

Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

"FRECUENCIA DE OROCULTIVOS POSITIVOS POR DISTINTOS
SEROGRUPOS Y ESPECIES DE *STREPTOCOCCUS* BETA-HEMOLÍTICOS
REFERIDOS A UN LABORATORIO DE LA CIUDAD CAPITAL DE
GUATEMALA"

Informe de Tesis

Presentado por
Cinthia Lucia Ovando Monzón

Para optar al título de
Química Bióloga

Guatemala, octubre de 2012

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cobar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A DIOS Y A LA VIRGEN MARIA

Por guiarme en el camino de la vida y por ser la fuerza que me impulsa a lograr mis metas gracias a las bendiciones recibidas.

A MIS PADRES

Guillermo Ovando y Vera Monzón, por su amor, apoyo incondicional y por animarme en cada etapa de mi vida.

A MIS HERMANOS

Karla y Willy, por ser mis amigos y cómplices, por estar ahí cuando más los necesito.

A MI FAMILIA

Por su poyo, especialmente a mi abuelita Beatriz†, con amor y admiración.

A MIS AMIGOS

Por los buenos e inolvidables momentos compartidos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por ser mi casa de estudio durante estos años.

A toda mi familia, por todo el amor que me han brindado, ya que es el motor de mi vida.

A ULTRALAB, por ayudarme a realizar esta investigación y hacerme una mejor profesional.

A mis asesores, Dr. Gustavo Gini y Lic. Martin Gil, por compartir sus conocimientos y experiencias.

ÍNDICE

Contenido	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	5
A. Historia	5
B. Taxonomía de los estreptococos	5
C. Generalidades	7
D. Características estructurales	7
E. Clasificación	8
F. Estreptococo del grupo A (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	10
G. Estreptococos del grupo C y G	14
H. Signos y síntomas	17
I. Diagnóstico de laboratorio	18
J. Pruebas de identificación	19
K. Patologías relacionadas con infecciones por <i>Streptococcus sp.</i>	22
L. Tratamiento	25
M. Prevención	26
N. Epidemiología	26
O. Estudios recientes	27
IV. Justificación	29
V. Objetivos	31
VI. Hipótesis	32
VII. Materiales y Métodos	33
VIII. Resultados	40
IX. Discusión	45
X. Conclusiones	48
XI. Recomendaciones	49
XII. Referencias	50
XIII. Anexos	54

I. RESUMEN

Los estreptococos beta-hemolíticos del grupo A de Lancefield (EBHA), han sido los agentes bacterianos mayormente aislados en cultivos de exudados faríngeos. Sin embargo, se ha demostrado que en varios países de América, ha aumentando la frecuencia de aislamientos de otros estreptococos como los del grupo C (EBHC) y G (EBHG). Por lo que el objetivo de este estudio de carácter descriptivo, fue establecer la frecuencia de grupos y especies de *Streptococcus* beta-hemolíticos en cultivos de garganta referidos a un laboratorio de la ciudad capital de Guatemala, durante el período de septiembre 2010 hasta agosto 2011, en el que se recibieron un total de 2,023 muestras.

De las muestras procesadas se obtuvieron 273 (14%) cultivos positivos con crecimiento de colonias beta-hemolíticas, a los cuales se les realizó la triada de pruebas presuntivas de sensibilidad a la Bacitracina, al Trimetoprim/Sulfametoxazol y prueba de CAMP para luego confirmar los grupos y especies con el sistema API® 20 Strep y con pruebas de aglutinación para la clasificación de serogrupo según la clasificación de Lancefield.

De 2073 muestras procesadas, 273 cultivos presentaron colonias beta-hemolíticas, 65(24%) presentaron el Taxo A susceptible, Taxo SXT resistente y prueba de CAMP negativa y todos fueron confirmados en un 100% como *Streptococcus pyogenes*. Los cultivos que presentaron Taxo A resistente, Taxo SXT susceptible y CAMP negativa 178 (65%) fueron clasificados como *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, mientras que aquellos que presentaron susceptibles ambos taxos y CAMP negativa, fueron confirmados como *S. constellatus* 13 (5%), *S. intermedius* 8 (3%), *S. agalactiae* 3 (1%), *Enterococcus faecalis* 3 (1%) y *Enterococcus faecium* 3 (1%).

La frecuencia de los grupos de Lancefield fue la siguiente: 24.17% pertenecían al grupo A, 1.09% al grupo B, 40.65% al grupo C, 1.1% al grupo D, el 4.43% al grupo F, al 28.56 al grupo G y sin aglutinación el 1.1% de las muestras.

Lo anterior, evidenció el 5.12% de resistencia antibiótica, a macrólidos (azitromicina, claritromicina y eritromicina), siendo susceptibles a amoxicilina/ácido clavulánico, amoxicilina, ampicilina, cefaclor, cefadroxilo y penicilina.

Por lo que se concluye que los EBH de los grupos C y G poseen una frecuencia alta en las infecciones de la orofaringe, especialmente los *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, a los que se recomienda informar de forma rutinaria para ampliar los estudios de prevalencia en la población guatemalteca, así como para tratar a estos pacientes en el menor tiempo posible y evitar las consecuencias clínicas supurativas y no supurativas que a largo plazo estos microorganismos pueden provocar, especialmente entre los niños pre-escolares de 1 a 5 años de edad, en los que se aislaron EBH con más frecuencia (32%), sin una diferencia significativa de género,

II. INTRODUCCIÓN

La biología, epidemiología y respuesta inmune humana a las infecciones por *Streptococcus* sp. ha fascinado y desafiado a los científicos desde el descubrimiento de los cocos Gram positivo en cadena, ya que todas las personas, independientemente de la edad, sexo o raza, son susceptibles a la infección estreptocócica (Koneman, Washington, Stephen, Gary, & William, 2006; Bailey & Scott, 2002).

Los estreptococos beta-hemolíticos (EBH) constituyen un grupo variado de microorganismos, responsables de un número importante de cuadros clínicos en niños y adultos en varios países de América. En el año 2008, en Asunción, Paraguay, se publicó un estudio en donde los resultados para faringitis por EBH fue de 42 (13.9%) de 303 cultivos estudiados, de los cuales fueron identificados como estreptococos beta-hemolítico del grupo A (EBHA) a 25 (8.3%), estreptococos beta-hemolíticos del grupo C (EBHC) a 4 (1.3%) y estreptococos beta-hemolíticos del grupo G (EBHG) a 13 (4.3%) (Carpinelli, Fariña, Samudio, Figueredo, Laspina, & Sanabria, 2008) .

Así mismo, en un estudio realizado en un periodo de seis meses en Argentina en el año 2005, reportó 95 infecciones por EBH, de las cuales 68 fueron identificados como *Streptococcus pyogenes*, 7 como *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* del grupo C y 20 como *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* del grupo G (Villar, Julgo, Santana, Baserni, & Reil, 2005; González-Lama, González, & Lupiola, 2000).

Los EBHA, EBHC y EBHG pueden colonizar el tracto respiratorio alto, tanto en individuos asintomáticos como en pacientes con faringitis. Estudios realizados en diversos países indican que la frecuencia de portadores asintomáticos de estreptococos grupo C y G es baja en países con clima templado y alta en países subtropicales y tropicales (Koneman, et al., 2006; Carpinelli, et al., 2008).

Los portadores asintomáticos de EBH son en su mayoría niños en edad escolar, dato revelado en el estudio de Gonzalez y colaboradores en el 2000, en el cual encontraron que

el 30.5% de niños estudiados eran portadores de EBH que luego desarrollaron faringitis con la siguiente distribución: EBHA 60 (6%), estreptococos beta-hemolíticos del grupo B (EBHB) 110 (11%) y EBHC 135 (13,5%) con la siguiente distribución por ciclos escolares: ciclo preescolar y ciclo inicial (4-7 años de edad) 111 (31,9%), ciclo medio (8-10 años de edad) 122 (30,6%) y ciclo superior (11-15 años de edad), 72 (28,2%) (Villar, et al., 2005).

En Guatemala, se ha establecido al EBHA como el patógeno bacteriano causal de la faringitis aguda más importante en la población en general. Sin embargo, debido a los informes recientes en la literatura latinoamericana que describen a los EBHC y EBHG como agentes importantes, se hace necesario estudiarlos en nuestra población.

En este estudio se logró determinar la frecuencia de grupos y especies de EBH en cultivos de garganta referidos a un laboratorio de la ciudad capital de Guatemala, en pacientes sin distinción de edad o género, durante los meses de septiembre 2010 a agosto 2011, trabajando 2,023 muestras de las cuales 273 tuvieron crecimiento de colonias beta-hemolíticas.

III.ANTECEDENTES

A. Historia

Los estreptococos fueron inicialmente identificados por Luis Pasteur, en París en 1878-79. Simultáneamente Robert Koch en Alemania observó a este organismo en el pus de lesiones profundas. Cultivos puros fueron obtenidos por Fehleisen en 1883 y por Rosenbach en 1884 de pacientes con erisipela. El cirujano alemán Teodor Billroth acuñó el término de estreptococos y Rosembach dio el nombre de *Streptococcus pyogenes* a la variedad de organismos que se aislaban de lesiones supurativas (Bailey & Scott, 2002).

La clasificación del estreptococo fue posible, después de la introducción de las placas de agar sangre por Schottmuller en 1903 y a Brown-Smith quien hace la clasificación de acuerdo a la hemólisis en alfa, beta y gama. Fue Rebecca Lancefield quien distinguió serológicamente a los estreptococos beta hemolíticos con base al carbohidrato de la pared; de esta manera fue posible asociar infecciones de la faringe, amígdalas y otras infecciones piógenas con EBHA (Bailey & Scott, 2002; Mahon, Manuselis, & Lehman, 2007).

B. Taxonomía de los estreptococos

El género *Streptococcus* ha sido objeto de numerosas revisiones en la literatura científica, y su nomenclatura ha sido modificada con frecuencia; son varias las especies que se han transferido de un subgrupo a otro, se han añadido o se han redefinido. En estos últimos años, con la aplicación de técnicas moleculares, la taxonomía y la clasificación del género han sufrido algunas modificaciones. Muchas especies son difíciles de diferenciar por sus características fenotípicas, algunas sólo se pueden identificar empleando técnicas moleculares, e incluso hay casos en que ni siquiera así se puede llegar a una identificación completa y segura (Montes & García, 2006).

El nombre de esta familia proviene del griego *estreptos*, el cual significa que se dobla o retuerce con facilidad, como una cadena, la ubicación taxonómica de la familia

Streptococcaceae, fue cuestionada y por ello ha aumentado la cantidad de diferentes especies de estreptococos y de bacterias similares a estas (Mahon, Manuselis, & Lehman, 2007).

En la edición de 1984 del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, la familia *Streptococcaceae* se dividía en 7 géneros. En el año 2002, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), en Atlanta, Georgia, publicó una revisión de microbiología clínica, llamada: *What happened to the Streptococci?: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes*, con la finalidad de señalar los cambios que han tenido los estreptococos en su taxonomía y nomenclatura como resultado de la aplicación de la secuenciación de los genes 16S rDNA y la asociación DNA-DNA, con lo que se han diferenciado en 17 géneros de cocos gram positivos (MacFadding, 2000).

La taxonomía y nomenclatura de éstos y otros microorganismos ha sido profundamente alterada por la aplicación de las técnicas genéticas, como hibridación DNA-DNA, la hibridación DNA-RNA ribosómica (rRNA), y la secuenciación de la subunidad pequeña del rRNA (16s), la cual ha pasado a ser el procedimiento más potente para delinear las interrelaciones filogenéticas de los microorganismos (Koneman, et al., 2006; Bailey & Scott, 2002; Facklam, 2002).

La taxonomía de los estreptococos, se define de la siguiente manera (Koneman, et al., 2006; Bailey & Scott, 2002; Montes & García, 2006):

División BXIII: *Firmicutes*

Clase III: *Bacilli*

Orden II: *Lactobacillales*

Familia VI: *Streptococcaceae*

Género I: *Streptococcus*

Género II: *Lactococcus*

C. Generalidades

La mayor parte de los estreptococos crecen en medios enriquecidos como colonias discoideas. Son un género de bacterias gram positivo, ya que debido a sus características de pared celular gruesa y membrana simple, se tiñen de color violeta, con la coloración de Gram. Sin embargo, conforme un cultivo envejece y las bacterias mueren, estas pierden su coloración en el Gram y se tornan color rosa. Son de forma esférica que crecen en cadenas o pares, donde cada división celular ocurre a lo largo de un eje, midiendo 0.5-2.0 μm de diámetro. Son inmóviles ya que no poseen órganos de locomoción y no producen esporas. Algunos estreptococos elaboran un polisacárido capsular comparable al del neumococo. Estas bacterias no poseen la capacidad de fabricar el sistema enzimático citocromo, por lo tanto son catalasa negativo, lo cual es una característica de distinción frente a los estafilococos; además son oxidasa negativo (Koneman, et al., 2006; MacFadding, 2000).

