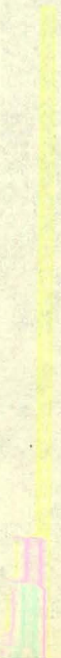


ACNE
\$5.00--



UNIVERSIDAD DE MONTERREY
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



ESTUDIO Y COMPARACION DE DOS TECNICAS
BETA-HEMOLITICOS DEL GRUPO A,
PARA EL AISLAMIENTO DE ESTREPTOCOCOS .

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION FINAL
QUE PRESENTA
GUADALUPE RUBALCAVA AGUILAR

EN OPCION AL TITULO DE
LICENCIADO EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD
EN ANALISIS CLINICOS

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1976

B. G. de Amador

040.54
R894 e
1976

800256

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTREAL

A MIS QUERIDOS PADRES

José Rubalcava López

Esther A. de Rubalcava

De quienes recibí apoyo

y confianza para lograr

terminar mis estudios

A mis Hermanos

A Rosa Ma. García R.

A mi Asesor

Q.F.B. Blanca Silvia Garza de A.

I N D I C E

	Página
Introducción	1
Material y Métodos	15
Resultados	18
Discusión y Conclusiones	20
Resumen	25
Bibliografía	26

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

Los estreptococos comprenden un grupo relativamente abundante de cocos piógenos que se caracterizan por disponerse en cadena. Producen muchas enfermedades en el hombre y en algunos animales inferiores; otros son saprófitos de la leche y productos lácteos.

Inicialmente se observaron en el pus formado en procesos inflamatorios supurativos y su frecuencia y significación patológica fueron subrayados primero por Ogston, Fehleisen y Rosenbach, - al iniciarse la década de 1880. Actualmente se sabe con certeza que, además de las formas patógenas más virulentas, hay con más o menos constancia estreptococos parásitos relativamente inocuos en la faringe y tubo intestinal del hombre, que sólo en circunstancias de disminución importante de la resistencia normal adquieren papel patógeno, y que -

en la práctica deben considerarse como parte de la flora normal del organismo del hombre.(6)

MORFOLOGIA Y TINCIÓN.- Estos organismos son pequeños cuerpos ovoides de un diámetro generalmente menor de 1 micra. Con frecuencia las cadenas están formadas por pares de cocos íntimamente unidos, separados por un espacio considerable de pares adyacentes de manera que parezcan como una serie ininterrumpida de diplococos. Los cocos se dividen en un plano perpendicular al eje mayor de la cadena.
(5)

En condiciones ordinarias de observación, los estreptococos no son móviles, pero esporádicamente se han descrito formas móviles.(6) La mayor parte de las cepas son encapsuladas, y en algunas el material de la cápsula es ácido hialurónico, -- substrato de la hialuronidasa, no formas esporas.

La tinción es fácil mediante los colorantes bacterianos comunes. Casi todas las cepas aisladas de procesos patológicos en el hombre son -- gram-positivas, pero hay estreptococos gram-negativos, más frecuentes en procesos supurativos de animales inferiores que en el hombra.(6) (2)

CARACTERISTICAS DE CULTIVO.- Los estreptococos crecen en la mayoría de los medios usados para el aislamiento primario de organismos gram-positivos. Estos medios son el caldo de tioglicolato o caldo de soya tripticasa y agar sangre.(3)

El agar sangre conteniendo 5-10% de sangre de cordero desfibrinada es el medio sólido selectivo para el aislamiento primario y clasificación de los estreptococos. El medio es incubado a 35°C. bajo tensión de CO₂ al 5-10%. El agar sangre preparado con sangre de cordero se prefiere debido a que la sangre humana puede contener antiestrepto

lisinas.

En el medio sólido las colonias son pequeñas, de 1-2 mm. de diámetro, grisáceas y opalescentes, con bordes lisos o muy ligeramente rugosos y sobre la superficie del medio tienen el aspecto de pequeñas gotitas de líquido.(9) (3) (7)

CLASIFICACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS.- Varias clasificaciones de los estreptococos han sido usadas -- los últimos años.

Según el manual de Bergey los incluyó en la Familia Lactobacillacea, tribu Streptococceae, género Streptococcus.(1) Además los dividió en grupo pyogeno, grupo viridans, grupo enterococo y el grupo láctico.(2) (8)

La clasificación de Brown basada en su comportamiento en agar sangre considera tres tipos:
a) El tipo alfa, que produce una coloración verdosa y hemólisis parcial de los glóbulos rojos --

que rodean a la colonia.

