"ESTUDIO COMPARATIVO DE ALGUNOS METODOS DE IDENTIFICACION DE ESTREPTOCOCOS HEMOLITICOS"

Por RAUL ZEMELMAN Z. (Q. F.)
Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción

ABSTRACT

Ninety strains of Beta hemolytic streptococci isolated from different types of specimens are grouped by the Lancefield Microprecipitin technique. Most of groupable strains (36,7%) belonged to group A.

These strains are also grouped by inmunofluorescence, Bacitracin disks and Lancefield techniques as belonging and not beloging to group A. There are no statistical differences between resuls.

Susceptibility to various antibiotics was also tested and all of them showed a high activity against streptococci with the exception of Streptomicin.

INTRODUCCION

La importancia epidemiológica de los estreptococos hemolíticos, especialmente la del Grupo A, ha inducido a varios investigadores a establecer métodos rápidos y efectivos para su identificación.

Es indudable que el sistema que ha servido como referencia a otros posteriores es el descrito por Lancefield (1) el cual agrupa a estos gérmenes a base de la diferente calidad antigénica del polisacárido C, capaz de reaccionar específicamente con sueros preparados para cada uno de los grupos. Este antígeno se encuentra ubicado, en la generalidad de los estreptococos, en la pared celular y está formado fundamentalmente por Ramnosa (2). La reacción serológica se lleva a cabo en tubos capitales entre el antisuero específico y el antígeno, previamente extraído de la célula bacteriana. Es así como mediante esta técnica es posible identificar estreptococos pertenecientes a cualquiera de los grupos establecidos.

De los demás métodos, la mayoría se refiere a la identificación del grupo A, por ser el más importante en la infección humana. Maxted (3) ha descrito una técnica rápida basada en la susceptibilidad de estos gérmenes frente a la Bacitracina

y en la elevada resistencia de los demás grupos a la actividad de este antibiótico. Los resultados obtenidos por Maxted han sido posteriormente confirmados por otros autores (4), (5).

Otra técnica que ha cobrado importancia en los últimos años debido a su rendimiento y rapidez, es el diagnóstico efectuado a través de reacciones inmunofluorescentes, originalmente descritas por Coons y col (6). Ella ha sido aplicada a la identificación rápida de diferentes microorganismos y entre ellos, los estreptococos del grupo A, por Moody y col. (7), (8), (9), Rauch y col. (10) y Peeples y col. (11). Por ser también un método serológico, puede ser aplicado al reconocimiento de cualquiera de los otros grupos de estreptococos. En estos casos, la cepa en estudio se hace reaccionar, en un portaobjetos, con el suero específico conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína y luego la preparación es observada bajo la acción de luz Ultravioleta. El resultado positivo se manifiesta por medio de fluorescencia verde que emite la célula bacteriana, especialmente desde su pared celular.

Wallestrom (12) ha establecido lo que él denomina la "Prueba Triple" para identificar estreptococos del grupo A. Esta consiste en demostrar la estimulación de la hemólisis en presencia de Nucleinato de Sodio, fenómeno previamente descrito por Grubb (13), la inhibición de la hemólisis por medio de la glucosa, descrita anteriormente por Ruediger (14) y Kobayashi (15 y, por último, la inhibición del crecimiento por medio de la Bacitracina. Solamente los estreptococos del grupo A responderían en esta forma en el triple método de identificación.

Streamer y col. (16) han estudiado comparativamente la efectividad del método del anticuerpo fluorescente y de la Bacitracina en relación al método de Lancefield demostrando que ambos poseen una efectividad bastante elevada.

El presente trabajo tiene por objetivos el estudiar la incidencia relativa de los estreptococos hemolíticos de los grupos A, B, C y D, por medio de la técnica de microprecipitación capilar de Lancefield, en diferentes productos patológicos, estudiar comparativamente la efectividad en la identificación de los estreptococos del grupo A de los métodos inmunofluorescente y de la Bacitracina, usando la técnica de Lancefield como referencia, como así también, estudiar la sensibilidad de las cepas aisladas frente a diversos antibióticos de uso frecuente.

MATERIAL Y METODOS

El material estuvo constituido por 90 cepas de estreptococos hemolíticos aislados en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción. Las muestras de productos patológicos, cuya distribución se presenta en la Tabla N-1, fueron sembradas en placas de agar sangre e incubadas a 37ºC durante 24 horas. Luego se pesquisó en ellas la presencia de colo-

nias sospechosas de estreptococos hemolíticos cuya comprobación se efectuó por los métodos bacteriológicos habituales.