Los estreptococos son anaerobios facultativos, algunos tienen la capacidad de crecer bajo condiciones aeróbicas, el crecimiento de la mayoría de especies es simulado por el incremento de CO_2 , pudiendo vivir también en la ausencia de **oxígeno**, fermentando los nutrientes en **ácido láctico**. Lo que quiere decir que son bacterias homofermentativas, ya que producen sólo un producto final durante la fermentación, la energía la obtienen principalmente por aprovechamiento de los azúcares. El crecimiento y la hemólisis se favorecen por incubación en 10% de CO_2 . La mayor parte de los estreptococos hemolíticos patógenos crecen mejor a 37°C (Koneman, et al., 2006; MacFadding, 2000).

D. Características estructurales

Es necesario conocer los componentes anatómicos de los estreptococos para poder comprender el comportamiento antigénico y su clasificación (MacFadding, 2000):

La cápsula está constituida por ácido hialurónico (N-acetilglucosamina y ácido glucurónico) cuando se trata del EBHA y de polisacárido, sustancia tipo específico,

cuando es un estreptococo beta-hemolítico del grupo B (EBHB), lo que permite reconocerlo en tipos Ia, Ib, Ic y II y III (Koneman, et al., 2006; MacFadding, 2000).

La parte externa de la pared celular contiene el ácido lipoteicoico, el factor Fc respondedor, el componente proteico denominado proteína M que corresponde a la fracción antigénica de la bacteria y las proteínas T y R; la proteína asociada a proteína M (MAP) y el factor de opacidad sérico (SOF). La parte intermedia contiene el carbohidrato, que es grupo específico, y de esta manera pueden ser diferenciados los EBH en grupos de la A hasta V y la parte interna denominada peptidoglicano se ha podido demostrar que no es solamente la estructura responsable de la rigidez de la pared celular sino que también puede participar en la génesis de enfermedades estreptocócicas y sus posibles secuelas al conocerse sus múltiples actividades biológicas (Koneman, et al., 2006).

La membrana citoplasmática, está situada junto a la pared celular y se encuentra envolviendo al citoplasma que contiene un complejo de nucleoproteínas y proteínas, algunas de ellas con actividad enzimática. Cuando la bacteria pierde la pared celular se constituye una forma L o protoplasto; las formas L de los EBHA sintetizan proteína M y la vierten al medio donde se están desarrollando (Koneman, et al., 2006; MacFadding, 2000).

E. Clasificación

1. Según su poder hemolítico: Después del crecimiento de los estreptococos en agar con sangre de carnero se observan tres tipos de reacción de hemólisis: alfa (α), beta (β) y gamma (γ) (Koneman, et al., 2006; Mahon, et al., 2007).

La hemólisis alfa se refiere a una lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde que se observa alrededor de las colonias, debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado bili-verdina, la hemólisis beta se refiere a un halo de hemólisis completamente claro, que se refiere a la hemólisis total del eritrocito y la hemólisis gama se refiere a la falta de enzimas hemolíticas y por ello la ausencia de hemólisis. Los estreptococos del grupo A, C y G son beta-hemolíticos, los del grupo B alfa-hemolíticos y los del grupo D son generalmente alfa o gamma. Los *Streptococcus pneumoniae* y *viridans* "verde" son alfa-hemolíticos. Por lo tanto la reacción

de hemólisis es importante para la clasificación de los estreptococos (Koneman, et al., 2006; Mahon, et al., 2007).

2. Según Lancefield: Rebecca Lancefield en 1933 desarrolló un sistema de clasificación serológico que fue utilizado para diferenciar las cepas β hemolíticas patógenas. Los estreptococos se subdividen en grupos mediante anticuerpos que reconocen a los antígenos de superficie. Estos grupos incluyen una o más especies. Las agrupaciones de estreptococos más importantes son A, B, C, D, F y G (Koneman, et al., 2006; Bailey & Scott, 2002; Mahon, et al., 2007).

Este sistema se basa en la presencia del compuesto C que es un aminoazúcar de la pared celular, que varía de aminoácidos según el grupo de *Streptococcus* y se identifican por aglutinación al enfrentar el compuesto C con anti-sueros preparados de conejos, según se identifiquen ciertas sustancias que se encuentran en la membrana y en la pared denominadas proteína M y proteína T (Koneman, et al., 2006; Mahon, et al., 2007).

3. Según su secuencia del gen 16SrRNA: Se pueden clasificar como grupo piogénico, mitis, anginosus o milleri, salivarius y bovis (Montes & García, 2006).

El grupo piogénico está formado principalmente por especies beta-hemolíticas, de colonias grandes e incluye especies que son patógenos importantes para el ser humano. El grupo mitis, incluye al patógeno neumococo (*S. pneumoniae*) y a otros estreptococos habituales de la cavidad oral, que producen alfa-hemólisis en agar sangre. El llamado grupo anginosus o milleri, se encuentra formado por especies que se hallan en la cavidad oral humana, en el tracto genital y gastrointestinal, con colonias de tamaño pequeño y característico olor a caramelo. El grupo salivarius, incluye 3 especies de estreptococos genotípicamente relacionados, que normalmente se encuentran en la cavidad oral humana: *S. vestibularis*, *S. salivarius* y *S. thermophilus*. Además de estos 5 grupos, existe otro denominado “grupo mutans” que engloba 8 especies que no están incluidas en los grupos mencionados anteriormente, y que son genéticamente diversas, aunque fenotípicamente similares, en este grupo hay especies relacionadas con la producción de la caries dental (Montes & García, 2006).

F. Estreptococo del grupo A (*Streptococcus pyogenes*)

1. Generalidades: Este organismo causa tradicionalmente **faringitis** supurativa, pero no invasiva y menos frecuentemente infecciones en la piel o **impétigo**. A mediados de los 1900's, las serias complicaciones de las infecciones por EBHA comenzaron a declinar drásticamente y disminuyeron ostensiblemente en la década de los 70's. Por lo tanto, el interés por este microorganismo se redujo notablemente. En los años 80's y 90's, hubo un resurgimiento de la **fiebre reumática** clásica; enfermedad del corazón no supurativa, y también surgieron otras formas de enfermedades estreptocócicas, las cuales incluyen bacteremia invasiva y el síndrome de choque tóxico (Cunningham, 2000).

El estado de portador asintomático de EBHA es un fenómeno frecuente, dinámico y fluctuante entre los niños en edad escolar. La prevalencia global de portación de éste es de 15-20%. El resultado de la delicada interacción entre la bacteria y el huésped colonizado determinará la progresión hacia la enfermedad clínica, la permanencia del estado de portador o su erradicación. Dadas las condiciones adecuadas, todo portador podría transmitir a otros el EBHA, especialmente si el estado de portador es de reciente adquisición. No obstante, salvo en determinadas ocasiones en las que es necesario el tratamiento de erradicación, el portador es generalmente inocuo para sí mismo y para su círculo (Cunningham, 2000).

2. Estructura antigénica: El polisacárido C sirve para la clasificación serológica y es específico de especie, está compuesto por un polímero ramificado de L- ramnosa y N-acetil-D-glucosamina, ácido N-acetil-D-murámico, ácido D-glutámico, L-lisina, D-alanina y L-alanina (Mahon, Manuselis, & Lehman, 2007) (Cunningham, 2000).

Los EBHA producen dos clases principales de antígenos proteicos, los M y T, los cuales son responsables de la especificidad de tipo en el grupo y son útiles para su tipificación. Los antígenos M son resistentes al calor y a los ácidos, pero son destruidos por la tripsina. Los antígenos T son termoestables y ácido estables, pero son resistentes a la

tripsina. Para la expresión de la proteína M los microorganismos deben crecer en medios que contengan péptidos (Cunningham, 2000).

Para evitar la destrucción de la proteína M por la actividad de las proteinasas, no debe permitirse que el pH disminuya a valores por debajo de 6.5. La tipificación de T es un adyuvante efectivo para la tipificación de M y marcador útil para el control epidemiológico de rutina de todos los aislamientos. Los Antígenos T no están asociados con las vellosidades de la superficie o con la virulencia, los anticuerpos contra los antígenos T no son protectores (Mahon, et al., 2007; Cunningham, 2000).

El factor de opacidad sérico (SOF) es un antígeno proteico sensible a la tripsina con capacidad de opacar al suero de caballo. Es producido por 16 de los serotipos M, es específico de tipo antigénico y ha demostrado ser útil en la tipificación de los EBHA que no pueden tipificarse con el antígeno M. La porción amino-terminal de la proteína M contiene los determinantes antigénicos variables de la especificidad de tipo. Es el principal factor de virulencia de los EBHA y transforma a los microorganismos en resistentes a la fagocitosis. La actividad antifagocítica de la proteína M es atribuida a la interferencia sobre el depósito de componente C3 del complemento sobre la superficie de la célula estreptocócica, por tanto se inhibe la activación de la vía alternativa del complemento y opsonización del estreptococo (Mahon, Manuselis, & Lehman, 2007) (Cunningham, 2000).

3. Determinantes de patogenicidad: Están compuestos por componentes celulares y extracelulares. La adherencia a las células epiteliales de la boca es mediada por el ácido lipoteicoico que se encuentra presente en la pared celular de los EBHA. Es una molécula anfipática y anfótera. Es muy citotóxica para una variedad de células huésped, ha sido identificado como el ligando de la colonización estreptocócica que forma una compleja red con la proteína M y se une por medio de sus fracciones lipídicas a la fibronectina de las células epiteliales (Bailey & Scott, 2002; Cunningham, 2000).

Las paredes celulares de los EBHA pueden reaccionar con la IgG de un modo no inmune similar al de las proteínas de los estafilococos. La pared celular también es un potente activador de la vía alterna del complemento. La presencia de proteína M en la

superficie de la pared celular previene estas reacciones y así explica el rápido reconocimiento y fagocitosis de las cepas M-negativas. La actividad antifagocítica de la proteína M estreptocócica ha sido atribuida a la inhibición del complemento, mediada por la unión del factor H, la proteína sérica que controla la vía alternativa del complemento (Cunningham, 2000).

Muchos EBHA producen una cápsula de ácido hialurónico difusa que imita la sustancia basal de los tejidos animales, ayudando al microorganismo a evitar las defensas fagocíticas del huésped (Bailey & Scott, 2002; Cunningham, 2000).

En *S. pyogenes* existen cuatro nucleasas diferentes desde el punto de vista antigénico (A, B, C y D) que colaboran en la licuefacción del pus y que supuestamente ayudan a generar sustratos para la proliferación. Todas las cepas de *S. pyogenes* producen al menos una nucleasa, en general la enzima B. Las nucleasas A y C poseen solo actividad DNasa, las nucleasas B y D poseen también actividad RNasa y requieren de calcio y magnesio para su actividad óptima (Bailey & Scott, 2002; Cunningham, 2000).

Casi todas las cepas de los EBHA producen dos toxinas hemolíticas y citolíticas, la estreptolisina O y la estreptolisina S, que producen beta-hemólisis alrededor de las colonias en agar sangre (Mahon, et al., 2007).

La estreptolisina O es una proteína inmunogénica monocatenaria liberada al medio de cultivo durante la proliferación. Es lábil al O₂ o activada por tiol, sus efectos biológicos y letales se pierden con rapidez por oxidación. Es inactivada de manera irreversible por el colesterol y esteroides de estructura relacionada. La estreptolisina O inducen una respuesta de anticuerpos brusca (Koneman, et al., 2006) (Mahon, et al., 2007; Cunningham, 2000).

La estreptolisina S es una toxina no antigénica, oxígeno estable que puede extraerse de las células estreptocócicas solo cuando se añade un transportador o un inductor al cultivo o a la suspensión en reposo. Es lítico para glóbulos rojos y blancos y también para otras formas sin pared celular de varias especies. Los efectos líticos son inhibidos por los fosfolípidos, la mayor parte de las cepas de los EBHA producen estreptolisina S

responsable de la hemólisis superficial que se ve en las placas de agar sangre (Mahon, et al., 2007; Cunningham, 2000).

