilación, la filtración del aire, la radiación ultravioleta y el empleo de aerosoles son todos procedimientos que disminuyen el número de gotitas de Flugge infectantes en el aire. La leche, por supuesto, debe ser sometida siempre a pasteurización.

Debido a las grandes dificultades que plantea el control de la contaminación del ambiente, se insiste cada vez más en lo siguiente:

(1) Erradicación de estreptococos beta hemolíticos en los portadores, siempre que sea posible, y la eliminación de éstos de los sitios en los que pueden causar daños de consideración, por ejemplo, en las salas de trabajo de parto de las maternidades.

(2) Quimioterapia temprana e intensa de las infecciones estreptocócicas del tracto respiratorio.

(3) Quimioprofilaxis antiestreptocócica en personas que ya han tenido un ataque de fiebre reumática. (10)

1.8.- Informe breve sobre el pulque.

1.8.1.- Definición.

El pulque es un líquido blanco, viscoso, dulce, con bajo contenido alcohólico y con cierto sabor ácido, obtenido por la fermentación del aguamiel, el cual es el jugo que se obtiene del maguey. (44)

1.8.2.- Importancia.

Esta bebida posee importancia desde varios puntos de vista como son geográfico, económico, bioquímico y sanitario.

Desde el punto de vista geográfico tiene importancia el hecho de que ésta planta vive con poca cantidad de agua anual, esto es, el maguey se desarrolla en zonas semidesérticas de la altiplanicie mexicana donde no se cuenta con suficiente agua.

Evita el desgaste de las tierras inhibiendo la erosión al mantenerse las plantaciones en buen estado todo el tiempo. Ligado a esto está el lado económico del maguey.

El pulque posee múltiples sustancias como vitaminas, sales minerales, aminoácidos esenciales, y una pequeña cantidad de proteínas, que son requeridas por la dieta del ser humano, por lo que al proporcionar estas sustancias al organismo, éste podría ser menos susceptible a diversas enfermedades como la anemia por deficiencia de ácido fólico y de hierro, proporcionando mayor estabilidad en las reacciones corporales.

1.8.3.- Origen del pulque.

Antes del descubrimiento de América, los habitantes del centro de la República ya aprovechaban el maguey de diferentes formas, tales como la elaboración de sus chozas, fabricación de hilos, tejidos, escudos y sandalias. El principal producto que se obtenía de éste, era el pulque que se les daba a los reyes y personas de gran autoridad, pues su consumo no era permitido para todos. En la sociedad de los indígenas, había grandes castigos que se aplicaban a la gente que negociara clandestinamente con el líquido. Con la llegada de los españoles, el consumo del pulque se extendió ampliamente y se reglamentó su comercio.

El origen etimológico de la palabra pulque tiene varias posibles raíces. El nombre de pulque entre los mexicanos era "Itzacocli" o sea, vino blanco, y cuando se descomponía se le conocía como "ocli-poliuqui", y como esto sucedía fácilmente, se piensa que los que lo vendían pronunciaban la palabra poliuki, derivándose de ésta la palabra pulque que en la actualidad se maneja. (45,47,50)

1.8.4.- Composición del pulque.

La composición química y bromatológica del pulque varía dependiendo del lugar donde se encuentre, sea tinnacal, aduana o pulquería, aunque para la realización de los estudios se hace una media de tales variables por lo que las siguientes tablas presentan de manera general la composición del mismo.

Análisis del pulque. (45)

	Contenido en 100 g	
Calcio	0.007	g
Carbohidratos	1.1	g
Energía	43	kcal
Grasa	---	
Hierro	0.0002	g
Niacina	0.004	g
Proteína	0.4	g
Riboflavina	0.0002	g
Tiamina	0.0002	g

Composición química del pulque. (46,49)

Acidez total en ácido láctico	0.39	%
Agua	94.0	%
Cenizas	0.30	%
Densidad a 15°C	0.992	%
Extracto seco a 10°C	1.65	%
Glúcidos	9.5	%
Gomas	0.65	%
Grado de alcohol	7.9	%
Nitrógeno de aminoácidos	0.01	%
Nitrógeno de aminoácidos aromáticos	0.001	%
Nitrógeno proteico	0.05	%
Proteínas totales	0.345	%
Sacarosa	0.04	%

Composición química del pulque (cont.)

Salas minerales	0.32	%
Vitamina B	25-30	UI/ml
Vitamina C	6.5	UI/ml

Análisis microbiológico. (45)

	Tinacal	Aduana	Pulquería
Bacterias x 10 ⁶ /ml	64	36	15
Levaduras x 10 ⁴ /ml	166	115	61
Coliformes fecales, % en el total de muestras analizadas	22.2	32	5.3

Contenido de aminoácidos en el pulque. (47.48)

	Cantidad en 100 g
Arginina	2.32 g
Fenilalanina	2.38 g
Histidina	1.0 g
Leucocina	2.23 g
Lisina	3.43 g
Metionina	0.15 g
Treonina	1.36 g
Triptofano	0.57 g
Valina	1.40 g

Análisis químico. (47)

	Tinacal	Aduana	Pulquería
Alcohol % en Vol° Gl	5.56	7.16	6.33
pH	3.93	3.73	3.84
Sacarosa ml/100ml	114.4	97.33	85.36
Viscosidad en centipoises	9.12	13.83	3.075

Constituyentes nutritivos del pulque. (45,46,49)

	Contenido en 100 g
Calcio	0.01 g
Carbohidratos totales	0.08 g
Caroteno (pro-vit A)	—
Cenizas	0.37 g
Hierro	0.0007 g
Fósforo	0.06 g
Niacina	0.035 g
Proteínas	0.37 g
Riboflavina (vit B)	0.003 g

2.- FUNDAMENTACION DEL TEMA.

Los estreptococos beta hemolíticos son agentes causantes de varios tipos de infecciones, siendo las más frecuentes las de vías respiratorias altas. (9,10)

Los microorganismos aislados son esféricos, con diámetro de 0.5 a 1.0 μ . La indole del medio de cultivo ocasiona algunas variaciones en el tamaño; frecuentemente las células aisladas son bastante menores cuando los cultivos crecen en condiciones anaerobias. (8,10,13,14)

La mayor parte de los estreptococos son catalasa negativos, no fermentan la inulina, no reducen los nitratos y son solubles en sales biliares. Si un carbohidrato es fermentado, se producen grandes cantidades de ácido láctico, sin gas. (3,5,13)

Los estreptococos patógenos crecen fácilmente en el laboratorio, pero para buen desarrollo se necesitan medios con sangre o suero y temperatura corporal; son anaerobios facultativos y no forman esporas.