Las cepas aisladas fueron sembradas en medio líquido de Todd- Hewitt, según la fórmula modificada de Updyke y Nickle (17) (Bacto Todd- Hewitt Broth, Difco Lab.), e incubadas durante 18-24 horas a 37ºC. Una vez comprobada la pureza del cultivo, se procedió a centrifugar a 2500-3000 rpm durante 10 minutos. Una pequeña parte del sedimento se resuspendió en 2 ml. de Buffer Fosfato a pH 7.2 y se volvió a centrifugar. Con este nuevo sedimento, ya lavado, se preparó un frotis en un portaobjetos, se fijó con alcohol etílico de 95º durante 1 minuto y se sometió a la acción de suero específico para el grupo A, conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (Bacto FA Streptococcal Antiserum A, Difco Lab.), de acuerdo al método directo descrito por los Laboratorios de Salud Pública de los Estados Unidos (18). Las preparaciones fueron observadas en un microscopio Leitz Ortholux adicionado de una lámpara fluorescente Leitz con ampolleta de Mercurio a alta presión (Phillips CS 150). Se usó, además, un filtro para luz ultravioleta (UV Filter 2 mm UGl) y un condensador de Fondo Obscuro de N. A. 1.20.

TABLA Nº 1

DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS

TIPO DE MUESTRA	Nº	%
sec. faríngea	38	42,2
sec. nasal	5	5,6
sec. vaginal	8	8,9
sec. ótica	1	1,1
sec. umbilical	1	1,1
pus	22	24,4
expectoración	7	7,8
orina	8	8,9
TOTAL	90	100,0

El resto del primer sedimento se sometió a hidrólisis en medio clorhídrico a ebulición para extraer el polisacárido C, el cual una vez neutralizado, se sometió a la acción de antisueros específicos para los grupos A, B, C y D (Bacto Streptococcal Antiserum A, B, C y D, Difco Lab.) según la técnica de microprecipitación capilar de Lancefield.

Paralelamente las cepas de estreptococos hemolíticos, en forma individual, fueron sometidas a la acción de los antibióticos Estreptomicina, Cloramfenicol, Tetraciclina, Eritromicina, Oleandomicina y Novobiocina, de acuerdo a la técnica en placa de Bondi y Col. (19). Se incluyó también en esta prueba un disco impregnado en Bacitracina (Taxos A, BBL) según el método de Maxted.

RESULTADOS

En la Tabla Nº 2 se presentan los resultados obtenidos al agrupar las 90 cepas de estreptococos hemolíticos por el método de Lancefield usando sueros para los grupos A, B, C y D. Las cepas que no precipitaron con ninguno de estos sueros se colocan separadamente como cepas no agrupables.

TABLA Nº 2

AGRUPACION DE 90 CEPAS DE ESTREPTOCOCOS HEMOLITICOS POR EL METODO DE LANCEFIELD

GRUPO	Nº	%
A	33	36,7
B	2	2,2
C	2	2,2
D	9	10,0
no agrupables	44	48,9
TOTAL	90	100,0

Puede observarse que la mayoría de las cepas (48.9% correspondieron a estreptococos no agrupables. Del resto (51.1%), el grupo A se presentó con una frecuencia de 36,7%, el grupo D con un 10% y por último, en orden decreciente, los grupos B y C con un 2.2% cada uno.

La Tabla Nº 3 presenta los resultados obtenidos al someter las 90 cepas aisladas a los tres métodos de identificación utilizados en este estudio. Debido a que los métodos de inmunofluorescencia y de Bacitracina fueron dirigidos solamente a la identificación de estreptococos del grupo A, la agrupación en esta Tabla se ha efectuado en: estreptococos del grupo A y estreptococos de otros grupos en conjunto. Se observa en este caso que la positividad obtenida con las tres técnicas es aproximadamente similar, 36.7% para Lancefield, 40% para inmunofluorescencia y 32,2% para Bacitracina. Si se considera que la técnica de Lancefield se usó como referencia, se observa también en estos resultados que la inmunofluorescencia agrupó como pertenecientes al grupo A un 3.3% de cepas que en realidad pertenecían a otros grupos.