Las exotoxinas pirógenas son también llamadas toxinas eritrogénicas, producidas por cepas lisogénicas de estreptococos. Más del 90% de los EBHA las producen. Se han descritos tres toxinas termolábiles inmunológicamente distintas (A, B y C) en los EBHA y en cepas raras de EBHC y EBHG. Al parecer el efecto principal de la toxina es la fiebre y no la erupción. Las toxinas del tipo C producen aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a las endotoxinas y bacterias ejerciendo su efecto pirético por acción directa del hipotálamo. La antitoxina inyectada produce un blanqueo localizado como resultado de la neutralización de la toxina eritrogénica (Cunningham, 2000).

Entre otros factores de virulencia, se puede mencionar una peptidasa C5a, localizada en la superficie celular, destruye las señales quimiotácticas al eliminar un péptido de seis aminoácidos del carbono terminal del componente C5a del complemento. La pared celular también es un potente activador de la vía alterna del complemento. La presencia de la proteína M en la superficie de la pared celular previene estas reacciones y así explica el rápido reconocimiento y fagocitosis de las cepas M-negativas. La actividad antifagocítica de la proteína M estreptocócica ha sido atribuida a la inhibición del complemento, mediada por la unión del factor H, la proteína sérica que controla la vía alterna del complemento (Cunningham, 2000).

4. Patogénesis: La identidad de la adhesina que permite la adherencia al epitelio respiratorio, vía fibronectina es controversial. El ácido lipoteicoico se localiza en la membrana celular de muchas bacterias. Para el EBHA gran cantidad de ácido lipoteicoico está presente también en las fimbrias del exterior de la célula. Actualmente se sugiere que el ácido lipoteicoico es la adhesina del grupo A, aunque más recientemente se ha sugerido que ese papel lo realiza la proteína F de unión a fibronectina (Anne, Mark, & James, 2005).

El EBHA no es fagocitado en ausencia del fibrinógeno que fija complemento al encontrarse con la lámina de peptidoglicano y en ausencia de anticuerpos. La proteína M, que también se encuentra en las fimbrias se une al fibrinógeno del suero y bloquea la unión

del complemento con la capa mas interna del peptidoglicano. Esto permite la sobrevivencia del microorganismo debido a la inhibición de la fagocitosis. Sin embargo, en individuos que son inmunes, los anticuerpos neutralizantes que reaccionan contra la proteína M causan la fagocitosis misma que resulta en muerte del microorganismo. Este es el mecanismo principal por el cual la inmunidad es capaz de detener las infecciones por EBHA (Cunningham, 2000; Anne, et al., 2005).

Las **vacunas** contra la proteína M son por lo tanto un candidato de importancia que se puede utilizar contra la fiebre reumática. Clásicamente se había considerado que la cápsula del EBHA posee limitada actividad antifagocítica. Muchas de las cepas virulentas recientemente descritas son altamente mucoides y sus cápsulas son importantes en la patogénesis (Anne, et al., 2005).

Desafortunadamente, ciertos tipos de la proteína M presentan reacción antigénica cruzada con proteínas del corazón y esto puede ser responsable de **carditis reumática**. El temor que se tenía de adquirir autoinmunidad lo ha inhibido positivamente el uso de las vacunas contra el EBHA. Sin embargo, distintos epítopes protectores contra aquellos de reacción cruzada ya se han definido y la disponibilidad de una vacuna parece más probable (Anne, et al., 2005).

Las proteínas M varían antigénicamente entre las cepas; por lo tanto la inmunidad contra una proteína M no implica inmunidad general contra todas las cepas de *S. pyogenes*. La tipificación por proteína M junto con otros antígenos (T y R) se usan en la serotipificación (Anne, et al., 2005).

G. Estreptococos del grupo C y G

1. Generalidades: Los EBH de los grupos C y G se presentan comúnmente en la faringe de los humanos, donde adoptan su rol de comensales o patógenos. Informes recientes en la literatura describen a los EBHC y EBHG de Lancefield como agentes importantes, no solo de epidemias de faringitis sino de graves complicaciones sistémicas, como bacteremias, endocarditis o meningitis y en pacientes sanos, como fuente de diseminación como se muestra en el estudio de Romero, *et al* sobre la prevalencia de

estreptococos en la faringe de personal militar, la cual es baja en países con clima templado y alta en países subtropicales y tropicales de los grupos C y G (Tiemstra & Miranda, 2009; Romero, 2002).

Se aíslan de la faringe en el 1.5% de los seres humanos normales. Numerosas epidemias de faringitis causadas por estos se han reportado especialmente en adultos, con menor incidencia en niños, los signos y síntomas de la afección faríngea han sido indistinguibles de los ocasionados por *Streptococcus pyogenes*. Sin embargo, los EBHC y EBHG, a diferencia de los EBHA ocasiona una elevación mayor en los títulos de anti-estreptolisina O (ASO) lo cual ayuda a sospechar de éstos (Tiemstra & Miranda, 2009; Romero, 2002).

Estudios taxonómicos recientes han agrupado a estos en subespecies, por ejemplo, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* que comprende cepas α -hemolíticas y β -hemolíticas, mientras que *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* que son usualmente β -hemolíticas, pueden ser de los grupos A, C, G o L de Lancefield y son más frecuentemente aislados de infecciones en humanos (Tiemstra & Miranda, 2009).

En un estudio de Venezuela en 2001, se encontró que la distribución de EBH aislados de la orofaringe por grupo serológico fue el siguiente: 28 % del grupo B, 19 % de los grupos G y F, 16 % del grupo A, 10 % del grupo C y no agrupables el 5 %. En otro estudio de Paraguay en 2008, se encontró que la frecuencia relativa de los serogrupos encontrada en hisopados faríngeos fue de 59.5 % del grupo A, 31 % del grupo G y 9.5 % del grupo C (Carpinelli, et al., 2008; Romero, 2002).

Además de la clasificación de Lancefield sobre la base del grupo carbohidrato, los EBH pueden distinguirse morfológicamente mediante su capacidad para formar colonias pequeñas o grandes en agar sangre de carnero. Los fenotipos de los EBHA y EBHB formadores de colonias grandes son las especies patógenas *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*. Los fenotipos formadores de colonias grandes de EBHC como *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis* y del EBHG están estrechamente relacionados con los primeros y a menudo se denominan tipo piógenicos debido a que

comparten factores de virulencia como hemolisinas, enzimas extracelulares y proteínas M con *S. pyogenes* (Koneman, et al., 2006; Mahon, et al., 2007).

2. Especies: Entre las especies de los grupos C y G de Lancefield, se puede mencionar a *Streptococcus dysgalactiae*, que incluye la subespecie *equisimilis* y *dysgalactiae*, estos producen mastitis bovina y poliartritis en corderos, así como faringitis en humanos. *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* es la única especie del grupo piogénico que puede no ser beta-hemolítica, y puede pertenecer a los grupos C o L de Lancefield. Posee factores de virulencia similares a *S. pyogenes*, incluyendo la proteína M, mientras que *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* forma parte de la microbiota humana como comensal de los tractos respiratorio, genital e intestinal, y puede ser colonizador de la piel y otras mucosas. Estudios recientes muestran a estas bacterias como causantes de infecciones respiratorias, de la piel y tejidos blandos, e infecciones graves como endocarditis, bacteriemia y meningitis, usualmente con mal pronóstico y se han descrito mayormente en adultos de 21 a 86 años, especialmente en pacientes diabéticos (Davies, MacMillan, & Van Domselaar, 2006; Lopardo, y otros, 2005; Diersken & Taqq, 2000).

Análisis filogenéticos basados en la secuencia rRNA revelan que los EBHC y EBHG están cercanamente relacionados con *S. pyogenes*. La presencia de factores de virulencia similares a los de *S. pyogenes* puede asociarse a infección invasiva importante y posibles secuelas postinfección. Son positivos para las pruebas de hidrólisis de la esculina y arginina y producen ácido a partir de trehalosa y ribosa (Baele, y otros, 2007)

Los *Streptococcus equi*, afectan sobre todo a caballos, en equinos jóvenes produce gurma o papera, rinofaringitis o metritis que induce respuesta inmune específica y no se ha documentado ninguna infección humana. Sin embargo, algunas infecciones humanas causadas por *S. equi* subsp. *zooepidemicus* se han asociado al consumo de productos lácteos contaminados, pero principalmente afecta al ganado bovino. Es difícil de cultivar, no fermentan el sorbitol y se pueden producir vacunas de este (Kuusi, Elina, Virolaine, Vuento, Gindonis, & Huotari, 2006).

En 1986 fue descrito *S. canis*, que pertenece al grupo G de Lancefield y se aísla más frecuentemente en perros, de ahí su nombre. Hay que diferenciarlo de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* del grupo G de Lancefield mediante pruebas fenotípicas (Facklam, 2002).

Los *Streptococcus* del grupo *anginosus* pueden ser beta-hemolíticos y poseer antígenos de Lancefield A, C, G y F. Se pueden identificar erróneamente, si sólo se realiza test de látex para antígenos de Lancefield y no se presta suficiente atención a las características de las colonias tales como tamaño pequeño (< 0,5 mm) y olor a caramelo. Si se dispone de látex para diagnóstico de grupo, aquellos *Streptococcus* que aglutinan como grupo F pueden informarse directamente como grupo *anginosus*, bastaría con hacer la prueba de la β -D-glucuronidasa para diferenciarlos de *S. dysgalactiae* (Braun, y otros, 2004; Caro, Riedel, & García, 2004).

H. Signos y Síntomas

El dolor de garganta es una de las 5 principales razones por las que un paciente visita a su médico. Desafortunadamente, continúa del debate sobre como evaluar y tratar a estos pacientes. Las bases acordadas por la Academia Americana de Médicos de Familia, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades y el Colegio Americano de médicos se centran en algunos criterios para predecir infección por EBHA, los cuales son: fiebre, ausencia de tos, linfadenopatía cervical y exudados faríngeos. Acordando que los pacientes con 0 a 1 criterios, deberían ser examinados, pero no tratados y los pacientes con 2 a 3 criterios, deberían ser examinados y tratados si fuera posible (Villaseñor-Sierra, 2008).

El papel de los EBHC y EBHG como patógenos es controversial. Un estudio en niños encontró que el EBHC puede causar exudados, dolor de garganta y fiebre. Si bien la faringitis por EBHC es común en los adultos, sólo un estudio encontró tasas de fiebre, exudados y adenopatías cervicales similares a los las tasas que se encuentran en los individuos con faringitis por EBHA. Otros estudios han demostrado que los EBHC y

EBHG son causas de otras enfermedades graves, incluyendo sepsis neonatal, neumonía, endocarditis y enfermedades transmitidas por los alimento (Villaseñor-Sierra, 2008).

I. Diagnóstico de laboratorio

Para la toma de la muestra, no es necesario que el paciente esté en ayunas; sin embargo, es preferible tomar la muestra por la mañana cuando el paciente no ha consumido alimentos y no se ha cepillado los dientes, es conveniente dejar pasar 1 a 2 horas para que se vuelva a formar la secreción purulenta que pudo ser deglutida. Debe tomarse siempre antes de iniciar un tratamiento con antibióticos (Anexo 1) (Allón, 2004).

La muestra se debe enviar de inmediato al laboratorio, en un medio de transporte tipo Amies o Stuart, el medio de Todd-Hewitt es un caldo estudiado actualmente, ya que aumenta la producción de hemolisinas estreptocócicas. La adición de agar al medio de Todd-Hewitt facilita el encapsulamiento de los estreptococos y por lo tanto, aumenta su capacidad de supervivencia (Cercenado & Cantón, 2004).

La muestra se inocula inmediatamente en una caja o placa de agar sangre de carnero al 5%; se pueden realizar dos cortadas en el agar durante la siembra. Las cortadas deben ser aproximadamente de 1 cm de largo y el asa debe llegar al fondo de la caja; orientando las cortadas de la orilla de la caja al centro. En este caso no se flamea el asa entre cada estría. El propósito de las cortadas es introducir las bacterias dentro del agar para alejarlas del oxígeno atmosférico y así incrementar la hemólisis tipo beta (Chavez, Livia, Muñoz, Otitiano, & Luján, 2006).

Se introduce la caja en un frasco de vidrio de boca ancha, se coloca en el fondo una toalla de papel húmeda, se coloca la caja con el medio hacia arriba y luego se coloca sobre una tapa de caja de Petri una veladora o candela corta encendida. Se cierra el frasco bien y se sella con masking-tape. La vela se apagará sola, es conveniente aplicar una vez a la semana un poco de cera a la boca del frasco y a la rosca interna de la tapadera, para que selle bien, se incuba por 18 a 24 horas a 37° C. Es indispensable el uso de la jarra con candela y humedad, para obtener reacciones hemolíticas correctas. Si no se usa, la

recuperación de EBH será mucho menor (Anexo 2) (Allón, 2004; Cercenado & Cantón, 2004).