Como grupo, crecen a temperatura relativamente alta, 10° - 42°C, los del grupo piógeno, constituidos por parásitos del hombre, tienen temperatura óptima de 37°C. (8-10)

Se encuentran entre las bacterias más exigentes en cuanto a necesidades nutritivas. La mayor parte de las cepas requieren glutamina, riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina y biotina junto con 13 ó 14 aminoácidos.

Los estreptococos del grupo A también necesitan derivados de ácidos nucleicos. Algunas cepas se han cultivado en medios con hidrolizados de albúmina o caseína, complementados con vitaminas y aminoácidos. (7-9)

Son microorganismos difíciles de aislar, requiriendo de medios enriquecidos como: Infusión Cerebro Corazón, Soya Trypticase, Agar Sangre, etc.; medios de cultivo de uso frecuente en bacteriología, pero de elevado costo.

El pulque es una bebida mexicana producto del fermento del aguamiel que posee: aminoácidos, vitaminas, purinas, carbohidratos y algunas proteínas, que pueden servir de nutrientes para el estreptococo y por lo tanto si elaboramos un medio para el cultivo de los mismos, obtendremos buenos resultados.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico de infecciones producidas por estreptococos beta hemolíticos es difícil y sólo se logra en un 40 - 60 % de los casos, por lo que un cultivo negativo no excluye totalmente la infección estreptocócica.

Por ello, se hace necesario tener un medio de cultivo que aumente la positividad de aislamientos y que además sea de bajo costo.

Debido a la composición química del pulque, pensamos que puede ser utilizado como una base enriquecida para la elaboración de un medio de cultivo para estreptococos.

4.- OBJETIVOS.

- 1.- Formular un medio de cultivo para estreptococos empleando el pulque como base nutritiva.
- 2.- Disminuir el costo para el diagnóstico de infecciones producidas por este microorganismo.
- 3.- Obtener un aumento en el margen de seguridad del diagnóstico de infecciones por estreptococos.
- 4.- Realizar un estudio comparativo de positividad entre el medio de cultivo formulado y los medios usuales.

5.- HIPOTESIS.

Si en su composición química el pulque contiene : vitaminas, sales minerales, aminoácidos, algunas proteínas, carbohidratos, etc., que son buenos nutrientes, y, además es una bebida barata que se puede conseguir en casi toda la República Mexicana, entonces, el estreptococo beta hemolítico encontrará todos los nutrientes necesarios para desarrollarse en este medio de cultivo, además de que será un medio accesible y de bajo costo.

6.- MATERIAL , METODOS Y TECNICAS.

Material :

- Algodón.
- Asa y portavas bacteriológica.
- Caja Petri de vidrio.
- Cubreobjetos.
- Frascos de boca ancha con tapa de rosca de 1 lt.
- Gasa.
- Gradillas para tubo de ensayo.
- Guantes de asbesto.
- Guantes de cirujano.
- Hisopos estériles.
- Marcador de tinta permanente.
- Masking tape.
- Matraz aforado de 10 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 1000 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Mechero Bunsen.
- Papel pH.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Pipetas graduadas de 2 ml.
- Pipetas graduadas de 5 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas serológicas de 0.1 ml.
- Pipetas serológicas de 0.2 ml.
- Frascos goteros de 60 ml.
- Portaobjetos.
- Probeta graduada de 500 ml.
- Tela de alambre con asbesto.
- Termómetro de -10° a 200° C
- Tripie metálico.
- Tubos de ensayo de 13 x 100.
- Vasos de precipitados de 500 ml.
- Vasos de precipitados de 100 ml.
- Vasos de precipitados de 50 ml.

Material biológico :

- Cepa pura de Streptococcus pyogenes beta hemolítico, (Grupo A).
- Cepa pura de Streptococcus beta hemolítico Grupo No A.
- Cepa pura de Streptococcus alfa hemolítico.
- Cepa pura de Staphylococcus aureus beta hemolítico.
- Cepa pura de Escherichia coli.
- Sangre de carnero, res y chivo, estéril y defibrinada.
- 200 muestras de exudado faríngeo, de pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Equipo :

- Agitador mecánico para tubos de ensayo, VORTEX GENE, modelo K-550-G.
- Autoclave.
- Balanza analítica METER modelo H-80.
- Balanza granataria CHAUS, modelo Florham Park.
- Incubadora MAPSA, modelo EC-334.
- Microscopio AMERICAL OPTICAL, modelo One-Ton.
- Refrigerador Mabe, modelo Space Line.

Reactivos :

Alcohol.
Acetona.
Lugol.
Azida de sodio.
Bisulfito de sodio.
Cristal violeta.
Cianuro de potasio.
Lauril sulfato de sodio.
Tiourea.
Acido sulfosalicilico.
Cloruro de bario.
EDTA.
Acido nalidixico.

Colorantes :

- Cristal violeta.
- Safranina.

Medios de cultivo :

- Base de Agar sangre.
- Base de Agar sangre con azida de sodio.
- Agar sal y manitol.
- Agar S-110.

Excipientes :

- Agar bacteriológico.
- Peptona de caseína.
- Pulque.

Solventes :

- Agua destilada.

Método.

La siguiente metodología es la que se llevó a cabo para alcanzar los objetivos planteados, dividiendo el trabajo en 4 etapas, mismas que se describen a continuación :

ETAPA I : Obtención del soporte de crecimiento.
ETAPA II : Selectividad del medio formulado.
ETAPA III : Estabilidad del medio.
ETAPA IV : Ensayo con muestras clínicas.

El medio final es el tamiz de todas las etapas y por consiguiente el mejor que obtuvimos.

En las 2 primeras etapas se trabajó sobre ensayo y error, por lo que los medios descritos no son los únicos que se realizaron, sino los más representativos y de mayor utilidad al proyecto.

ETAPA I : Obtención del soporte de crecimiento.

Se desarrolló la fórmula de una base enriquecida en la cual crecieron *Streptococcus* alfa y beta hemolíticos, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, utilizando : agar bacteriológico, peptona de caseína y pulque, variando las concentraciones de los componentes hasta la obtención de un crecimiento similar al de la base de agar sangre.

A) La preparación de los medios fue:

1.- Pesar cada uno de los componentes de la formulación del medio de cultivo propuesto.

2.- Mezclar con agua ó pulque según el caso.

Si el disolvente es pulque, se neutraliza previamente a un pH= 7.0 a 7.5 con NaOH 2N.

3.- Calentar a ebulición por un minuto para disolver el agar.