- b) El tipo beta, que produce una zona clara de hemólisis alrededor de la colonia, en la que no hay corpúsculos intactos.
- c) El tipo gamma, que no ejerce acción alguna sobre los glóbulos rojos del medio. (6) (5) (9) -- (10)

Según la clasificación de Lancefield basada en las características antigénicas, toman en consideración la proteína M y el carbohidrato C.

La mayoría de los estreptococos con excepción del grupo viridans contienen en sus paredes celulares un antígeno específico, el carbohidrato C. Los grupos específicos de Lancefield se designan con letra mayúscula desde A hasta O. (5)

La proteína M se encuentra únicamente en la superficie de la pared celular de los estreptococos del grupo A de Lancefield.

TOXINAS Y METABOLITOS IMPORTANTES. - Los estreptoco

cos hemolíticos del grupo A producen varias toxinas y enzimas, algunas de las cuales refuerzan su poder patógeno.

Estreptolisinas. Todd diferenció dos clases de hemolisinas filtrables producidas por estreptococos. Ambas hemolisinas son extremadamente lábiles a --- 37°C. y desaparecen rápidamente después de las primeras horas de incubación.

La estreptolisina O parece ser mucho más importante para la virulencia de los estreptococos hemolíticos.

La estreptolisina S es la causa de las zonas de hemólisis que circundan las colonias de estreptococos beta-hemolíticos en placas de agar - sangre. (5)

Después de una infección aparecen en la sangre anticuerpos contra la estreptolisina O. En ocasiones se pone a prueba éste anticuerpo para determinar el índice de infección estreptocócica reciente.

Estreptodornasa.- Se vende comercialmente para licuar los exudados purulentos espesos debido a su capacidad para desdoblar la desoxirribonucleoproteína y DNA.

Estreptocinasa.- Es un activador plasmático que inicia la disolución fibrinolítica de los coágulos de fibrina.

Hialuronidasa.- La mayor parte de los estreptococos hemolíticos la producen; la enzima despolimeriza la substancia fundamental de los tejidos. La substancia capsular de cepas encapsuladas de estreptococos hemolíticos de los grupos A y C está formada por ácido hialurónico, y tales cepas no producen hialuronidasa, a pesar de que generalmente son virulentas.

Proteinasa estreptococica.- La mayor parte de nuestra información acerca de ésta enzima se debe a Elliot (9) y colaboradores, que han obtenido en forma cristalina a la enzima y a su precursor inac

tivo.

Amilasa.- Algunas cepas del grupo A sintetizan amilasa extracelular cuando se cultivan en los medios usuales de peptona, pero la producción es mucho mayor si hay en el medio un substrato como plasma humano, almidón glucógeno y maltosa.

Esterasa.- Esta enzima fué descubierta por Stock - (9) en 1961 en estreptococos del grupo A. Se han encontrado anticuerpos en conejos y en el hombre, pero los antisueros no inhiben la acción de la enzima.(9) (6) (5)

Toxina Eritrogénica.- Es una sustancia que ocasiona eritema local intenso inoculada por vía intra-- dérmica al hombre, y que en cantidades elevadas -- produce exantema eritematoso generalizado.

Esta toxina produce el exantema de la escarlatina y se conoce como "toxina de Dick" según su descubridor.(6)

TIPOS CLINICOS DE INFECCION EN EL HOMBRE.- Los estreptococos están muy difundidos e indudablemente causan mayor diversidad de tipos clínicos que cualquier otro microorganismo. Pueden originar enfermedad en todos los órganos y tejidos del cuerpo.

Erisipela.- Enfermedad inflamatoria de la piel ocasionada por Str. pyogenes.

Los estreptococos no se encuentran en la porción central de la zona inflamada sino en la periferia, y pueden aislarse mas facilmente cortando fragmentos de tejido.

Faringitis Estreptocócica.- Los estreptococos beta hemolíticos producen la infección aguda de la faringe, los síntomas incluyen hiperemia local intensa, aumento de volumen de los gánглиos linfáticos cervicales y generalmente fiebre.

Escarlatina.- Es una entidad clínica por el exantema que provoca la toxina eritrogénica; en otros casos no difiere en forma importante de las demás

infecciones estreptocócicas de las vías respiratorias superiores, y sus secuelas son esencialmente las mismas.

Fiebre Reumática.- En la patología y sintomatología de la enfermedad inflamatoria estreptocócica - no supurativa, llamada fiebre reumática, ésta secuela se pone de relieve ocurriendo aproximadamente en el 3%, por la población general. La lesión fundamental de la fiebre es la carditis, que puede acompañarse de fiebre y artritis. La carditis incluye degeneración de tejido colectivo, característica de las válvulas cardíacas enfermas y lesiones miocárdicas inflamatorias específicas.