La microbiota de la faringe es sumamente variada; predominan *Streptococcus* sp. alfa-hemolíticos y neisserias no patógenas. Estos grupos bacterianos nunca deben reportarse. Las únicas colonias verdaderamente importantes con aquellas presuntivas de EBH y *S. pneumoniae* (Anexo 3) (Allón, 2004; Cercenado & Cantón, 2004).

J. Pruebas de identificación

Se debe evaluar la morfología microscópica utilizando la tinción de Gram que es una tinción diferencial que debe su nombre al **bacteriólogo danés Christian Gram**, que desarrolló la técnica en **1884**. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose **bacteria gram positivo** a todas aquellas que se visualizan de color violeta, por ejemplo los *Streptococcus* sp. y **bacterias gram negativo** a las que se visualizan de color rosa o rojo (Koneman, et al., 2006; Bailey & Scott, 2002; Mahon, Manuselis, & Lehman, 2007).

Los estreptococos en agar sangre de carnero al 5% presentan colonias beta hemolíticas circulares, translúcidas o transparentes y de superficie lisa o mate, con borde entero y un diámetro variable de 0.3 a 0.5 mm. El tamaño de la zona de hemólisis es de dos a tres veces el diámetro de la colonia o en algunas cepas es de menor tamaño (Chavez, Livia, Muñoz, Otitiano, & Luján, 2006).

Entre las pruebas bioquímicas para identificarlos se encuentran las siguientes: Acidificación de azúcares (ribosa, arabinosa, manitol, sorbitol, lactosa trehalosa, nulina, rafinosa, almidón, glucógeno), Beta-Galactosidasa, Beta-Glucorinadasa, Bilis Esculina, Catalasa, Hidrólisis del Hipurato, Hidrólisis del Pirronidonil Beta Naftilamida (PYR), Leucina Aminopeptidasa, Prueba de CAMP, Sensibilidad a la Bacitracina (Taxo A), Sensibilidad a la Optoquina (Taxo P), Sensibilidad al Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) y Voges-Proskauer (Anexo 4) (Mahon, et al., 2007; Gini Aguilera, 2007).

Las técnicas más usadas para la identificación de serotipos son las pruebas serológicas, las cuales son utilizadas en epidemiología para evaluar la distribución de diferentes serotipos, así como la vigilancia de brotes de infecciones asociadas a EBHA. Estas técnicas se basan en la unión visible y en algunos casos cuantificables de un antígeno tal como la proteína M, T, R o el SOF de EBHA con anticuerpos presentes en un antisero serotipo específico. Esta técnica requiere la extracción del antígeno de interés a partir de colonias puras de un cultivo y su mezcla con los antiseros específicos de referencia (Koneman, et al., 2006; Bailey & Scott, 2002; Mahon, et al., 2007).

La tipificación de *S. pyogenes* con base en la proteína M es la más usada y depende de la variabilidad antigénica de la región N-terminal de la misma. Los mecanismos para que sea producida esta variabilidad pueden generarse por recombinación homóloga, mutaciones de inserción de nucleótidos y otros mecanismos que puedan afectar el gen *emm* que codifica para la expresión de la proteína M (Bailey & Scott, 2002; Mahon, et al., 2007).

La secuencia de aminoácidos de esa región y su reconocimiento por anticuerpos específicos son la base para la identificación de diferentes serotipos, de los que han reconocido alrededor de 80. Para este propósito se realizan ensayos de inmunoprecipitación en portaobjetos, usando microprecipitación en capilares sin heparina o mediante inmunodifusión en gel de agarosa (Mahon, et al., 2007).

Actualmente, se utilizan varias pruebas no serológicas como la citometría de flujo, que es un método importante para investigación biomédica que puede ser utilizado para el diagnóstico de infecciones estreptocócicas, por medio de anticuerpos fluorescentes dirigidos contra el polisacárido específico de grupo, en donde las células y bacterias de la faringe son transportadas e impulsadas por el flujo de una solución isotónica hasta el punto de medición o cámara de flujo, la cual separa en forma individual las células, que pasan a través de un haz luminoso láser que provoca la excitación de los marcadores fluorescentes unidos a cepas con el polisacárido específico de grupo. Esto desencadena una emisión de luz en cada una de las células de *S. pyogenes* que las identifica (Mahon, Manuselis, & Lehman, 2007).

Una de las técnicas más rápidas para la identificación de EBHA, se basa en un cambio en la reflexión de la luz, ocasionado por la unión del antígeno (polisacárido C) con su anticuerpo específico inmovilizado en una placa de silicón; este método de inmunoensayo óptico es altamente sensible y específico para identificación de EBHA (Mahon, et al., 2007).

En la última década las técnicas más usadas para la identificación de patógenos asociados a infecciones invasivas son las pruebas moleculares como la hibridación in situ por fluorescencia, este método utiliza sondas de DNA diseñadas para la identificación de fragmentos de rRNA específicos de *S. pyogenes*. El uso de esta técnica ha sido exitosa en la identificación directa de cepas de pacientes con enfermedades invasivas en las 3 horas posteriores a la toma de la muestra, lo que ayuda a tomar una rápida decisión terapéutica (Salyers & Whitt, 2002).

Quimioluminiscencia es otro método para identificar cepas de estreptococos y se basa en la hibridación de ácidos nucleicos para detectar una secuencia única de RNA ribosomal extraída directamente de hisopados faríngeos. La hibridación ocurre entre una secuencia de DNA marcada con un ester de acridina y la secuencia de rRNA procedente de la muestra. El híbrido DNA-RNA es identificado y cuantificado en unidades relativas de luz por un luminómetro, cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de hibridación ocurrida (Salyers & Whitt, 2002).

Un método que permite la identificación de grupo y la tipificación en clonas de EBHA, es la ribotipificación, que se basa en la detección y análisis de la fracción 16s del RNA ribosomal que es codificada por un gen común presente en todas las bacterias (gen 16s rDNA) (Salyers & Whitt, 2002).

La tipificación con base en el gen de la proteína M, depende del gen *emm* de *S. pyogenes* que codifica para la expresión de la proteína M, que posee una región conservada y una hipervariable. La región hipervariable contiene la fracción de la proteína M responsable del serotipo, por tanto el uso de técnicas para secuenciar, hibridar, amplificar o digerir la fracción del gen *emm* que expresa esta región permite conocer no sólo su

correspondencia con el serotipo M de cualquier cepa, sino identificar clonas dentro del mismo serotipo (Salyers & Whitt, 2002).

Por último, existe también el uso de pruebas automatizadas como el sistema API[®] 20 Strep que es un sistema estandarizado que asocia 20 ensayos bioquímicos de un gran poder discriminante. Permite realizar un diagnóstico de grupo o por especie de la mayoría de los estreptococos, se compone de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas o de fermentación de azúcares. Los ensayos enzimáticos se inoculan con una suspensión densa realizada a partir de un cultivo puro que reconstituye los medios. Las reacciones que se producen durante el período de incubación se traducen en variaciones de coloración espontánea o revelada mediante la adición de reactivos (Biomerieux, 2005).

Otro sistema basado en un principio de fotometría-fluorometría, es MicroScan[®], que puede procesar paneles congelados o deshidratados. Los paneles cromogénicos convencionales son usados para la identificación de bacterias gram negativo y gram positivo, entre estas *Streptococcus* sp. en 18-24 horas con disponibilidad de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para la determinación de concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) con puntos de corte de sensibilidad establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Mahon, et al., 2007).

Otro sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana es Vitek[®], el cual se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por la CLSI (Vargas, Vila, & Lanza, 2005).

K. Patologías relacionadas con infecciones por *Streptococcus* sp.

La mayoría de las infecciones por EBH producen enfermedades relativamente leves como faringitis. Sin embargo, en ciertas ocasiones estas bacterias pueden provocar

enfermedades mucho más graves y que pueden poner en peligro la vida, como la fiebre reumática o glomerulonefritis (Carranza-Martinez, Valdez Croda, Jaspersen, & Villaseñor-Sierra, 2007).

1. Faringitis: La faringitis es una de las infecciones agudas de las vías respiratorias por la que más consultas otorgan los médicos del primer nivel de atención en todo el mundo. Aunque la mayor parte de las faringoamigdalitis agudas (80 %) es ocasionada por un agente viral, *Streptococcus pyogenes* es la causa más común de infección bacteriana. En un estudio mexicano, se identificó microbiota normal en 79.8 % de los pacientes, EBHA en 15 % y EBH no A no B en el 5.2 % de los casos. Entre los síntomas y signos asociados de manera significativa, hubo asociación para odinofagia, escalofrío, dolor en ganglios del cuello; y se identificaron como protectores la tos y los síntomas nasales. Entre los signos, hubo asociación entre amígdalas con exudado, adenopatía cervical anterior dolorosa y aliento fétido (Carranza-Martinez, et al., 2007).

La faringitis bacteriana aguda causada por los EBH, es una enfermedad frecuente, tanto en la asistencia primaria como en la práctica hospitalaria. En la práctica diaria se acostumbra asociar faringoamigdalitis con infección estreptocócica, lo cual no siempre es correcto. Si bien el EBH es el agente bacteriano más frecuente, la gran mayoría de las faringitis son de etiología vírica. El tratamiento no siempre es el adecuado, ya que es difícil establecer un diagnóstico etiológico. En la práctica la faringitis estreptocócica debe tratarse con antibióticos, por lo tanto su diagnóstico correcto y precoz es indispensable, a fin de evitar la diseminación de la infección y las complicaciones como fiebre reumática y glomerulonefritis (Carranza-Martinez, et al., 2007).

2. Fiebre reumática: La fiebre reumática es un padecimiento inmunológico sistémico que se presenta como consecuencia de una infección por una bacteria de la familia de los estreptococos, que puede provocar una deformación progresiva y lenta de las válvulas o se puede curar espontáneamente. Es más frecuente entre los 5 y 15 años de edad y es rara antes de los 4 años y después de los 40. La lesión característica es una reacción granulomatosa perivascular con vasculitis. La válvula mitral es atacada en un 75 a 80% de

los casos, la aórtica en 30% y las válvulas tricúspide y pulmonar en menos del 5% (Berkow, Beers, & Fletcher, 2010).

Los síntomas de la fiebre reumática se dividen en criterios mayores y menores. Entre los primeros se pueden mencionar la carditis y la artritis.

La carditis es más probable que se observe en niños y adolescentes y se caracteriza por pericarditis, cardiomegalia, insuficiencia cardíaca derecha o izquierda, la primera es más notable en niños por la ingurgitación hepática dolorosa por regurgitación tricúspidea, soplos mitrales o aórticos por regurgitación, puede existir el soplo mitral corto y mesodiastólico de Carrey-Coombs. En caso de no encontrar los signos anteriores bien definidos, el diagnóstico de carditis se establece con las siguientes anomalías menos específicas: anomalías electrocardiográficas, ruidos cardíacos que cambian de calidad, taquicardia sinusal que persiste durante el sueño y aumenta de manera notable durante la actividad ligera y arritmias (Berkow, et al., 2010).

La artritis ataca a las grandes articulaciones secuencialmente y es una poliartritis migratoria, en adultos puede atacar solo una articulación. Este signo en su forma aguda suele durar de 1 a 5 semanas y remite sin dejar deformidades (Berkow, et al., 2010).

Por otro lado, los criterios menores incluyen: fiebre, poliartralgias, índice de sedimentación eritrocitaria acelerado, antecedentes de infección por EBH o antecedentes de fiebre reumática (Berkow, et al., 2010).

3. Glomerulonefritis post-estreptocócica: Es un trastorno renal que involucra la inflamación de los glomérulos después de que se ha presentado una infección por ciertas cepas de estreptococos, es una forma poco común de **glomerulonefritis**. Es el resultado de una infección, no en los riñones, sino en un lugar apartado como la piel o la faringe (Berkow, et al., 2010).

Como consecuencia de los inmunocomplejos formados a partir de **antígenos** estreptocócicos, **anticuerpos** y el **complemento** quedan atrapados en los glomérulos de los

riñones, dichos glomérulos se inflaman, lo cual ocasiona filtración y excreción renal insuficiente (Berkow, et al., 2010).