TABLA Nº 3

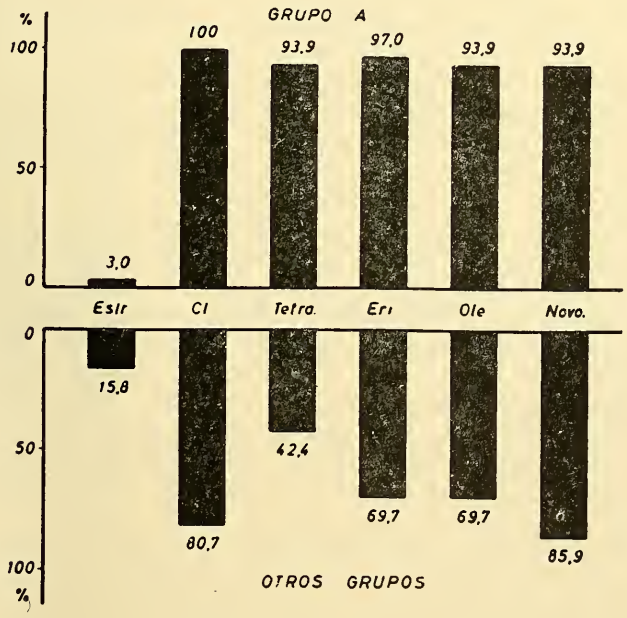
AGRUPACION DE 90 CEPAS DE ESTREPTOCOCOS HEMOLITICOS POR LOS METODOS DE LANCEFIELD, FLUORESCENCIA Y BACITRACINA

METODO	GRUPO A		Otros Grupos		
AGRUPACION	Nº	%	Nº	%	TOTAL
Lancefield	33	36,7	57	63,3	90
fluorescencia	36	40,0	54	60,0	90
bacitracina	29	32,2	61	67,8	90

En el Gráfico Nº 1 se muestra la sensibilidad de las 90 cepas frente a la acción de los antibióticos Estreptomicina, Cloramfenicol, Tetraciclina, Eritromicina, Oleandomicina, Novobiocina. En este caso las cepas también fueron agrupadas en pertenecientes al grupo A y pertenecientes a otros grupos. De acuerdo a estos resultados, es notoria la elevada resistencia que presentan las cepas de estreptococos frente a la Estreptomicina, siendo de un 97% para los del grupo A y de un 84.2% para los otros grupos. También se observa una resistencia relativamente elevada de los estreptococos no pertenecientes al grupo A frente a la Tetraciclina (57.6%). Frente al resto de los antibióticos usados, los estreptococos presentan, en general, una sensibilidad bastante elevada, siempre mayor de un 93.9% para los del grupo A y mayor de un 69.7% para los no pertenecientes a este grupo.

GRAFICO Nº 1

SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS DE 90 CEPAS DE ESTREPTOCOCOS HEMOLITICOS



Uno de los hechos que llama la atención al observar los resultados de la Tabla Nº 2, es el elevado porcentaje de estreptococos del grupo A (36.7%). Esto es natural si se considera que la mayoría de las muestras la constituían las secreciones faríngeas donde estos gérmenes se encuentran con mayor frecuencia. También se encontró gérmenes de este tipo en las muestras de pus, pero no se aisló ninguna cepa del grupo A

en muestras de orina o secreciones vaginales. La explicación anterior también vale para los estreptococos del grupo D (10%), ya que ellos son gérmenes habitualmente aislados de muestras de orina y secreciones vaginales las que constituyeron en conjunto un 17.8%.

En relación al bajo porcentaje de estreptococos de los grupos B y C (2.2% para cada uno) este hecho puede ser considerado normal puesto que su origen es preferentemente animal, pudiendo encontrarse ocasionalmente en el organismo humano (20).

De acuerdo a los resultados obtenidos al someter las 90 cepas de estreptococos hemolíticos a los tres métodos usados, se desprende que la efectividad de la inmunofluorescencia y de la Bacitracina comparados con el método de Lancefield, es aproximadamente similar, cuando se dirigen a la identificación de estreptococos del grupo A, ya que los cálculos estadísticos correspondientes no demuestran diferencias significativas entre los resultados cuando se comparan entre sí. Esto se encuentra en concordancia con lo obtenido por Streamer y col. y de ello se desprende que, para la identificación de cepas de estreptococos hemolíticos del grupo A, cualquiera de estos métodos puede ser usado en el laboratorio bacteriológico. Sin embargo, el método de la Bacitracina aparece como el más manuable y con menor número de dificultades técnicas, situación que lo coloca como el más útil en el diagnóstico de rutina bacteriológica. Su limitación se encuentra en el hecho de no ser capaz de identificar cepas pertenecientes a otros grupos, de modo que para una investigación más amplia debe usarse un método serológico, ya sea por fluorescencia o microprecipitación. De estos dos últimos, el de fluorescencia podría ser considerado más práctico por ser más simple en su ejecución y además por ser capaz de detectar células bacterianas directamente en la muestra problema, sin necesidad de aislar las cepas por los métodos bacteriológicos habituales. Este último hecho tiene gran importancia porque los estreptococos y en especial los del grupo A son difíciles debido a su labilidad al medio ambiente y a sus exigencias de cultivo. Existe así un porcentaje determinado de cepas que no aislan por cultivo y que el método fluorescente detecta por poder actuar sobre células vivas y muertas.