Endocarditis bacteriana Sub-aguda.- La infección de endocardio con producción de lesiones ulcerosas pueden ocurrir por muchas bacterias. Con mucha la más frecuente es la del estreptococo alfa-hemolítico.

Glomerulonefritis Aguda.- La relación causal entre

la infección estreptocócica y ésta enfermedad parece definitivamente aclarada por la aplicación de métodos de clasificación de tipo, que indican una relación estrecha entre ésta nefritis y ciertos tipos de estreptococos.

Fiebre Puerperal.- Es término vago que indica, que con frecuencia, inmediatamente después del parto a parece fiebre.

Probablemente la respuesta febril definida en la mayor parte de casos se relaciona con infección bacteriana. (6) (5) (9)

IDENTIFICACION EN EL LABORATORIO.- Generalmente, - el aislamiento de estreptococos en muestras de material patológico no es difícil.

Se hace una inoculación con el hisopo -- conteniendo la muestra, en un medio enriquecido; - el agar sangre es el medio de elección para observar la hemólisis alfa y la hemólisis beta.

Para un mejor aislamiento de estreptococos se utilizan discos impregnados con Neomicina, a la cual estos microorganismos son resistentes e inhibe el crecimiento de otros, como los estafilococos. Aproximadamente a 8 mm. de distancia se coloca un disco Taxo A, que contiene bajas concentraciones de Bacitracina, que es un antibiótico al al cual los estreptococos beta-hemolíticos del Grupo A son sensibles.

La morfología de las colonias es característica en el estreptococo beta-hemolítica, pueden encontrarse las peculiares cadenas de cocos en frotis teñidos con Gram.

Para identificar estreptococos del Grupo A, se ha empleado la técnica de anticuerpo fluorescente, pero se ha considerado de poco valor aplicado a frotis directos de garganta.(6) (5) (4)

El objeto de éste trabajo es la comparación de dos métodos bacteriológicos para averiguar en cuál puede obtenerse un mayor número de aislamientos positivos de estreptococo beta-hemolítico.

Uno de ellos consiste en siembra directa de la muestra a placas de agar sangre y después de una adecuada incubación, identificación de las colonias características de los estreptococos beta-hemolíticos.

Se sabe de antemano que los caldos selectivos tienen como finalidad la nutrición y multiplicación de un cierto microorganismo e inhibe el crecimiento de otros, y por lo tanto se consideran muy útiles en el laboratorio para el aislamiento e identificación de los mismos.

El segundo método consistió en incubar la muestra faríngea en el caldo selectivo Streptocel con el objeto de aislarlos primeramente y en seguida sembrarlos a placas de agar sangre para la identificación de los estreptococos beta-hemolíti-

cos.

En ésta forma, el plan de trabajo consig
tió en tomar un número de casos (80 personas) y ha
cerles un cultivo faríngeo por los dos métodos y -
determinar de ésta manera, en cual se obtienen ma-
yor número de casos positivos.

Se tomó además un frotis directo para re
lacionar la frecuencia de hallazgos positivos en -
el examen microscópico directo con el aislamiento
de colonias de Estreptococos beta-hemolíticos en -
el cultivo.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Cada cultivo de garganta se recogió con hisopos con punta de algodón estériles; oprimiéndose la lengua para que la garganta quedara adecuadamente expuesta e iluminada. El hisopo se pasó sobre cada zona tonsilar y cuando se observó exudado se tomó específicamente de esa área. Se tuvo cuidado de evitar la contaminación del hisopo por rozamiento con la lengua y con los labios.

Se inoculó por estrías en una placa de agar sangre⁺, colocándose en seguida los discos de Neomicina⁺, Taxo A⁺ y Taxo P⁺.

Con otro hisopo estéril se tomó otra --- muestra y se introdujo en un tubo conteniendo el - caldo selectivo Streptosel.

+ Blood Agar Base (BBL)

+ Disc Neomicina N 30 (BBL)

+ Differentiation Disc Taxo A (BBL)

+ Differentiation Disc Taxo P (BBL)

+ Streptosel Broth (BBL)

Con un tercer hisopo se hicieron una o dos extensiones en un porta objeto.

Se incubaron los tubos a 37°C. por 24 horas; las cajas de agar sangre se colocaron en atmósfera de CO₂ al 3-5%.

Después del período de incubación se observaron y se identificaron las colonias.