Puede haber proteína y sangre en la orina y comúnmente acumulación excesiva de líquido en el cuerpo. Generalmente, se presenta **hipertensión**. Esta afección es poco común hoy en día debido a que las infecciones que pueden hacer a una persona vulnerable a la enfermedad comúnmente son tratadas con antibióticos. La glomerulonefritis post-estreptocócica se puede desarrollar en 1 ó 2 semanas después de una infección en la garganta no tratada o de 3 a 4 semanas después de una infección cutánea y puede ocurrir en personas de cualquier edad, especialmente en niños entre 6 y 10 años. Aunque las infecciones de piel y de garganta son frecuentes en niños, la glomerulonefritis post-infecciosa es una rara complicación de estas infecciones (Berkow, et al., 2010).

L. Tratamiento

La utilización racional de los antibióticos tiene hoy una relevancia significativa en términos de asegurar un tratamiento adecuado al enfermo y minimizar la selección de resistencia en las poblaciones bacterianas. Aproximadamente un tercio de las prescripciones de antibióticos se utilizan para el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio superior y bronquitis (Lan & Colford, 2000).

El objetivo principal del tratamiento es eliminar al EBH para acortar el período de enfermedad y evitar las complicaciones. El antibiótico de elección es la penicilina por vía oral o intramuscular. En casos de alergia la alternativa son los macrólidos, aunque la eritromicina puede tener mala tolerancia digestiva. La preferencia por los macrólidos tiene a favor la actividad de claritromicina y azitromicina contra *S. pyogenes*, y microbiota anaerobia faríngea, a lo que se suma la comodidad de su administración oral. Está documentada la emergencia de cepas de *S. pyogenes* resistentes a los macrólidos en un 2 a 3% de los casos (Lan & Colford, 2000).

Se han observado recurrencias y fallas en el tratamiento de faringitis estreptocócicas con penicilina, lo que se atribuye a varios factores: no cumplimiento del tratamiento, mala

absorción de la droga, persistencia del microorganismo en las criptas amigdalinas, defectos inmunológicos, producción de beta-lactamasa por otras bacterias de la orofaringe (*H. influenzae*, *M. catarrhalis*, bacterias anaerobias), que inactivan a la penicilina. En esta última situación resultan eficaces: amoxicilina/ácido clavulánico, cefuroxime-axetil o clindamicina (Lan & Colford, 2000; Altamimi, Khalil, Milner, & Pusic, 2009).

M. Prevención

El contagio de todos los tipos de infecciones por EBH puede disminuirse por medio de un buen lavado de manos, especialmente después de toser o estornudar, antes de preparar comidas y después de comer. Quienes sufren dolor de garganta deberán consultar a un médico que pueda realizarles exámenes para determinar si tienen estreptococos colonizando la orofaringe. En caso afirmativo, la persona en cuestión no debe asistir al trabajo, al colegio o la guardería sino hasta después de 24 horas o más de haber tomado un antibiótico. Todas las heridas deben mantenerse limpias. Además, es necesario vigilar las heridas para detectar posibles síntomas de infección, entre los que se cuentan coloración roja en aumento, hinchazón y dolor en el lugar de la herida (Altamimi, et al., 2009).

N. Epidemiología

Los EBH colonizan normalmente la orofaringe de los niños sanos y de los adultos jóvenes. Aunque se considera que la incidencia del estado de portador es del 15 al 20%. Se necesitan técnicas de cultivo muy selectivas para detectar un pequeño número de microorganismos en las secreciones orofaríngeas. Además, se había asumido que la colonización con EBHA era sinónimo de la colonización con *S. pyogenes*. Sin embargo ahora se conoce que otros EBH pueden estar presentes en la orofaringe como el EBHC y EBHG (Gianelli & Posse, 2007).

La colonización con *S. pyogenes* es transitoria, regulada tanto por la capacidad de la persona para desarrollar una inmunidad específica frente a la proteína M de la cepa colonizadora, como a la presencia de microorganismos competitivos en la orofaringe. Los pacientes no tratados producen anticuerpos frente a la proteína M bacteriana específica, lo

que puede dar como resultado una inmunidad que dure toda la vida; sin embargo, en los pacientes tratados, esta respuesta de anticuerpos está disminuida. Las bacterias como los estreptococos alfa-hemolíticos y no hemolíticos son capaces de producir unas sustancias de tipo anticuerpo conocidas como bacteriocinas, que suprimen el crecimiento de los EBHA. En general la enfermedad con *S. pyogenes* está producida por cepas de adquisición recientes que causan una infección de la faringe o de la piel antes de que se produzcan anticuerpos específicos o de que sean capaces de proliferar los microorganismos competitivos (Berkow, et al., 2010; Gianelli & Posse, 2007).

La faringitis producida por *S. pyogenes* es una enfermedad fundamentalmente de niños entre 5 y 15 años, aunque los lactantes y los adultos también son susceptibles. El patógeno se extiende de persona a persona a través de gotitas respiratorias. El hacinamiento, como en el caso de las aulas y las guarderías, aumenta las oportunidades que tiene el microorganismo de diseminarse, fundamentalmente en los meses de invierno. Las infecciones de los tejidos blandos, por ejemplo hipoderma, erisipela, celulitis y fascitis, se ven producidas por una colonización inicial de la piel con EBHA, después de la cual los microorganismos se introducen en los tejidos superficiales o profundos a través de una solución de continuidad en la piel (Berkow, et al., 2010; Gianelli & Posse, 2007).

O. Estudios recientes

Estudios en varios países, revelan que en los últimos tiempos se ha incrementado la frecuencia de EBH, así es el caso de un estudio en Asunción, Paraguay, en el cual se encontró que la frecuencia de aislamientos de EBH, en cultivos de garganta fue de 13.9%. Esta frecuencia fue similar en niños y adultos 12,6% y 14,2% respectivamente. Durante el periodo de estudio se realizaron 303 cultivos de hisopados faríngeos, 128 correspondieron a niños (62 mujeres y 66 hombres) y 175 a adultos (97 mujeres y 78 hombres). El rango de edad de los niños fue de 1 mes a 18 años y el de los adultos de 19 años a 89 años. Cuarenta y dos cultivos (13,9%) resultaron positivos para EBH, de los cuales 25 (8,3%) fueron identificados como EBHA, 4 (1,3%) EBHC y 13 (4,3%) EBHG (3) (Bisno, 2001) (Amorth, 2005; Aguirre, 2008).

Esa frecuencia fue relativamente baja cuando se compara con otros estudios realizados en Latinoamérica, como el reportado por Villar y col., realizado en un laboratorio de Buenos Aires, Argentina, donde encontraron en un periodo de 5 años, prevalencias que oscilaban entre 25% a 42%. Reportaron 95 infecciones por EBH, de las cuales 68 fueron identificados como *Streptococcus pyogenes*, 7 como *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* del grupo C y 20 como *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* del grupo G (González-Lama, González, & Lupiola, 2000).

La prevalencia EBH en pacientes con faringoamigdalitis aguda, también se estudió en un hospital de la ciudad de Champoyas, Amazonas en Perú, en un artículo publicado en el 2008 por la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, el cual describe la evaluación de 148 muestras de pacientes de diferentes edades, con la identificación de varios patógenos, incluyendo cultivos positivos de EBHC (Zaoutis, 2004).

En el departamento de pediatría de la Universidad de Medicina Jefferson en Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos, se documentaron epidemias de faringitis aguda en niños, causadas por EBHC y EBHG durante el año 2004, en el que se estudió en un período de 1 año a 2085 niños de 6 meses a 18 años que se presentaron a la emergencias del hospital con síntomas del tracto respiratorio, se incluyeron también 194 niños controles sin síntomas. En general, las tasas de aislamiento de todos los grupos de EBHC y EBHG fue de 17.7% de los pacientes del estudio y el 9.8% de niños controles, detectados como portadores de estos, por otro lado, los EBHA fueron aislados e identificados en un 21.8% en los niños con faringitis y en el 14.9% de los niños control clasificados como portadores (Zaoutis, 2004).

IV.JUSTIFICACIÓN

Los EBHA según la clasificación de Lancefield, constituyen la causa bacteriana más común de faringitis aguda, se ha considerado en un 15 al 30 % de los casos en niños y en un 5 al 10 % de los casos en adultos; sin embargo, los EBHC y EBHG también pueden provocar casos de faringitis que simulan ser ocasionadas por EBHA pero que son generalmente menos severas.

El incremento en la prevalencia de EBHC y EBHG en otros países sugiere un esfuerzo para su correcta identificación, especialmente para mejorar el tratamiento en aquellos pacientes con aislamientos de EBH no pertenecientes al grupo A. La importancia de la correcta identificación y caracterización de serogrupos y especies entre los EBH radica en evitar las secuelas supurativas y no supurativas que como consecuencia trae esta infección al pasar los años (Villar, et al., 2005; Amorth, 2005).

En Guatemala no existen datos registrados sobre la frecuencia de los grupos C y G como agentes etiológicos de faringitis, solamente del grupo A, por lo que se debe llevar a cabo la identificación de todas las especies y serogrupos de estos grupos en forma rutinaria para su correcto diagnóstico y tratamiento, así como la determinación de susceptibilidad y resistencia antibiótica.

En el laboratorio donde se procesarán las muestras, que es un laboratorio que utilizan múltiples laboratorios guatemaltecos para referir sus cultivos de garganta, se ha observado un incremento en el aislamiento de los EBH diferentes al grupo A, por lo que después de observar la literatura reciente, surgió el interés de estudiar y diferenciar los distintos grupos y serogrupos de *Streptococcus* no comúnmente identificados.

Por lo que con este estudio, se obtendrán datos para determinar la frecuencia de EBHC y EBHG, incluyendo especie y serogrupo que están causando actualmente enfermedades del sistema respiratorio superior en la población guatemalteca, sin importar edad o género, incluyendo su susceptibilidad antibiótica y con esto aportar datos a la epidemiología del país sobre la existencia de *Streptococcus* beta-hemolíticos de los grupos C y G de Lancefield en nuestro país. Por lo general, los médicos tratantes piensan que en Guatemala los estreptococos beta-hemolíticos de otros grupos no existen y no son importantes. De tal manera dando a conocer los hallazgos de este estudio permitirá que se tomen en cuenta los aislamientos de estos estreptococos beta-hemolíticos.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Establecer la frecuencia de grupos y especies de *Streptococcus* beta-hemolíticos en cultivos de garganta referidos a un laboratorio de la ciudad capital de Guatemala.

B. Objetivos Específicos

1. Determinar la frecuencia de grupos establecidos mediante la triada de pruebas presuntivas (taxo A, taxo SXT y CAMP).
2. Determinar la frecuencia de *Streptococcus* beta-hemolíticos de los serogrupos A, C, y G de Lancefield provenientes de orocultivos.
3. Establecer la frecuencia de las especies de los *Streptococcus* beta-hemolíticos de los grupos C y G de Lancefield (*S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* y *equisimilis*) en orocultivos.
4. Determinar la frecuencia de edad y género de los pacientes con cultivos de garganta positivos, según especie de *Streptococcus* beta-hemolíticos.

VI. HIPÓTESIS

No se fórmula hipótesis por ser un estudio descriptivo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo y Muestra

1. Universo

Todos los exudados faríngeos (2,023) de pacientes de ambos sexos, sin límites de edad, recolectados en el periodo comprendido de septiembre del 2010 a agosto del 2011.

2. Muestra

Los cultivos de garganta con crecimiento positivo de colonias beta-hemolíticas (273) presuntivas de *Streptococcus* sp.

B. Recursos Humanos

1. Tesista

Cinthia Lucía Ovando Monzón

2. Asesores

Dr. Gustavo Gini

Licenciado Martín Gil

C. Materiales

1. Equipo

- Asas bacteriológicas
- Cabina de seguridad biológica nivel II
- Dispensador de taxos
- Estereoscopio

- Gradillas
- Incubadora a 37°C
- Jarra con candela
- Lámpara
- Mechero de Bunsen
- Mesa de trabajo
- Microscopio
- Refrigeradora
- Sillas

2. Materiales y Reactivos

- Aceite de inmersión
- Agar Mueller Hinton con sangre de carnero al 5%
- Agar sangre de carnero al 5%
- Alcohol acetona
- Alcohol al 70%
- Api[®] 20 *Strep*
- Caldo Tripticasa Soya
- Cepa de *S. agalactiae* ATCC 13813
- Cepa de *S. aureus* ATCC 25923
- Cepa de *S. pyogenes* ATCC 19615
- Cristal violeta
- Estándar de Mc Farland al 4%
- Fósforos
- Gas propano
- Hisopos
- Hojas
- Lapiceros

- Lugol
- Marcador
- Medio de Transporte Stuart
- Papel parafilm
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Portaobjetos
- Safranina
- Solución salina
- Taxo A (Bacitracina)
- Taxo AMC (Amoxicilina-ácido clavulánico)
- Taxo AML (Amoxicilina)
- Taxo AMP (Ampicilina)
- Taxo AZM (Azitromicina)
- Taxo CEC (Cefaclor)
- Taxo CFR (Cefadroxilo)
- Taxo CLR (Claritromicina)
- Taxo DA (Clindamicina)
- Taxo E (Eritromicina)
- Taxo P (Penicilina)
- Taxo SXT (Trimetropim-sulfametoxazol)
- Kit comercial de antisueros para *Streptococcus*.