El que el método fluorescente haya dado una positividad mayor que el de referencia se debe, al menos en parte, a que existen reacciones serológicas cruzadas entre los grupos A, C y G, lo que ha inducido a autores a establecer procedimientos para eliminarlas (21). Sin embargo, la baja frecuencia con que los estreptococos de los grupos C y G se presentan en la especie humana transforma este problema en uno de poca importancia.

Por último, se han aprovechado también las cepas para averiguar su sensibilidad frente a diferentes antibióticos de uso frecuente. Llama la atención al observar estos resultados, la elevada resistencia que presentan los estreptococos a la Estreptomi-

cina, hecho que ha sido comprobado por otros autores (22) con estreptococos del grupo B aislados de leche de vaca. Garrod y Scowen (23) han recopilado datos sobre las cantidades mínimas inhibitorias de Estreptomicina para ciertos estreptococos y se indican valores de 32 mcg de antibiótico por ml para inhibir el **Streptococcus pyogenes** que pertenece al grupo A y 64 mcg por ml para el **Streptococcus faecalis** que pertenece al grupo D. Estos valores hacen que ellos sean catalogados como gérmenes resistentes frente a la Estreptomicina (24). En relación a los demás antibióticos, los estreptococos presentaron una elevada sensibilidad, con excepción de la Tetraciclina frente a los estreptococos no pertenecientes al grupo A.

RESUMEN

Se aislan 90 cepas de estreptococos hemolíticos de muestras de diferentes productos patológicos y se agrupan de acuerdo a la técnica de microprecipitación de Lancefield. La mayor parte de las cepas agrupables (36.7%) corresponde a estreptococos del grupo A.

Las 90 cepas aisladas se agrupan en: pertenecientes al grupo A y pertenecientes a otros grupos según los métodos inmunofluorescente, Bacitracina y Lancefield. Las diferencias obtenidas en los resultados no son significativas.

Se estudia la sensibilidad de estos gérmenes frente a diversos antibióticos, encontrándose una elevada sensibilidad en general con excepción de la Estreptomicina frente a la cual la resistencia es notoria.

REFERENCIAS

1.— LANCEFIELD R. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 38: 473, 1938.
2.— ARAUJO P., KRAUSE R. M. y FOX E.: Bact. Proc. Pág. 74. 1963.
3.— MAXTED W. R.: J. Clin. Path. 6: 224, 1953.
4.— LEVINSON M. L. y FRANK P. F.: Bact. 69: 284, 1955.
5.— CLIFFORD R. y GARRISON H. A.: Tomorrow's Scientists 3: 2, 1958.
6.— COONS H. A., GREECH H. J. y JONES R. N. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47: 200, 1941.
7.— MOODY M. D., ELLIS E. C. y UPDYKE E. L.: J. Bact. 75: 553, 1958.
8.— MOODY M. D., ELLIS E. C. y UPDYKE E. L.: Bact. Proc. Pág. 135, 1958.
9.— MYODY M. D., BAKER C. N. y PITTMAN B.: Bact. Proc. Pág. 83, 1962.
10.— RAUCH H. C. y RANTZ L. A.: Bact. Proce. Pág. 81, 1962.
11.— PEEPLES W. J., SPIELMAN D. W. y MOODY M. D.: Pub. Health Rep. 76: 651, 1961.
12.— WALLESTROM A.: Act. Path et Microb. Scand. 56: 459, 1962.
13.— GRUBB R.: Act. Path et Microb. Scand. 36: 181, 1955.
14.— RUEDIGER C. F.: J. Inf. Dis. 3: 633, 1906.
15.— KOBAYASHI R.: Kitasato Arch. Exp. Med. 17: 218, 1940.
16.— STREAMER C. W., WILLIAMS P. M., LOU WANG W. L., JOHNSON R. S., McGUIRE C. D., ABELOW I. J. y GLASER R. J.: Dis. of Child. 104: 157, 1962.
17.— UPYDKE E. L. y NICKLE M. I.: Appl. Microb. 2: 177, 1954.
18.— UNITED STATES DEPARTAMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. PUBLIC HEALTH SERVICE. Atlanta, Georgia, 1958.
19.— BONDI, SPAULDING, SMITH y DIETZ: Am. J. M. Sc. 213: 221, 1947.
20.— WILSON G. S. y MILES A. A.: Williams & Wilkins Co. 4ª Ed. 669-670, 1957.
21.— JABLON J. M. y BRUST B.: Bact. Proc. Pág. 89, 1963.
22.— ZEMELMAN R. y LONGERI L.: Trabajo en preparación.
23.— GARROD L. P. y SCOWEN E. F.: Brit. Med. Bull. 16: 23, 1960.
24.— HUSSAR A. E. y HOLLEY A. L.: Macmillan Co 103, 1954.