4.- Esterilizar en autoclave a 15 lb / in² / 15 minutos.

5.- Verter en cajas de Petri estériles de 20 a 25 ml por caja.

6.- Inocular en cada uno de los medios elaborados las cepas.

7.- Incubar las cajas a 35°C ± 2°C por 24 horas.

8.- En los medios que llevan sangre, ésta se agregó al medio después de esterilizarlo y dejándolo enfriar a aproximadamente 40°C-45°C.

B) Se probó el efecto de que el medio tuviera o no peptona de caseína y también la diferencia entre tener pulque o agua como disolvente

Medio	1	2	3
Agar bacteriológico	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína	1.5%	0	1.5%
Pulque (pH= 7.0-7.5)	0	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Agua destilada	cbp 100 ml	0	0

C) Se adicionó sangre de carnero a diferentes concentraciones.

Medio	4	5	6	7	8
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Pulque	cbp 100 ml				
Sangre	2%	4%	5%	6%	8%

D) Se procedió a variar la concentración de peptona de caseína teniendo constante una concentración de sangre.

Medio	9	10	11	12
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	0%	0.5%	1.0%	1.5%
Pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Sangre	5%	5%	5%	5%

Se llevaron como controles medios preparados de igual manera y con las mismas concentraciones, sólo que sin sangre, para observar el factor hemólisis.

Medio	13	14	15	16
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	0%	0.5%	1.0%	1.5%
Pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Sangre	0%	0%	0%	0%

E) Se probó nuevamente la misma variación en la concentración de peptona de caseína con una concentración establecida de sangre, pero, empleando sobrenadante de pulque como solvente.

El sobrenadante de pulque se obtiene centrifugando el pulque a 5000 rpm por 3 minutos.

Medio	17	18	19	20
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	0%	0.5%	1.0%	1.5%
Sobrenadante de pulque.	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Sangre	5%	5%	5%	5%

También se llevaron controles sin sangre.

Medio	21	22	23	24
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	0%	0.5%	1.0%	1.5%
Sobrenadante de pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Sangre	0%	0%	0%	0%

El mejor medio que se obtuvo en la ETAPA I fue el No. 11.

ETAPA II : Selectividad del medio formulado.

1) A la base formulada No. 11 se le dió selectividad empleando diferentes agentes químicos, presumiblemente inhibidores del crecimiento bacteriano en diferentes concentraciones, buscando uno que inhibiera el crecimiento de agentes contaminantes, como E. coli, pero sin inhibir los estreptococos.

Se llevaron siempre controles de esterilidad y se comparó con los medios usuales (Agar sangre, Agar sangre con azida)

A) Inhibidor empleado: Azida de sodio.

Medio	25	26	27	28	29	30	31	
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	
Pulque			cbp 100 ml en cada medio					
Azida de sodio	0.005%	0.01%	0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.1%	

B) Inhibidor empleado: Bisulfito de sodio.

Medio	32	33	34	35	36	37	38	39
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Pulque	cbp 100 ml en cada medio							
Bisulfito de sodio	0.005%	0.01%	0.02%	0.025%	0.04%	0.06%	0.08%	0.1%

C) Inhibidor empleado: Cristal violeta.

Medio	40	41	42	43
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Cristal violeta	0.01%	0.03%	0.05%	0.1%

D) Inhibidor empleado: Cianuro de potasio.

Medio	44	45	46	47
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Cianuro de potasio	0.005%	0.025%	0.05%	0.075%

E) Inhibidor empleado: E D T A.

Medio	48	49	50	51
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
EDTA	0.05%	0.075%	0.1%	0.12%

F) Inhibidor empleado: Lauril sulfato de sodio.

Medio	52	53	54
Agar	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%
Pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Lauril sulfato de sodio	0.001%	0.003%	0.005%

2) Se realizó una mezcla de inhibidores para ver que efecto tenía en el crecimiento bacteriano.

Inhibidores empleados: Azida de sodio y Lauril sulfato de sodio.

A) Concentración constante de Lauril sulfato de sodio y concentración variable de Azida de sodio.

Medio	55	56
Agar	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%
Pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Azida de sodio	0.08%	0.1%
Lauril sulfato de sodio	0.005%	0.005%

B) Variación en la concentración de ambos inhibidores.

Medio	57	58	59	60
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Azida de sodio	0.04%	0.06%	0.04%	0.06%
Lauril sulfato de sodio	0.001%	0.001%	0.003%	0.003%

3) Posteriormente se procedió a centrifugar el pulque para observar si había alguna diferencia si se empleaba el sobrenadante o el pulque completo.

Para ello, se centrifugó el pulque a 5000 rpm por 3 minutos para obtener la separación del paquete celular, el cual era eliminado.

Se llevó un control con el medio base solo.

A) Inhibidor empleado: Azida de sodio.

Medio	61	62	63	64	65	66
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Sobrenadante de pulque		cbp 100 ml en cada medio				
Azida de sodio	0%	0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.1%

B) Inhibidor empleado: Bisulfito de sodio.

Medio	67	68	69	70	71	72
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Sobrenadante de pulque		cbp 100 ml en cada medio				
Bisulfito de sodio	0%	0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.1%

4) Se agregó sangre a los medios y se probó el Acido Nalidixico como inhibidor en dos maneras diferentes, utilizando el medio base formulado No. 11:

A) Agregando el Acido nalidixico al medio base y después esterilizar.

B) Esterilizando el medio base y después agregar el Acido nalidixico.

A) Se agregan todos los reactivos y después se esteriliza a 15 lb/in² / 15 minutos, se enfría a 40-45°C y se agrega la sangre.

Medio	73	74	75
Agar	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%
Pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Acido nalidixico	5 µg/ml	50 µg/ml	500 µg/ml
Sangre	5%	5%	5%

Se llevaron controles con los medio usuales.

B) Se realiza el medio base, se esteriliza en autoclave a 15 lb/in² / 15 minutos y después se adiciona el Acido nalidixico, se enfría a 40-45°C y se agrega la sangre.

Medio	76	77	78
Agar	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%
Pulque	cbp 100 ml	cbp 100 ml	cbp 100 ml
Acido nalidixico	5 µg/ml	50 µg/ml	500 µg/ml
Sangre	5%	5%	5%

C) Variación en las concentraciones de Acido nalidixico en el rango comprendido entre 5 µg/ml y 50 µg/ml, adicionándolo después de esterilizar el medio base formulado No. 11.

Se llevaron controles con los medios usuales.