D. Métodos

Con la finalidad de establecer la frecuencia de grupos y especies de *Streptococcus* beta-hemolíticos en cultivos de garganta en la ciudad de Guatemala, se recolectaron todas las muestras de exudados faríngeos para cultivos de garganta sin distinción de edad o género del paciente, de 50 laboratorios diferentes que refieren sus muestras de bacteriológicas a un laboratorio clínico biológico de la ciudad capital de Guatemala.

1. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio en medio Stuart, y sembradas en un máximo de 30 minutos posteriores a su llegada a las instalaciones del laboratorio.
2. Las muestras fueron sembradas en cajas de agar sangre de carnero al 5 % (anexo 5), e incubadas a 37 °C, dándoles un seguimiento de 48 horas en una atmósfera de 5 % de CO₂ en jarra con candela.
3. Coloración de Gram: a todas las colonias que presentaron beta-hemólisis se les realizó como primer paso la coloración de Gram; en la cual observó bacterias de forma cocoide gram positivo (Cisternas, 2007).
4. Prueba de catalasa: Se le realizó la prueba de catalasa; para lo cual se colocó una gota de H₂O₂ al 3% (Peroxal® de Merck) sobre un portaobjetos y luego se transfirió una porción de colonia beta-hemolítica sobre el H₂O₂, el desprendimiento de burbujas se consideró una prueba positiva (Gini Aguilera, 2007).
5. Sensibilidad a la Bacitracina y al Trimetoprim/Sulfametoxazol. A las colonias que fueron catalasa negativo se les realizó las pruebas de sensibilidad a la Bacitracina (Taxo A) y Trimetoprim/Sulfametoxazole (Taxo SXT), así como la prueba de CAMP, para la identificación presuntiva de grupo. Las dos primeras pruebas se llevaron a cabo sembrando un inóculo, tomado con asa bacteriológica una colonia beta hemolítica de un cultivo puro, que se estrió sobre media placa de agar sangre en varias direcciones intentando obtener un cultivo confluyente, luego se colocó el Taxo A separado del Taxo SXT y se incubó de 18-24 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ del 5% al 10%. La aparición de cualquier diámetro de halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco se consideró prueba positiva (Gini Aguilera, 2007).
6. Prueba de CAMP: Para realizar esta prueba se estrió una colonia de EBH en forma perpendicular a una estría de un *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 productor de β-lisina, en la otra mitad de agar sangre se sembró un control de *Streptococcus agalactiae* ATCC 1381, con una estría perpendicular opuesta

a la de la colonia beta hemolítica. Se incubó de 18-24 horas a 37°C. La prueba positiva se consideró por la presencia de una zona de potenciación de la hemólisis en forma de puntas de flecha en el lugar donde se contactan las dos estrías (Gini Aguilera, 2007).

7. Pruebas confirmatorias: Todos los cultivos resistentes al Taxo A, susceptibles al Taxo SXT y prueba de CAMP negativa, se procesaron en el sistema API[®] 20 *Strep* para llegar a la especie bacteriana y se comprobó el grupo de Lancefield al que pertenece la cepa, por medio de aglutinación con la ayuda de un kit comercial de antisueros para *Streptococcus* (Salyers & Whitt, 2002).
8. Controles: Se utilizaron como controles para el sistema API[®] 20 *Strep* y para el kit de antisueros, las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 (Biomérieux, 2005).
9. AP^I[®] 20 *Strep*:

Se realizó un sub-cultivo de las colonias de EBH puro. Luego, dentro de un tubo con 2mL de agua desmineralizada estéril, se llevó a cabo una suspensión similar al estándar de Mc Farland al 4% (Biomérieux, 2005).

Se preparó la galería agregando agua a cada pozo en el fondo de la cámara de incubación y se colocó esta por dentro, primero se llenó la mitad de la galería API[®] 20 *Strep* agregando 100µL de suspensión en cada cúpula que contiene los substratos deshidratados para llevar a cabo las reacciones bioquímicas, las cuales fueron:

VP	Vogues Proskauer
HIP	hidrólisis del hipurato
ESC	bilis esculina
PYRA	pirolidonil arilamidasa
α-GAL	alfa-galactosidasa
β-GUR	beta-glucoronidasa
β-GAL	beta-galactosidasa

PAL	fosfatasa alcalina
ADH	arginina dihidrolasa

El ADH, se llenó únicamente la sección del tubo, para llenar la segunda mitad de la galería se abre una ampolla de API GP Medium y se transfirió el resto de la suspensión bacteriana, se homogenizó y se llenó las cúpulas siguientes:

RIB	Ribosa
ARA	Arabinosa
MAN	Manitol
SOR	Sorbitol
LAC	Lactosa
TRE	Trehalosa
INU	Inulina
RAF	Rafinosa
AMD	Almidón
GLI	Glicógeno

Luego, se colocó una gota de aceite mineral a cada uno de los tubos, creando un menisco convexo, se colocó la tapadera y se incubó a 37°C, a las cuatro horas de incubación, se observó si hubo cambio de color en los microtubos de los azúcares, y si no hubo cambio de color, se esperó hasta las 24 horas de incubación (Biomerieux, 2005).

Una vez transcurridas las 24 horas de incubación se agregó los reactivos a los microtubos correspondientes, una gota de KOH 40% (VP1) y una de α -naftol (VP2) al microtubo de VP, una gota de ninhidrina al microtubo de HIP y una gota de ZYM A más una gota de ZYM B desde PYRA hasta LAP, y se procedió a leer por medio de un software (Biomerieux, 2005).

10. Antibiógrama: Por último, se realizó el antibiógrama respectivo para *Streptococcus* sp., tal y como lo sugieren las tablas de la NCCLS y utilizando la técnica de difusión de discos, utilizando los taxos de: amoxicilina-ácido clavulánico, amoxicilina, ampicilina, azitromicina, cefaclor, cefadroxilo, claritromicina, clindamicina, eritromicina y penicilina (Werner, 2010).

E. Diseño de la investigación

1. Tipo de muestreo: El número de muestra fue por conveniencia ya que se incluyó en el estudio todas las muestras de exudado faríngeo durante los meses de septiembre del 2010 a agosto del 2011, en un total de 2,023 muestras.
2. Tipo de estudio: El estudio es de carácter descriptivo
3. Análisis de datos: Los datos se analizaron por medio de tablas comparativas según la cantidad de muestras sembradas por mes del estudio, de los resultados de las pruebas presuntivas de grupo, cálculos de porcentajes obtenidos de los diferentes grupos y especies de *Streptococcus* beta-hemolíticos, proporcionando la frecuencia absoluta de especies, grupos y serogrupos de todos los EBH aislados, así como su frecuencia relativa por medio del cociente entre la frecuencia absoluta y el tamaño de la muestra final, resistencia a los antibióticos estudiados y comparaciones según su clasificación por rango de edad y género del paciente, con la ayuda del software de Microsoft Office Excel 2007.

VIII. RESULTADOS

En el período de un año (septiembre 2010 hasta agosto 2011), se procesaron y analizaron muestras de exudados faríngeos, de muestras provenientes de 50 laboratorios clínicos distintos de Guatemala, que refirieron sus cultivos microbiológicos a un laboratorio privado de referencia de la ciudad de Guatemala. Durante este período se recibieron un total de 2,023 muestras.

De las 2,023 muestras, se reportaron aislamientos negativos (sin crecimiento de colonias beta-hemolíticas) en 1,762 muestras y de crecimiento positivo con presencia de colonias beta-hemolíticas en 273 muestras. En la tabla 1 se describen los cultivos totales por cada mes y año, así como el número de aislamientos negativos y positivos de colonias beta-hemolíticas obtenidas. La frecuencia de cultivos con crecimiento de colonias beta-hemolíticas fue del 14%, de las cuales el 97.44% (266) de las colonias beta-hemolíticas crecieron en las primeras 24 horas de incubación, mientras que el 2.56% (7) crecieron hasta las 48 horas incubación.

Tabla 1. Cantidad de muestras sembradas por mes y año del estudio y cantidad de resultados negativos y positivos de crecimiento de colonias beta-hemolíticas.

Año	2010				2011								
Mes	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	TOTAL
Muestras	172	167	178	124	128	136	139	157	228	195	215	184	2023
Cultivos Negativos	150	149	153	107	113	117	113	133	201	177	189	160	1762
Cultivos Positivos	22	18	25	17	15	19	26	24	27	25	26	29	273
Frecuencia de Positivos en %	13	11	14	14	12	14	19	15	12	13	12	16	14

Fuente: Datos experimentales

La determinación de grupo según Lancefield se realizó por medio de la triada de pruebas presuntivas cuyos resultados se muestran en la tabla 2, en donde se observa que el 24% (65) resultaron ser sensibles al taxo A, resistentes al taxo SXT con prueba de CAMP negativa; datos que clasifican a los *Streptococcus* presuntivamente en el grupo A. Por otro lado, el 11% (30) mostraron susceptibilidad a ambos taxos y el 65% (178) resultaron ser

resistentes al taxo A y susceptibles al taxo SXT, ambos casos con prueba de CAMP negativa, fueron clasificados como *Streptococcus* del grupo No A, No B de Lancefield.

Tabla 2. Frecuencia de grupo según triada de pruebas presuntivas (n = 273).

TAXO A	TAXO SXT	CAMP	CANTIDAD	FRECUENCIA	GRUPO
S	R	Negativo	65	24%	A
S	S	Negativo	30	11%	No A, No B
R	S	Negativo	178	65%	No A, No B

S = Susceptible, R = Resistente

Fuente: Datos experimentales

De las 273 colonias beta-hemolíticas aisladas y luego de realizadas las pruebas presuntivas, se encontró por medio del sistema API® 20 Strep que el 98% pertenecían al género *Streptococcus* y el 2% al género *Enterococcus*, datos que se muestran en la tabla 3. Siendo el *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis* el microorganismo más frecuentemente aislado en un total de 178 (65%), seguido del *Streptococcus pyogenes* con 65 (24%) aislamientos y otras especies con menor frecuencia: *Streptococcus constellatus* 13 (5%), *Streptococcus intermedius* 8 (3%), y *Streptococcus agalactiae* 3 (1%).

Tabla 3. Frecuencia de especies de *Streptococcus* beta-hemolíticos aislados (n = 273).

Colonias beta-hemolíticas	Año	2010					2011							Total	Frecuencia
	Mes	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago		
<i>Streptococcus pyogenes</i>		3	5	6	4	4	6	5	4	7	8	5	8	65	24%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i>		16	10	16	9	10	10	20	18	19	14	16	20	178	65%
<i>Streptococcus agalactiae</i>		-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1%
<i>Streptococcus constellatus</i>		2	-	1	2	1	1	1	1	-	1	2	1	13	5%
<i>Streptococcus intermedius</i>		1	-	-	2	-	1	-	1	1	2	-	-	8	3%
<i>Enterococcus faecalis</i>		-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	3	1%
<i>Enterococcus faecium</i>		-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	3	1%

Fuente: Datos experimentales

Según la tipificación serológica de grupo mediante aglutinación mostrada en la tabla 4, se encontró que el grupo más frecuentemente aislado fue el grupo C con 110 (40.65%)

aislamientos, seguido del grupo G con 77 (28.56%) aislamientos; ambos casos incluyeron a las especies de *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *constellatus* e *intermedius*. Seguidos del grupo A con 65 (24.17%) aislamientos en el cual la única especie perteneciente fue *Streptococcus pyogenes*. También se encontró en menor frecuencia al grupo F 12 (4.43%), D 3 (1.1%) y B 3 (1.09%).

Tabla 4. Frecuencia de serogrupos mediante aglutinación (n = 273).