Se suspendieron las colonias sospechosas de Estreptococos beta-hemolíticos en caldo de Soya Trypticase⁺, se incubaron a 37°C. por 18-24 horas. Enseguida se hicieron subcultivos en placas de agar sangre, colocándose los discos de Neomicina y Taxo A.

Posteriormente se observaron las colonias obtenidas haciéndose además frotis a las mismas.

Se observó también el desarrollo e inhibición de los Estreptococos alrededor del disco Taxo A.

+ Trypticase Soy Broth (BBL)

De la muestra contenida en el caldo se--
lectivo Streptosel, después de la incubación apro-
piada, se inoculó una placa de agar sangre en igua
les condiciones. Posteriormente se observaron las
colonias y se identificaron.

R E S U L T A D O S

SIEMBRAS DIRECTAS EN AGAR SANGRE

	No. de casos	No. de casos positivos	Porcentaje
Cocos Gram-positivos en cadena observados en frotis directos	80	59	73.75
Estreptococos alfa hemolíticos aislados	80	41	51.25
Estreptococos alfa hemolíticos y estrept. beta-hemolíticos aislados	80	19	23.50
Estreptococos alfa hemolíticos y estrept. gamma-hemolíticos aislados	80	8	10.00
Estreptococos alfa hemolíticos y neumococos aislados	80	5	6.25
Estreptococos beta hemolíticos y/o neumococos aislados independientemente	80	0	0.00

SUBCULTIVOS DEL CALDO STREPTOSEL

	No. de casos	No. de casos positivos	Porcentaje
Cocos Gram-positivos en cadena observados en - frotis directos	80	59	73.75
Estreptococos <u>al</u> fa hemolíticos - aislados	80	65	81.25
Estreptococos <u>al</u> fa hemolíticos y estrept. beta-he molíticos aislado	80	10	12.50
Estreptococos <u>al</u> fa hemolíticos y estrept. gamma - hemolíticos aisla dos	80	5	6.25
Estreptococos <u>al</u> fa hemolíticos y neumococos aisla dos	80	0	0.00
Estreptococos <u>be</u> ta hemolíticos - y/o neumococos - aislados indepen dientemente.	80	0	0.00

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Como se podrá observar, se obtuvo un porcentaje de 23.75% de estreptococos beta-hemolíticos en la siembra directa en agar sangre y un ---- 12.50% haciendo pasar la muestra faríngea a un caldo selectivo, y subcultivando después en agar sangre.

Yo estoy de acuerdo en la utilización de un caldo selectivo para el aislamiento primario de un microorganismo, ya que se identifica con más facilidad puesto que se ha multiplicado y se encuentra en mayor proporción (100% de aislamiento positivos para estreptococos), solamente que en el caso del caldo selectivo para estreptococos se encontró que un número importante de colonias perdían su actividad hemolítica, teniendo además las colonias un diámetro menor de 1 milímetro, y los frotis observados de éstas colonias presentaron cadenas más cortas y los cocos más gruesos en compara-

ción con los observados en las siembras directas - (19 aislamientos positivos por el primer método -- contra 10 por éste método).

Se utilizaron los discos impregnados con antibióticos, los cuales fueron Neomicina para la que los estreptococos y neumococos son resistentes, no siendo así para los estafilococos y otros microorganismos Gram-negativos, por lo tanto en la práctica es útil para el aislamiento de los primeros, ya que alrededor de éste disco se pudieron observar las colonias características.

Además se usaron los discos Taxo A que - contiene bajas concentraciones de Bacitracina a la cual los estreptococos beta-hemolíticos del Grupo A son sensibles; pero en un cultivo primario en -- realidad es difícil aislarlos ya que entre los dos discos, Neomicina y Taxo A habrá crecimiento de -- neumococos y estreptococos alfa-hemolíticos o es--treptococos gamma-hemolíticos; mientras que los estreptococos beta-hemolíticos del Grupo A son inhi-

bidos y no se pueden aislar, pero nos dá una idea de que hubo inhibición de éstos microorganismos ya que en comparación con el lado dónde se encuentra la Neomicina y el disco Taxo P (que inhibe a los neumococos) hay menos crecimiento de colonias que en éste.

Por lo tanto es necesario, tomar colonias de estreptococos beta-hemolítico, hacer un subcultivo de éstas en agar sangre y colocar el disco Taxo A en dónde observaremos la inhibición de estreptococos alrededor del disco y a mi manera de ver es un diagnóstico más seguro y exacto que valerse solo de las observaciones del cultivo primario.