Medio	11	76	79	80	81	82	83
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Pulque							
Acido nalidixico (µg/ml)			cbp 100 ml en cada medio				
	0	5	10	20	30	40	50
Sangre	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%

Con todos estos ensayos, se considera como medio final el medio No. 80, el mejor, y queda formulado de la siguiente manera:

Medio	80
Agar bacteriológico	1.5%
Peptona de caseína	1.0%
Acido nalidixico	20 µg/ml
Sangre	5%
Pulque	cbp 100 ml

ETAPA III : Estabilidad del medio.

Se preparó un lote de 30 cajas de medio de cultivo y se mantuvieron en refrigeración en una bolsa de polietileno cerrada.

Se inocularon las mismas cepas a diferentes períodos de tiempo durante un mes.

Esta prueba es con el fin de determinar el deterioro del medio de cultivo formulado por el almacenaje a través del tiempo.

ETAPA IV : Estudio comparativo del medio y ensayo con muestras clínicas.

Se realizó un estudio comparativo del medio formulado con respecto a los medios usuales (Agar sangre, Agar sangre con azida y además el medio base formulado sin inhibidor) sembrándose 200 muestras de Exudado Faríngeo, observando las características morfológicas y fisiológicas de las bacterias aisladas, así como su concentración relativa en la muestra, en cada medio y sacando el porcentaje de aislamiento.

Técnica.

1) Toma de muestra.

Se obtienen muestras de exudado faríngeo de personas asintomáticas y sintomáticas en condiciones asepticas, frotando fuertemente las amígdalas y la zona posterior de las mismas con un hisopo estéril, cuidando de no tocar la lengua ni mojar el hisopo con saliva, utilizando abatelenguas para fijar la lengua y descubrir adecuadamente las amígdalas.

2) Siembra y cultivo.

Sembrar en las placas: Medio formulado No. 80. Agar sangre con 20 µg/ml de Acido nalidixico, Agar sangre, Agar sangre con azida y Agar sal y manitol, depositando un inóculo con el hisopo y realizar estrías en tres cuadrantes con un asa bacteriológica. Incubar a 37°C por 24 horas.

Si no se puede sembrar directamente en la placa, poner el hisopo en 2 ml de caldo enriquecido (E+ ó tioglicolato), incubar de 2 a 4 horas a 37°C y después eliminar el exceso de caldo " exprimiendo " el hisopo en el tubo y sembrar en las cajas.

3) Diferenciación e identificación.

Observar colonias circulares pequeñas, lisas, convexas y redondeadas de una zona beta hemolítica.

Teñir por el método de Gram y observar al microscopio cocos grampositivos, agrupados en cadenas, en pares ó solos.

Realizar la prueba de la catalasa, factor CAMP, y sensibilidad a la bacitracina.

7.- RESULTADOS.

Los resultados son mostrados en forma de tablas y de acuerdo con la metodología descrita, es decir, en orden cronológico.

Para la evaluación de los cultivos se utilizó la siguiente notación:

- = Negativo.
- /+ = Muy escaso crecimiento.
- +/- = Escaso crecimiento.
- + = Poco crecimiento.
- ++ = Moderado crecimiento.
- +++ = Excelente crecimiento.

Se utilizaron las siguientes cepas:

<u>Streptococcus</u> β hemolítico Grupo A	= E/HGA
<u>Streptococcus</u> β hemolítico Grupo No A	= E/HGNA
<u>Streptococcus</u> α hemolítico	= E α H
<u>Staphylococcus aureus</u> β hemolítico	= <u>S.aureus</u>
<u>Escherichia coli</u>	= <u>E.coli</u>

ETAPA I : Obtención del soporte de crecimiento.

B) Efecto de la presencia de la peptona de caseína en el medio y diferencia entre pulque y agua como disolvente.

Cepa	AS	1	Medio	2	3
E/HGA	+++	+++		-/+	+++
E/HGNA	+++	+++		+	+++
E α H	+++	+		-/+	+++
<u>S.aureus</u>	+++	+++		+++	+++

C) Adición de sangre de carnero a diferentes concentraciones.

Cepa	4	5	Medio	6	7	8
E/HGA	++	++		+++	+++	+++
E/HGNA	++	++		+++	+++	+++
E α H	++	++		+++	+++	+++
<u>S.aureus</u>	++	++		+++	+++	+++

D) Variación en la concentración de peptona de caseína teniendo constante una concentración de sangre.

Cepa	AS	ASA	9	Medio	10	11	12
<u>E.HGA</u>	+++	++	+		+++	+++	++
<u>S.aureus</u>	+++	+++	+		+++	+++	+++
<u>E.coli</u>	+++	.	..		+++	+++	+++

Se llevaron controles sin sangre

Cepa	13	14	Medio	15	16
<u>E.HGA</u>	-/+	++		++	++
<u>S.aureus</u>	+	+++		+++	+++
<u>E.coli</u>	++	+++		+++	+++

E) Se probó la misma variación en la concentración de peptona, pero empleando sobrosante de pulque como disolvente.

Cepa	17	18	Medio	19	20
<u>E.HGA</u>	.	++		+++	+++
<u>S.aureus</u>	.	+++		+++	+++
<u>E.coli</u>	..	+++		+++	+++

Se llevaron controles sin sangre.

Cepa	21	22	Medio	23	24
<u>E.HGA</u>	-	.		++	+++
<u>S.aureus</u>	-/+	++		+++	+++
<u>E.coli</u>	.	+++		+++	+++

ETAPA II : Selectividad del medio formulado.

1) - A) Variación en la concentración del inhibidor - Azida de sodio.

Cepa	25	26	27	Medio	28	29	30	31
<u>E.HGA</u>	+++	+++	+++		+++	+++	++	-
<u>E.HGNA</u>	+++	+++	+++		+++	++	+++	+
<u>E.HI</u>	+++	+++	+++		+++	+++	++	++
<u>S.aureus</u>	+++	+++	+++		+++	+++	++	++
<u>E.coli</u>	+++		+	.	.	+

1) - B) Variación en la concentración del inhibidor - Bisulfito de sodio.

Copa	32	33	34	35	Medio	36	37	38	39
<u>E.coli</u>	++	++	-	-	-	-	-	-	-
<u>E.coli</u>	++	++	-	-	-	-	-	-	-
<u>E.coli</u>	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+
<u>S.aureus</u>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
<u>E.coli</u>	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++

1) - C) Variación en la concentración del inhibidor - Cristal violeta.

Copa	40	41	Medio	42	43
<u>E.coli</u>	-	+	+	+	+
<u>E.coli</u>	-	+	+	+	+
<u>E.coli</u>	++	+	+	+	+
<u>S.aureus</u>	-	+	+	+	+
<u>E.coli</u>	+++	+++	++	++	++

1) - D) Variación en la concentración del inhibidor - Cianuro de potasio.