Colonias beta-hemolíticas	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo F	Grupo G	NO AGLUTINÓ
<i>S. pyogenes</i> (65)	65 (24.17%)	-	-	-	-	-	-
<i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> (178)	-	-	105 (38.46%)	-	-	73 (26.74%)	-
<i>S. agalactiae</i> (3)	-	3 (1.09%)	-	-	-	-	-
<i>S. constellatus</i> (13)	-	-	4 (1.46%)	-	7 (2.56%)	2 (0.73%)	-
<i>S. intermedius</i> (8)	-	-	1 (0.37%)	-	5 (1.87%)	2 (0.73%)	-
<i>E. faecalis</i> (3)	-	-	-	2 (0.73%)	-	-	1 (0.37%)
<i>E. faecium</i> (3)	-	-	-	1 (0.37%)	-	-	2 (0.73%)
Total	65 (24.17%)	3 (1.09%)	110 (40.65 %)	3 (1.1%)	12 (4.43 %)	77 (28.56%)	3 (1.1%)

Fuente: Datos experimentales

En la tabla 5, se muestra una comparación de la edad y género de los pacientes con cultivos de garganta positivos, según especie de *Streptococcus* beta-hemolítico aislada. Se dividió a los pacientes en cuatro grupos, el primero incluyó a los niños de edad pre-escolar de 1 a 5 años edad, el segundo a los escolares entre 6 a 11 años, el tercero a los adolescentes de 11 a 18 años y el cuarto a los adultos mayores de 18 años de edad.

Streptococcus pyogenes fue mayormente aislado en pacientes femeninos, adolescentes de 11 a 18 años de edad (12). *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* en pacientes masculinos pre-escolares de 1 a 5 años de edad (35), *S. agalactiae* en adultos mayores de 18 años (2), *S. constellatus* primordialmente en adultos masculinos (5), *S. intermedius* en adolescentes masculinos (3) y el grupo de los *Enterococcus* en escolares de 6 a 10 años de edad. En general, la tabla 5 muestra que el grupo de pre-escolares de 1 a 5 años de edad presentaron mayor frecuencia 88 (32%) en aislamientos positivos, los cuales

correspondieron a 43 (48.8%) aislamientos en el género femenino y 45 (51.2%) en el género masculino.

Tabla 5. Estreptococos Beta-hemolíticos clasificados por especie aislada según rango de edad y género del paciente (n = 273).

Colonias Beta-hemolíticas	1 a 5 años		6 a 10 años		11 a 18 años		Mayor a 18 años	
	Pre-escolares		Escolares		Adolescentes		Adultos	
	F	M	F	M	F	M	F	M
<i>S. pyogenes</i> (65)	8	9	5	8	12	8	8	7
<i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> (178)	33	35	26	23	16	18	15	12
<i>S. agalactiae</i> (3)	-	-	-	-	-	-	1	2
<i>S. constellatus</i> (13)	1	1	1	-	3	1	1	5
<i>S. intermedius</i> (8)	-	-	1	-	1	3	1	2
<i>E. faecalis</i> (3)	1	-	-	2	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> (3)	-	-	2	-	-	1	-	-
Sub-Total	43 (48.8%)	45 (51.2%)	35 (51.5%)	33 (48.5%)	32 (50.8%)	31 (49.2%)	26 (48.1%)	28 (51.8%)
Total	88 (32 %)		68 (25 %)		63 (23 %)		54 (20 %)	

F = Femenino, M = Masculino

Fuente: Datos experimentales

Con respecto al antibiograma, se observó que no hubo ningún caso de resistencia a antibióticos beta-lactámicos: Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), amoxicilina (AMX), cefaclor (CEC) y cefadroxilo (CFR), ni a las penicilinas: Ampicilina (AMP) y penicilina (P). Sin embargo, se observó en algunas cepas de *S. pyogenes*, *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* y *S. agalactiae* resistencia a macrólidos: Azitromicina (AZM), claritromicina (CLR) y eritromicina (E) y únicamente en el caso de los *Enterococcus* se observó resistencia a la lincosamida: Clindamicina (DA). Por otro lado, *S. constellatus* y *S. intermedius* no evidenciaron resistencia a ninguno de los 10 antibióticos probado en el estudio, datos mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Colonias que presentaron resistencia a algún antibiótico (n = 273).

Colonias Beta-hemolíticas	AMC	AMX	AMP	AZM	CEC	CFR	CLR	DA	E	P
<i>S. pyogenes</i> (65)	-	-	-	8	-	-	7	-	7	-
<i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> (178)	-	-	-	2	-	-	2	-	2	-
<i>S. agalactiae</i> (3)	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-
<i>S. constellatus</i> (13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. intermedius</i> (8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (3)	-	-	-	2	-	-	3	1	3	-
<i>E. faecium</i> (3)	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-
Total				14			14	1	14	
Frecuencia				5.12%			5.12%	0.36%	5.12%	

Fuente: Datos experimentales

XI. DISCUSIÓN

Los *Streptococcus* han sido estudiados por muchos años debido a las complicaciones que estos pueden llegar a ocasionar en la población mundial, sin discriminar la edad, raza o género de una persona; complicaciones que van desde una simple faringitis hasta dejar secuelas como en el caso de la fiebre reumática o glomerulonefritis (Koneman, et al., 2006; Bailey & Scott, 2002).

El estreptococo beta-hemolítico aislado comúnmente y más estudiado es el estreptococo beta-hemolítico del grupo A o *Streptococcus pyogenes*. Sin embargo, en varios países de América, se han descrito a los estreptococos beta-hemolíticos del grupo C y G, como agentes causales de infecciones (2). En este estudio, se evaluó principalmente la frecuencia de EBHC y EBHG aislados a partir de muestras clínicas de exudados faríngeos, durante el período de un año en el que se analizaron 2,023 muestras en total, de las cuales se aislaron 273 muestras de colonias beta-hemolíticas, dato que correspondió a un 14% de aislamientos positivos.

Debido a que en este estudio se observaron 7 (2.56%) cultivos con crecimiento de colonias beta-hemolíticas hasta las 48 horas incubación, se recomienda prolongar la búsqueda de beta-hemólisis en los cultivos presuntivamente negativos a las 24 horas de incubación, ya que con esto se demuestra que un pequeño porcentaje de estas bacterias llegan a desarrollarse lentamente, así como lo menciona Carpinelli y colaboradores, en su estudio en Paraguay (Carpinelli, et al., 2008).

La triada de pruebas presuntivas de grupo: sensibilidad a la Bacitracina (Taxo A), sensibilidad al Trimetoprim/Sulfametoxazol (Taxo SXT) y prueba de CAMP, son inespecíficas para la clasificación de grupo en los *Streptococcus* beta-hemolíticos de los grupos C y G, fue por ello que inicialmente fueron catalogados como *Streptococcus* beta-hemolíticos del grupo no A no B. Sin embargo, estas pruebas presentan alta especificidad en clasificar a los *Streptococcus* pertenecientes al grupo A, ya que tal y como muestra la literatura, se observó que todos los cultivos (65%) con Taxo A susceptible, Taxo SXT

resistente y prueba de CAMP negativa, fueron confirmados mediante el sistema API® 20 Strep como *Streptococcus pyogenes* en un 100% y mediante aglutinación como pertenecientes al grupo A de Lancefield.

Por lo tanto, esta triada de pruebas presuntivas no son totalmente específicas para identificar a todas las especies. Por lo anterior, se hace necesario confirmarlas con sistemas específicos que contengan mayor número de pruebas como lo es el sistema API® 20 Strep.

La especie mayormente encontrada de EBH fue el *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, dato que confirma los estudios realizados en distintos países de América por Carpinelli, González-Lama, Villar, Romero, Lopardo y Zaotis entre otros, en los que se mostró que no solamente el *Streptococcus pyogenes* es el causante de infecciones en la orofaringe, habiéndose aislado mayoritariamente en todos estos estudios y en el presente los *Streptococcus* pertenecientes a los grupos C y G de Lancefield, por medio de la tipificación serológica con antisueros (Carpinelli, et al., 2008; Villar, et al., 2005; Romero, 2002; Zaoutis, 2004).

Por otro lado, con respecto a la edad de los pacientes: se observó mayor frecuencia (32%) de aislamientos de EBH en el grupo de pre-escolares (88) de 1 a 5 años de edad, y con menor frecuencia del 20% en los adultos (54), mayores de 18 años de edad, debido a que posiblemente los niños son un grupo muy vulnerable a padecer este tipo de infecciones, especialmente los más pequeños, que asisten a las guarderías o centros de cuidado, en donde conviven con más niños, infectándose debido al hacinamiento de estos lugares. Además de que frecuentemente se llevan a la boca cualquier objeto, lo que facilita la transmisión de estas infecciones, extendiéndose de persona a persona a través de gotitas respiratorias. No habiendo encontrado diferencia alguna entre género de los pacientes (Villar, et al., 2005; Berkow, et al., 2010; Altamimi, et al., 2009).

Con respecto al antibiograma y según las nuevas recomendaciones de la NCCLS, la penicilina y la ampicilina siguen siendo las drogas para tratamiento de infecciones por estos

agentes, en los que no es necesario hacer pruebas de resistencia antibiótica de rutina. En los casos en que se realice, los aislamientos resistentes deben ser reidentificados, reevaluados y corroborados en un laboratorio de referencia. En este estudio, no se encontró ningún tipo de resistencia a la ampicilina o penicilina (Werner, 2010).

La eritromicina ha sido recomendada como tratamiento alternativo tanto en pacientes alérgicos a la penicilina como en infecciones por cepas *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius* resistentes a la penicilina. En este estudio la resistencia a macrólidos se observó solamente en el 5.12% de las cepas, frecuencia relativa muy baja (Lan & Colford, 2000; Gianelli & Posse, 2007).

X. CONCLUSIONES

1. La triada de pruebas: susceptibilidad a la Bacitracina (Taxo A), resistencia a Trimetoprim/Sulfametoxazol y prueba de CAMP negativa, siguen siendo la mejor prueba presuntiva en la identificación de *S. pyogenes*.
2. El grupo C de Lancefield fue el que presentó mayor frecuencia de identificación mediante las pruebas de aglutinación.
3. La especie más frecuente de los EBH del grupo no A no B, al *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*.
4. El grupo con mayor vulnerabilidad a padecer infección streptocócica fueron los pre-escolares de 1 a 5 años con el 32%, no habiendo encontrado diferencia alguna en cuanto a género del paciente.

5. RECOMENDACIONES

1. Debido a la alta frecuencia de EBH diferentes al grupo A, sería de mucha importancia identificar e informar todos los serogrupos de estreptococos de forma rutinaria en el laboratorio para su diagnóstico y tratamiento correcto.
2. Estudiar la prevalencia de los EBH como alerta en la prevención de las complicaciones post estreptocócicas que podrían presentar alta morbilidad y mortalidad en el país.
3. Es necesario seguir observando los mecanismos de resistencia que podrían ir desarrollando los *Streptococcus* sp. en el transcurso de los años, ya que el hecho de no tener datos de resistencia actualmente a las penicilinas, no significa que algún día no puedan desarrollarla. Es necesario entonces, mantener una vigilancia periódica en los laboratorios de microbiología.

4. REFERENCIAS

Aguirre, J. J. (2008). Prevalencia de *Streptococcus* beta hemolítico en pacientes con faringoamigdalitis aguda, en un hospital de la ciudad de Champoyas Amazonas. *Revista de Microbiología Peruana* , 88-90.

Allón, W. (2004). Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico: selección, recolección, conservación y transporte. *Revista de Microbiología de Uruguay* , 65-71.

Altamimi, S., Khalil, A., Milner, K., & Pusic, M. (2009). Tratamiento antibiótico de corta duración versus estándar para la faringitis aguda estreptocócica en niños. *Journal of Microbiology* , 68-75.

Amorth, G. (2005). Acute glomerulonephritis associated with *Streptococcus pyogenes* with concomitant spread of *Streptococcus constellatus* in four rural families. *Journal of Medicine* , 217-231.

Anne, H., Mark, J., & James, M. (2005). New understanding of the group A *Streptococcus* pathogenesis cycle. *American Society of Microbiology* , 21-27.

Baele, M., Storms, V., Haesebrouck, F., Devriese, L., Guillis, M., Verschraegen, G., y otros. (2007). Application and evaluation of the interlaboratory reproducibility of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Medical Microbiology* , 221-224.

Bailey, W., & Scott, E. (2002). *Diagnostic Microbiology*. St. Louis Missouri, USA: Mosby Inc.

Berkow, R., Beers, M., & Fletcher, A. (2010). *Manual Merk*. Madrid, España: Grupo Océano.

Biomerieux. (01 de 01 de 2005). Recuperado el 02 de 10 de 2011, de www.biomerieux.usa.com

Bisno, A. (2001). Acute pharyngitis. *New England Journal of Medicine* , 205-211.

Braun, S., Camponovo, R., Castillo, L., Cona, E., Herve, B., Fernández, A., y otros. (2004). Recomendaciones para la identificación bajo costo de *Streptococcus* grupo *anginosus*. *Revista Chilena de Infectología* , 268-269.