Se observó además que las colonias crecidas alrededor del disco de Neomicina, igual que las colonias y los subcultivos del caldo Streptococel tuvieron también un diámetro menor de 1 mm.

La mayoría de estreptococos que se ais-

laron, tanto en la siembra directa como en el subcultivo del caldo fueron alfa-hemolíticos ya que como se sabe forman parte de la flora normal. Debido a que éstos microorganismos son semejantes a los Neumococos y además presentan el mismo tipo alfa-hemolítico, se aislaron e identificaron neumococos en un porcentaje de 6.25%.

Las observaciones que se tuvieron para los discos de Neomicina y Taxo A, fueron las mismas que para el reconocimiento de neumococos con la Neomicina y Taxo P, solo que en éste caso no se llevaron subcultivos ya que se hizo la prueba de solubilidad de bilis con el desoxicolato de sodio al 10%.

De acuerdo a la experiencia adquirida en éste trabajo creo que es esencial hacer un frotis directo para un cultivo faríngeo ya que nos dá una idea del microorganismo predominante así como la presencia de células como polimorfonucleares etc., en una infección.

Se obtuvo una relación de 80.82% entre las cadenas de cocos gram-positivos observados en el frotis directo y el aislamiento de estreptococos en el cultivo de agar sangre; y un 73.75% en los subcultivos de caldo Streptosel.

A mi modo de ver es muy importante el aislamiento e identificación de éste microorganismo patógeno y hacer un reporte rápido al médico, ya que como se sabe produce una variedad de enfermedades serias en el hombre y trae como consecuencia diversas secuelas como la fiebre reumática, la cual se evitaría eliminando tempranamente su foco primario de infección en el tracto respiratorio superior.

Según la experiencia que obtuve en esta investigación, opino que el método más eficaz es el directo a agar sangre ya que se obtiene un mayor porcentaje de aislamientos positivos y se puede tener un diagnóstico 24 horas antes que por el otro método.

R E S U M E N

Se utilizaron dos técnicas para el aislamiento e identificación de estreptococos beta-hemolíticos del Grupo A.

El número de casos tomados fueron 80 de los cuales se aislaron e identificaron 19 casos -- con estreptococos beta-hemolítica del Grupo A en la siembra directa en agar sangre.

En los subcultivos del caldo Streptosel en agar sangre se aislaron e identificaron 10 casos con estreptococos beta-hemolítica del Grupo A.

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

1. Bailey, W.R. 1970.- A Laboratory Manual Diagnos
tic Microbiology. The C.V. Mosby Company. Philadel
phia. 133 pp.
2. Bailey, W.R. and Scott, E.G. 1974.- Diagnostic
Microbiology. 4Th Ed. The C.V. Mosby Company. -
Saint Lous. 414 pp.
3. Bauer, J.D., Ackermann, P.G., Toro, G. 1974.--
Clinical Laboratory Methods. 8Th. Ed. The C.V.
Mosby Company. Saint Louis. 947 pp.
4. Rohde, P.A. 1974.- B.B.L. Manual de procedimientos
de Laboratorio y de productos. Versión españa
ola de la redacción de Beckton Dickenson de Méxi
xico S.A. de C.V. Editores Asociados, S.A. Méxi
co. 213 pp.
5. Burdon, K.L. and Williams, R.P. 1971.- Microbio
logía. Centro Regional de Ayuda Técnica de Agencia
para el desarrollo internacional. México, -
Buenos Aires. 822 pp.

6. Burrows, W. 1974.- Tratado de Microbiología. Vi
gésima Ed. Interamericana. México. 901 pp.
7. Collins, C.H. 1969.- Métodos Microbiológicos, -
Acribia Zaragoza. Zaragoza, España. 410 pp.
8. Frazier, W.C. 1972.- Microbiología de los ali--
mentos. Acribia. Zaragoza, España. 512 pp.
9. Smith, D.T. Conant, N.F., Willett, H.P. 1971.-
Microbiología de Zinsser. Cuarta Edición. Ispa
noamericana. México. 1551 pp.
10. Davidsohn, I. and Henrry, J.B. 1974.- Clinical
Diagnosis. 15Th. W.B. Saunders Company. Phila--
delphia. 1443 pp.

800256

FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

Vencido el plazo, el lector pagará 1.00 peso por cada día que pase.

Plata 153,314

~~19 AGO. 1977~~

~~9 SET. 1977~~

~~10 NOV. 1977~~

~~25 NOV. 1977~~

~~30 NOV. 1977~~

~~03 MAR. 1978~~

~~10 MAR. 1978~~