Copa	44	45	Medio	46	47
<u>E.coli</u>	+++	+++	++	++	++
<u>E.coli</u>	+++	+++	++	++	++
<u>E.coli</u>	+++	++	+	+	+
<u>S.aureus</u>	+++	+++	+	+	+
<u>E.coli</u>	+++	++	+	+	-

1) - E) Variación en la concentración del inhibidor - E D T A.

Copa	48	49	Medio	50	51
<u>E.coli</u>	+++	+++	+++	+++	+++
<u>S.aureus</u>	+++	+++	+++	+++	+++
<u>E.coli</u>	+++	+++	+++	+++	+++

1) - F) Variación en la concentración del inhibidor - Lauril sulfato de sodio.

Cepa	52	Medio	54
E/HGA	+++	+++	+++
E/HGNA	+++	+++	+++
EaH	+++	+++	+++
S.aureus	+++	+++	+++
E.coli	+++	+++	++

2) - A) Mezcla de inhibidores.
Concentración constante de Lauril sulfato de sodio y concentración variable de Azida de sodio.

Cepa	55	Medio	56
E/HGA	+		+
E/HGNA	+		+
EaH	+		+
S.aureus	+		+
E.coli	+		+

2) - B) Variación en la concentración de ambos inhibidores.

Cepa	57	58	Medio	59	60
E/HGA	++	++		++	++
E/HGNA	++	+		+	+
EaH	+	++		+	+
S.aureus	++	++		++	++
E.coli	+	+		+	+

3) - A) Fragmentación del pulque por centrifugación y empleo del sobrenadante de pulque.

Variación en la concentración del inhibidor - Azida de sodio.

Cepa	61	62	Medio	63	64	65	66
E/HGA	+++	+++		+++	+++	+++	+++
E/HGNA	+++	+++		+++	++	-	-
EaH	+++	+++		+++	+++	+++	+++
S.aureus	+++	+++		++	++	++	++
E.coli	+++	+/-		-	-	-	-

3) - B) Variación en la concentración del inhibidor - Bisulfito de sodio.

Cepa	Medio					
E/HGA	67	68	69	70	71	72
E/HGNA	+++	+++	++	-	-	-
E/H	+++	++	-	-	-	-
<u>S.aureus</u>	+++	++	++	++	-	-
<u>E.coli</u>	+++	+++	++	++	++	+

4) - A) Empleo de Acido nalidixico como inhibidor.
Se agregan todos los reactivos y después se esteriliza en autoclave a 15 lb/in² /15 minutos, se enfría a 40-45°C y se agrega la sangre.

Cepa	Medio				
	AS	ASA	73	74	75
E/HGA	+++	++	+++	+++	+
<u>S.aureus</u>	+++	+	++	++	+
<u>E.coli</u>	+++	-	++	-	-

4) - B) Se realiza el medio base, se esteriliza en autoclave a 15 lb/in² /15 minutos y después se adiciona el Acido nalidixico, se enfría a 40-45°C y se agrega la sangre.

Cepa	Medio		
	76	77	78
E/HGA	+++	+++	-
<u>S.aureus</u>	+++	++	-
<u>E.coli</u>	++	-	-

4) - C) Variación en las concentraciones de Acido nalidixico en el rango comprendido entre 5µg/ml y 50µg/ml, adicionándolo después de esterilizar el medio base formulado No. 11.

Cepa	Medio								
	AS	ASA	11	76	79	80	81	82	83
E/HGA	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<u>S.aureus</u>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<u>E.coli</u>	+++	++	+++	++	++	-	-	-	-

ETAPA IV : Ensayo con muestras clínicas.

Se ensayaron : el Medio formulado No. 80 y los medios usuales (Agar sangre y Agar sangre con azida) con 200 muestras de Exudado Faríngeo y se sacó el porcentaje de aislamiento, el cual se indica a continuación.

Cepa aislada	% de aislamiento
Estreptococos β - hemolíticos	12.5
<u>Staphylococcus aureus</u> coag (+)	28.5
Estreptococos β - hemolíticos +	
<u>Staphylococcus aureus</u> coag (+)	6.5
Negativos	52.5
Total	100.0

8.- DISCUSION DE RESULTADOS.

Los estreptococos son microorganismos de difícil crecimiento en medios artificiales no enriquecidos, por ello necesitan de una buena fuente de proteínas, carbohidratos, vitaminas, etc.

Por otro lado, el pulque es una bebida cuyo análisis bromatológico indica que es rico en carbohidratos, minerales, electrolitos y vitaminas, principalmente; por lo que sólo necesita de proteínas para convertirse en un buen medio de cultivo para estreptococos.

En la primera etapa de este trabajo se procedió a buscar un soporte de crecimiento para dichos microorganismos. Se observó que la peptona de caseína era un ingrediente primordial para el crecimiento, ya que en el medio No.2, al no tener peptona hay una baja muy considerable en el crecimiento, por lo que se eligió el medio con peptona.

Como para la identificación presuntiva de los estreptococos es necesaria la observación de la hemólisis se vio la necesidad de agregar al medio sangre de carnero a diferentes concentraciones, observándose buenos resultados con 5%, 5% y 8%, pero por cuestión de costos se eligió el medio No.6 que contiene 5% de sangre.

Posteriormente se pensó en variar la concentración de peptona observándose buenos resultados en los medios No.10, No.11 y No.12, eligiéndose el término medio, o sea, el medio No.11 para que no tuviera pocos nutrientes como en el medio No.10 y no fuera muy costoso como en el medio No.12.

Se observa que sin peptona (medio No.9) hay muy poco crecimiento, corroborándose lo encontrado con el medio No.2.

De aquí se tomó el medio No.11 como medio base y con él se prosiguió en las demás etapas.

Se llevaron controles sin sangre para comprobar que tan importante es la hemólisis en la identificación de los estreptococos.

En esta etapa se formuló la pregunta de que si daría el mismo resultado en cuanto a crecimiento si se utilizaba sobrenadante de pulque, por lo que se probó éste para observar si había una deficiencia de nutrientes al separar el paquete de células del pulque y ver si había disminución en el crecimiento, pero no fué así, se observaron resultados similares y no se vió el caso de utilizar el sobrenadante de pulque como disolvente por lo que se siguió trabajando con pulque completo.

También se llevaron controles sin sangre con el sobrenadante de pulque para ver la importancia de la hemólisis con otro disolvente.

En la segunda etapa del proyecto se probaron diferentes agentes químicos como posibles inhibidores del crecimiento bacteriano.

Con azida de sodio se observa que hay disminución en el crecimiento de *E. coli*, pero no hay inhibición completa y además al aumentar la concentración del inhibidor también se inhibe el crecimiento de los estreptococos.

Al probar bisulfito de sodio no se observó inhibición en el crecimiento de *E. coli* y sí se disminuye el crecimiento de los estreptococos al tener mayor concentración del inhibidor.

Cuando se utilizó cristal violeta se inhibieron casi por completo los estreptococos en todas las concentraciones del inhibidor y casi no se inhibió la *E. coli*.

La concentración de cianuro de potasio, inhibe el crecimiento de *E. coli* y también el de estreptococos.

Por el contrario, no se observa ninguna inhibición en el crecimiento de *E. coli* y de los estreptococos con EDTA.

También con el inhibidor lauril sulfato de sodio no se inhibieron las cepas empleadas en ninguna concentración.

En esta misma etapa se realizó una mezcla de inhibidores, los cuales por separado no dieron buenos resultados y esperando que al juntarlos el efecto fuera mejor. Se utilizó una mezcla teniendo constante la concentración de lauril sulfato de sodio y variable la concentración de azida de sodio y se observó que se inhibieron todas las cepas en ambas concentraciones, algo que no se deseaba. Posteriormente, se variaron las concentraciones de ambos inhibidores y el resultado fue inhibición también en todas las cepas, aunque en menor escala.

En otro inciso de esta etapa se fragmentó el pulque por centrifugación para emplear al sobrenadante de pulque como disolvente, pero como ya se había probado de esta manera se le añadieron agentes químicos como inhibidores. Al utilizar azida de sodio se inhibe el crecimiento de E. coli al aumentar la concentración del inhibidor, pero también se inhibe un poco el crecimiento de los estreptococos. En cuanto al empleo del sobrenadante de pulque, no se observa una diferencia significativa entre éste y el pulque completo, por lo que se prefiere utilizar pulque completo.

Se llevó un control con el medio base No. 11, o sea, sin inhibidor para tener una base en la diferenciación de la inhibición del crecimiento.

Con bisulfito de sodio hay muy poca inhibición de E. coli, sin embargo, los estreptococos se inhiben por completo al aumentar la concentración.

En el último inciso de esta etapa se pensó emplear Acido nalidixico como inhibidor, y se probó de dos maneras:

A) Se agregaron todos los reactivos, se esterilizó y se le agregó la sangre después de enfriar. En esta prueba se esterilizó el ácido nalidixico junto con el medio base formulado y se observó que no hay una total inhibición de E. coli y sí una inhibición parcial del estreptococo, por lo que se pensó probar de otra manera.

Se llevaron controles con los medios usuales (Agar sangre y Agar sangre con azida), los cuales se utilizan en la identificación y aislamiento de estreptococos generalmente, para tener una mejor comparación de los medios comerciales con el medio formulado.

B) Se realizó el medio base formulado No. 11, se esterilizó y después se le adicionó el ácido nalidixico, se enfrió y agregó la sangre. Aquí se observan mejores resultados al agregar el ácido nalidixico después de esterilizar el medio base formulado, ya que se observa una inhibición completa de E. coli y no hay inhibición de los estreptococos, lo cual era lo que se buscaba.

Ya se tenía el resultado esperado, sólo que había un rango muy grande entre las concentraciones en las que se dio la inhibición completa de E. coli y la no inhibición de los estreptococos, por lo que se realizó una variación en las concentraciones de ácido nalidixico en el rango comprendido entre 5µg/ml y 50µg/ml, adicionando éste después de esterilizar.

Lo que se observó fue una inhibición completa de E. coli a partir del medio No. 80 en adelante y no hay inhibición de los estreptococos, por cuestión de costos, se elige el medio No. 80 como el mejor y se le considera como el Medio formulado para el aislamiento de Estreptococos beta hemolíticos de este trabajo.

En la tercera etapa del trabajo se probó la estabilidad del medio No. 80 en cuanto al almacenaje y al deterioro sufrido a través del tiempo y los resultados fueron que no hubo cambios en el medio.

En la cuarta etapa se ensayó con muestras clínicas el medio obtenido y se comparó con los medios usuales para el aislamiento de Estreptococos beta hemolíticos, como son el Agar sangre y el Agar sangre con azida.

Se sacaron los porcentajes de aislamiento, en los cuales se observa que el S. aureus es el que predominó en la afección de vías respiratorias altas al encontrarse en un porcentaje del 28.5%, el que siguió en porcentaje de aislamiento fué el Estreptococo beta hemolítico con un 12.5%

Este aislamiento se encontró tanto en el Medio formulado No.80 como en el Agar sangre, ya que se observaron ambas cajas y en las dos se encontraron el mismo resultado.

Se encontró también una combinación entre el Estreptococo beta hemolítico y el S. aureus ya que ambos aparecían como los causantes de la afección aunque el porcentaje de aislamiento fué en menor escala, un 6.5%.

Los casos negativos fueron de un 52.5%.

9.- CONCLUSIONES.

El medio de cultivo formulado a base de pulque es lo suficientemente rico en nutrientes para que crezcan microorganismos exigentes, como es el caso del *Estreptococo beta hemolítico*.

Es necesario adicionarle sangre al 5%, ya sea de carnero ó de res (ver anexo A) para poder visualizar la presencia de la hemólisis, parámetro muy importante para la identificación de los diferentes estreptococos.

Los aislamientos obtenidos de exudados faríngeos en el medio formulado a base de pulque son comparables con los obtenidos en los medios tradicionales, Agar sangre y Agar sangre con azida; además de que es un medio de más bajo costo (anexo B), pues las materias primas que se emplean son económicas.

Presenta el inconveniente de que las hemólisis se observan turbias, debido a que el medio de por sí es turbio por el contenido de células del pulque.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

10.- ANEXOS.

Anexo A

ELECCION DEL TIPO DE SANGRE.

Utilización de sangre desfibrinada de RES, CHIVO y CARNERO en los medios : No.11, base de Agar sangre y base de Agar sangre con azida al 3%, 5%, 8% y 10%.

La finalidad es observar :

- a) hemólisis
- b) crecimiento

Se probaron las cepas :

- Estreptococos
- Estafilococos
- E.coli

Los resultados fueron :

	Medio No.11 sin sangre (control).		
Estafilococo	Estreptococo		<u>E.coli</u>
+++	+++		+++
	Medio No.11 con sangre de RES.		
% de sangre	Estafilococo	Estreptococo	<u>E.coli</u>
3	++	++	++
5	+++	+++	+++
8	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++
	Medio No.11 con sangre de CHIVO.		
% de sangre	Estafilococo	Estreptococo	<u>E.coli</u>
3	++	++	++
5	++	++	++
8	++	++	++
10	++	++	++
	Medio No.11 con sangre de CARNERO.		
% de sangre	Estafilococo	Estreptococo	<u>E.coli</u>
3	++	++	++
5	+++	+++	+++
8	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++

Estafilococo	Base de Agar sangre (control)		
***	Estreptococo		<u>E.coli</u>
	***		***

	Base de Agar sangre con sangre de RES.		
% de sangre	Estafilococo	Estreptococo	<u>E.coli</u>
3	**	**	**
5	***	***	***
8	***	***	***
10	***	***	***

	Base de Agar sangre con sangre de CHIVO.		
% de sangre	Estafilococo	Estreptococo	<u>E.coli</u>
3	**	**	**
5	**	**	**
8	**	**	**
10	**	**	**

	Base de Agar sangre con sangre de CARNERO.		
% de sangre	Estafilococo	Estreptococo	<u>E.coli</u>
3	**	**	**
5	***	***	***
8	***	***	***
10	***	***	***

Estafilococo	Base de Agar sangre con azida (control).		
***	Estreptococo		<u>E.coli</u>
	***		-

	Base de Agar sangre con azida con sangre de RES.		
% de sangre	Estafilococo	Estreptococo	<u>E.coli</u>
3	**	**	-
5	***	***	-
8	***	***	-
10	***	***	-

	Base de Agar sangre con azida con sangre de CHIVO.		
% de sangre	Estafilococo	Estreptococo	<u>E.coli</u>
3	**	**	-
5	**	**	-
8	**	**	-
10	**	**	-

% de sangre	Base de Agar sangre con azida con sangre de CARNERO.		
	Estafilococo	Estreptococo	<u>E.coli</u>
3	++	++	-
5	+++	+++	-
8	+++	+++	-
10	+++	+++	-

Se observa que la sangre de CHIVO no es tan adecuada, pues se obtiene moderado crecimiento en todos los medios. Con la sangre de RES y de CARNERO se observan los mismos resultados, sin embargo, se puede obtener mayor cantidad de la sangre de RES, por lo que se preferiría ésta. En cuanto al %, con 3% se obtiene bajo rendimiento y del 5% en adelante se observa un buen crecimiento pero aumentaría el costo del medio por lo que se prefiere el 5%.

Anexo B
ANALISIS DE COSTOS.

Medios BIOXON
Costo de los componentes por frasco.

- Base de Agar sangre frasco de 450 g	\$ 146,000.00
- Base de Agar sangre con azida frasco de 450 g	\$ 121,000.00
- Agar bacteriológico frasco de 450 g	\$ 155,000.00
- Peptona de caseína frasco de 450 g	\$ 65,000.00

La formulación es en 100 ml, por lo que se necesitan los precios por cada 100 ml.

- Base de Agar sangre 4g/100 ml	\$ 1,297.00
- Base de Agar sangre con azida 3.3g/100 ml	\$ 887.00
- Agar bacteriológico 1.5g/100 ml	\$ 516.00
- Peptona de caseína 1.0g/100 ml	\$ 144.00

Se utilizó Acido nalidixico en forma de tabletas Wyntomylon.

- Caja con 30 tabletas de 500 mg c/u	\$ 9,500.00
- Costo de una tableta de 500 mg	\$ 316.66
Necesitamos μg por lo que,	
500 mg = 500,000 μg	\$ 316.66

La formulación requiere 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, o sea, 2,000 $\mu\text{g}/100$ ml, entonces tenemos :

500,000 $\mu\text{g}/100$ ml	\$ 316.66
2,000 $\mu\text{g}/100$ ml	\$ 126

Por otro lado, la formulación del medio necesita pulque como disolvente :

- 100 ml de pulque \$ 50.00

Por lo tanto, el medio formulado No.80 que fué el medio final queda de la siguiente manera :

Medio No.80	
Agar bacteriológico	\$ 516.00
Peptona de caseína	\$ 144.00
Acido nalidixico	\$ 1.26
Pulque	\$ 50.00
	<hr/>
	\$ 711.26

- Medio formulado No.80
100 ml \$ 711.26

Basándose en el salario mínimo, el cual es de \$ 8,640.00 diarios :

- Salario mínimo	\$ 8,640.00	100.00 %
- Base de Agar sangre	\$ 1,297.00	15.01 %
- Base de Agar sangre con azida	\$ 887.00	10.26 %
- Medio formulado No.80	\$ 711.26	8.23 %

Como se puede observar, el medio formulado en éste proyecto es de más bajo costo que los medios usuales para el aislamiento de *Streptococcus beta hemolíticos*.

11.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Burdon, R.H.; Introducción a la Microbiología; 1a Edición; Editorial Omega; Barcelona, España; 1978; pp 82-103.
- 2.- Villarreal, L.J.; Delgado, B.M.; Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología General I; Escuela Nacional de Estudios Profesionales "Zaragoza"; pp 11-15.
- 3.- Lynch, M.J.; Métodos de laboratorio; 2a Edición; Editorial Interamericana; México, D.F.; 1972; pp 913-920, 933-935.
- 4.- Davidsohn, I.; Bernard, H.J.; Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio; Todd-Sanford; Tomos I y II; 7a Edición; Salvat Editores, S.A.; Barcelona, España; 1985; pp 985-991.
- 5.- Delast, A.N.; Microbiología; 1a Edición; Editorial Interamericana; México, D.F.; 1976; pp 74-77.
- 6.- Cantú, L.N.; Pérez, R.; Manual de prácticas de Biología Médica; Escuela Nacional de Estudios Profesionales "Zaragoza".
- 7.- Fuerst R.; Microbiología de Frobisher y Fuerst; 14a Edición; Nueva Editorial Interamericana; México, D.F.; 1984; pp 361-364.
- 8.- Carpenter, P.; Microbiología; 4a Edición; Nueva Editorial Interamericana; México, D.F.; 1982; pp 134,399.
- 9.- Burrows, W.; Tratado de Microbiología; 20a Edición; Nueva Editorial Interamericana; México, D.F.; 1974; pp 371-380.
- 10.- Jawetz, E.; Manual de Microbiología Médica; 4a Edición; El Manual Moderno, S.A.; México, D F ; 1970; pp 190-197.
- 11.- Reyes, P.A.; Estreptococo ; su importancia en medicina clínica; Mundo Médico; 1985; Feb; Vol.XII, Núm.130, pp 21-27.
- 12.- Instituto Mexicano del Seguro Social; El Estreptococo; Unidad de Medicina Familiar No.11.
- 13.- Finegold, S.; Martin, W.J.; Diagnóstico Microbiológico; Bailey-Scott; 6a Edición; Editorial Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina; 1983; pp 125-133.

- 14.- U.S. Department of Health, Education, and Welfare; Manual de procedimientos, aislamiento e identificación de Estreptococos; Public Health Service.
- 15.- Antonio Hernández, J.P.; Estudio de la sensibilidad de Streptococcus pyogenes a antibióticos en habitantes de Cd. Nezahualcovotti; Tesis; ENEP. "Zaragoza"; 1985; México, D.F.
- 16.- Manual BOXON; Medios de cultivo; pp 40-43.
- 17.- Gerber, M.A.; Latex agglutination test for rapid identification of group A streptococci directly from throat swabs.; The Journal of Pediatrics. 1984. Nov. 105(5) : 702-705.
- 18.- Pien, F.D.; Evaluation of anaerobic incubation for recovery of group A streptococci from throat cultures; J. Clin. Microbiol 1979. Sep; 10(3) : 392-3.
- 19.- Waitkins, S.A.; A shortened scheme for the identification of indiffrerent streptococci; J> Clin Pathol. 1980. Jan. 33(1) : 47-52.
- 20.- Schwartz, R.H.; Throat cultures in the office; Am Fam Physician. 1980. Jun; 21(6) : 72-8.
- 21.- Libertin, C.R.; Effects of trimethoprim-sulfamethoxazole and incubation atmosphere on isolation of group A streptococci; J. Clin. Microbiol. 1983. Sep. 18(3) : 680-2.
- 22.- Petts, D.N.; Colistin-oxolinic. Acid-blood agar : a new selective medium for streptococci; J. Clin. Microbiol. 1984. Jan; 19(1) : 4-7.
- 23.- Grahn, E.; Interference of alpha-hemolytic streptococci isolated from tonsillar surface on beta-hemolytic streptococci. Streptococcus pyogenes - a methodological study; Zentralb Bakteriol Mikrobiol. 1983. Jul; 254(4) : 459-68.
- 24.- Colman, G.; Identification of streptococci in a medical laboratory Appl Bacteriol. 1984. Aug; 57(1) : 1-14.
- 25.- McCusker, J.J.; Comparison of Directigen group A strep test with a traditional culture technique for detection of group a beta-hemolytic streptococci. J. Clin Microbiol. 1984. Oct; 20(4) : 824-5.
- 26.- Carlson, J.R.; Improved recovery of group A beta-hemolytic strep-

- 27- Schwartz, R.H.; Effect of atmosphere of incubation on the isolation of group A streptococci from throat cultures; J. Lab. Clin. Med. 1985. Jul; 106(1) : 88-92.
- 28- Lauer, B.A.; Effect of atmosphere and duration of incubation on primary isolation of group A streptococci from throat cultures; J. Clin. Microbiol. 1983. Feb; 17(2) : 338-40.
- 29- Ramirez, C.A.; Group A beta-hemolytic streptococcus endocarditis. American Heart Journal. 1984. Nov; 108(5) :1383-86.
- 30- Ginsburg, C.M.; Seroepidemiology of the group A streptococcal carriage state in a private pediatric practice; A.J.D.C. 1985. Jun; 139 : 614-7.
- 31- Ruiz Palma, M.S.; Pruebas para la identificación de estreptococos. Infectología. 1986. Sep; Año 6, Núm 9; 373-83.
- 32- Bluestone, R.; Diagnóstico de las enfermedades reumáticas; Medicina de postgrado. 1981. Feb; 9(2) : 28-39.
- 33- Noguera, E.; Tratado de medicina práctica; Reumatología. Medicine. 1985. Dic; 12.
- 34- Platt, A.; Faringitis bacteriana en adultos; Infectología. 1985. Dic; Año 5, Núm 12 : 332-7.
- 35- Ruiz Palma, M.A.; Dx de laboratorio de estreptococos. Infectología. 1987. Enero; Año 7, Núm 1 : 11-15.
- 36- Giono Cerezo, S.; Infección perinatal causada por Streptococcus del grupo B; Infectología. 1986. Ago; Año 6, Núm 8 : 321-8.
- 37- Compendio de las enfermedades reumáticas; 8a Edición; The Arthritis Foundation, Atlanta, G.
- 38- Ruiz Palma M.S.; Patogenia de enfermedades por estreptococos G y G. Infectología. 1987. Mar; Año 7, Núm 3 : 109-20.
- 39- Dorney, E.; Cuando todos los signos señalan endocarditis; Atención Médica. 1982. Mar; 26-45.
- 40- Eastman; Tratamiento actual de la amigdalitis y faringitis; Atención Médica. 1982. Mar; 46-62.

- 41.- Bellinghausen, H.; Prevención y tratamiento de la fiebre reumática
Mundo Médico. 1978. Jul; Vol V Núm 56 : 11-14.
- 42.- Gemmell, C.; Potencialización de la opsonización y fagocitosis de Streptococcus pyogenes; Infectología. 1983. Jul. Año III, Núm 7 : 333-340.
- 43.- Frazier, W.C.; Microbiología de los alimentos; 2ª Edición; Editorial Acribia; Zaragoza, España; pp 58.
- 44.- Alexopoulos, C.J.; Introducción a la micología; 3ª Edición; Manual de Eudeba; New York; 1979.
- 45.- Baguet, F.; Aspectos científicos actuales del pulque en México; Tesis; Inst. de Biología; 1967; pp 20-32.
- 46.- Hernández, M.; Valor nutritivo de los alimentos mexicanos; Publicaciones de la división de nutrición mexicana; 1977.
- 47.- Marton, G.; Balace del nitrógeno en la elaboración del pulque; Tesis; Inst. de Biología; 1976.
- 48.- Massiev, S.; Determination of some essential aminoacids in several uncooked mexican foodstuffs; J. Nutrition; 28; 283-94.
- 49.- Monroy, M.; Valor nutritivo del xastle; IPN.; pp 203-214.
- 50.- Rojo García, L.; Formulación de un medio de cultivo para bacterias anaerobias a base de pulque; Tesis; ENEP. "Zaragoza"; México, D.F.; 1987; pp 18-27.
- 51.- Mustelior, T.; Elección de pruebas diagnósticas para estreptococo grupo A; Infectología. 1988. Jul. Año 8, Núm 7 : 361-5.