Caro, G., Riedel, I., & García, P. (2004). Caracterización clínica y microbiológica de las infecciones causadas por *Streptococcus* grupo *anginosus*. *Revista Chilena de Infectología* , 254-260.

Carpinelli, L., Fariña, N., Samudio, M., Figueredo, L., Laspina, F., & Sanabria, R. (2008). Frecuencia de serogrupos de estreptococos beta-hemolíticos en hisopados faríngeos en pacientes con faringitis. *Memorias del Instituto de Investigación de Ciencia y Salud* , 20-27.

Carranza-Martinez, M. I., Valdez Croda, O., Jaspersen, V., & Villaseñor-Sierra, A. (2007). identificación de signos y síntomas pivote en amigdalitis estreptocócica. *Revista Medical del instituto Mexicano del Seguro Social* , 525-530.

Cercenado, E., & Cantón, R. (2004). Procedimientos en Microbiología Clínica. *Revista de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas* , 49-58.

Chavez, C., Livia, G., Muñoz, E., Otitiano, M. d., & Luján, V. (2006). Evaluación comparativa de agar sangre dcose carnero y agar sangre humana en el aislamiento de *Streptococcus* beta hemolítico. *Revista Médica Vallejana* , 148-156.

Cisternas, O. (2007). La tinción de Gram como herramienta de uso diario en el diagnóstico. *Revista del Hospital del Niño, Panamá* , 140-146.

Cunningham. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical Microbiology Reviews* , 470-511.

Davies, M., MacMillan, D., & Van Domselaar, G. (2006). Page 3369 for a *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Patovar May Have Its origins in *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology, American Society of Microbiology* , 2646-2652.

Diersken, K., & Taqq, J. (2000). Haemolysin.deficient variants of *Streptococcus pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* may be overlooked as etiological agents of pharyngitis. *Journal of Medical Microbiology* , 811-816.

Facklam, R. (2002). *What Happened to the Streptococci; Overview of Taxonomic and Nomenclatures Changes*. Atlanta, Georgia, USA: Centers for Diesase Control and Prevention.

Gianelli, S., & Posse, G. (2007). Prevalencia de portación asintomática del estreptococo beta hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*). *Revista Argentina de Microbiologia* , 221-224.

Gini Aguilera, G. A. (2007). *Manual de Procedimientos para la identificación de las Bacterias con Importancia Clínica*. Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala.

- González-Lama, Z., González, J. J., & Lupiola, P. (2000). Portadores de estreptococos beta-hemolíticos de los grupos A, B y C en escolares de Las Palmas. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* , 15-19.
- Koneman, W., Washington, C., Stephen, D., Gary, W., & William, M. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kuusi, M., Elina, L., Virolaine, A., Vuento, R., Gindonis, V., & Huotari, K. (2006). Un brote de *Streptococcus equi* subespecie *zooepidermicus* asociado con un consumo de queso de cabra fresco. *Journal of Infection Diseases* , 30-36.
- Lan, A., & Colford, J. (2000). The Impact of Dosing Frequency on the Efficacy of 10-Day Penicillin or Amoxicillin Therapy for Streptococcal Tonsillopharyngitis: A Meta-analysis. *Journal of Public Health Biology and Epidemiology* , 19-26.
- Lopardo, H., Vidal, P., Sparo, M., Jeric, P., Centron, P., Facklam, R., y otros. (2005). Six-month multicenter study on invasive infections due to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subs. *equisimilis* in Argentina. *Journal of Clinical Microbiology* , 802-807.
- MacFadding, J. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mahon, C., Manuselis, G., & Lehman, D. (2007). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. St. Louis Missouri, USA: Elsevier.
- Montes, M., & García, J. (2006). Programa de control externo de calidad, género *Streptococcus*, una revisión práctica para el laboratorio de microbiología, servicio de microbiología. *Revista de Infecciones Microbiológicas* , 14-20.
- Romero, S. (2002). *Streptococcus* beta-hemolítico en la orofaringe de escolares asintomáticos de dos instituciones del estado Zulia. *Revista de la Sociedad Venezolana* , 1315-2556.
- Salyers, A., & Whitt, E. (2002). Molecular Approaches to the diagnosis and characterization of bacterial infections. *Journal of Microbiology* , 34-52.
- Tiemstra, J., & Miranda, R. (2009). Role of Non-Group A Streptococci in Acute Faringitis. *American Society of Microbiology* , 663-669.
- Vargas, L., Vila, A., & Lanza, A. (2005). Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Revista Argentina de Microbiología* , 8-16.

Villar, H. E., Julgo, M. B., Santana, G., Baserni, M., & Reil, J. M. (2005). Aumento en la prevalencia de estreptococos beta hemolíticos en isopados faringeos en Buenos Aires. *Revista Medicina de Buenos Aires* , 311-314.

Villaseñor-Sierra, A. (2008). Modelo multivariado para predecir amigdalitis estreptocócica. *Revista de Medicina del Instituto Mexicano de Seguro Social* , 383-390.

Werner, S. (2010). *Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing*. USA: CLSI document.

Zaoutis, T. (2004). The role of group C and group G streptococci in acute pharyngitis in children. *Journal of Infections of the University of Pennsylvania* , 23-37.

5. ANEXOS

Anexo 1. Pasos para la correcta toma de muestra de un exudado faríngeo para cultivo.

1. Colocar al paciente sentado y pedirle que trague saliva fuertemente tres veces.

2. Pedir al paciente, viendo hacia arriba que abra la boca, saque la lengua y diga “aahh”.
3. Con un bajalenguas se presiona fuertemente la lengua hacia abajo y simultáneamente iluminar bien el fondo de la garganta, detrás de la úvula o campanilla, con la luz de una lámpara o linterna.
4. Localizar en el fondo de la garganta y en las amígdalas, las siguientes lesiones:
 - a. Inflamación (enrojecimiento)
 - b. Pus (secreción blanquecina o amarillenta)
 - c. Úlceras blanquecinas
5. Con un hisopo estéril se frota firmemente las lesiones con mucho cuidado de no tocar la lengua, la campanilla, la pared interna de los carrillos (cachetes) o los labios, al retirar el hisopo.

Fuente: Allalón W. Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico: selección, recolección, conservación y transporte. Departamento de laboratorio clínico, microbiología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay, 2004.

Anexo 2. Recomendaciones para realizar un cultivo de exudado faríngeo.

1. El propósito de usar sangre de carnero en el medio, es aumentar la beta hemólisis característica e inhibir a *Haemophilus haemolyticus* que puede confundirse con *Streptococcus* sp. Con sangre de carnero se obtiene una excelente diferenciación entre alfa y beta hemólisis.
2. Evitar el uso de sangre humana vencida de banco de sangre en todos los cultivos bacteriológicos ya que puede ser inhibitoria al crecimiento bacteriano por contener anticoagulantes, anticuerpos o antibióticos, además del peligro potencial de la transmisión del virus del SIDA, hepatitis B, etc.
3. No hacer frotos o coloración de Gram directa de faringe, pues su interpretación es muy difícil debido a lo abundante de la microbiota y no tiene significado clínico.
4. Con el objeto de obtener cultivos evidentes de EBHA, sin necesidad de hacer subcultivos, proceder así: Con pinza flameada y fría, colocar en la zona de más fuerte inoculación en el agar sangre de carnero (primera estría), un disco de 30 mcg de neomicina. A unos 8-10 mm de distancia, colocar un disco de 0.04 unidades de bacitracina. *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae* son resistentes al antibiótico neomicina, por lo que crecen en cultivo casi puro alrededor de este disco. Como el disco de bacitracina (también llamado taxo A se encuentra muy cerca frecuentemente puede acelerarse la identificación presuntiva. Las colonias que crecen alrededor del disco de neomicina (N-30) pueden usarse para hacer subcultivos y antibiogramas. Este método sencillo que clarifica la interpretación, puede aplicarse para facilitar el aislamiento, y efectuar la identificación presuntiva rápida de *S. pneumoniae*.

Fuente: Allalón W. Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico: selección, recolección, conservación y transporte. Departamento de laboratorio clínico, microbiología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay, 2004.

Anexo 3. Criterios para interpretación de cultivos de exudados faríngeos.

1. Tener presente que los patógenos más importante son EBH.
2. Tomar la caja de agar sangre de carnero con la mano izquierda entre el dedo pulgar y medio sosteniendo por detrás de la caja con el dedo índice.
3. Con una lupa o estereoscopio en la mano derecha examinar cuidadosamente la caja con buena luz transmitida. En primer lugar notar si hay o no hemólisis beta en las cortadas. Si la hay, buscar con cuidado colonias separadas beta-hemolíticas pequeñas y brillantes, sospechosas de *Streptococcus* sp. Aunque sólo se observe una de estas colonias, debe tomarse en cuenta.
4. Con un asa recta estéril, trasladar una sola colonia típica al centro de otra caja de agar sangre de carnero. Sólo tocar la superficie del medio rotando el asa, no pinchar el medio. Luego con un asa en argolla estriar en tres direcciones opuestas y luego colocar con pinzas estériles en el centro del inóculo un disco de bacitracina de 0.04 unidades “taxo A”. La bacitracina es un antibiótico originalmente aislado de *Bacillus licheniformis*. La prueba presuntiva de la inhibición selectiva por este antibiótico tiende a ser sustituida por otras pruebas. Sin embargo, se sigue usando debido a su facilidad y alto porcentaje de exactitud.
5. Si las colonias beta hemolíticas no están aisladas, se hacen una purificación así: con un asa recta o aguja de disección flameada, tomar las colonias beta hemolíticas con cuidado, aunque se tome de otras colonias que estén muy cercanas o adyacentes. De preferencia hacer esto bajo el microscopio estereoscópico. Trasladar el inóculo dos o tres veces a un extremo de una caja de agar sangre de carnero y luego con un asa en anillo, estriar en toda la caja con dos cortadas, al igual que el cultivo inicial. Colocar con pinzas estériles un disco de bacitracina en el inicio de la segunda estría.

Fuente: Cercenado E y Cantón R. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital de Clínicas. Madrid, España, 2004.

Anexo 4. Fundamento de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *Streptococcus* sp.

NOMBRE	OBJETIVO	FUNDAMENTO
Acidificación de Azúcares (ribosa, arabinosa, manitol, sorbitol, lactosa, trehalosa, nulina, rafinosa, almidón, glucógeno).	Evidenciar la acidificación de los carbohidratos por parte de las bacterias.	Las bacterias anaerobias o anaerobias facultativas a menudo fermentan carbohidratos a ácidos orgánicos y gas (H_2 o CO_2). Estos pueden detectarse incluyendo en el medio un indicador de pH, provocando el viraje a amarillo del indicador presente en la solución.
Beta-Galactosidasa	Esta prueba determina la presencia del enzima beta galactosidasa, responsable de la ruptura del disacárido lactosa en dos monosacáridos: glucosa y galactosa.	Para que se produzca esta hidrólisis es necesario que la lactosa difunda hacia el interior de la bacteria, donde se producirá la hidrólisis y posterior fermentación de los azúcares. Esta difusión es facilitada por otra enzima, la galactósido-permeasa. La existencia de betagalactosidasa podría ponerse de manifiesto mediante la visualización de la disminución de pH, gracias a la presencia de un indicador de pH adecuado.
Beta-Glucorinadasa	Probar la hidrólisis de los ácidos β -D glucopiranosidúricos.	La β -D-glucuronidasa (GUD) es una enzima que cataliza la hidrólisis de ácidos β -D glucopiranosidúricos en sus correspondientes agliconas y ácido glucurónico.
Bilis Esculina	Separar los estreptococos del grupo D de los demás grupos de estreptococos.	Se basa en la capacidad de los estreptococos del grupo D de crecer en un medio de cultivo que contiene un 40% de bilis y de hidrolizar la esculina a esculetina, la cual se combina con el citrato ferroso que posee el medio, dando un complejo de color negro. La concentración de bilis es fundamental, ya que existen estreptococos del grupo <i>viridans</i> que son capaces de crecer a concentraciones menores de bilis.
Catalasa	Separar la fila Micrococaceum , catalasa positivo de <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> , catalasa negativo.	La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno bajo la fórmula $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H_2O_2 , que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares

Hidrólisis del Hipurato	Determina la capacidad de algunos microorganismos de hidrolizar el hipurato sódico produciendo ácido benzoico, al añadir una solución de cloruro férrico.	El hipurato es un compuesto orgánico aromático que puede ser hidrolizado enzimáticamente originando benzoato y glicina.
Hidrólisis del Pirronidonil Beta Naftilamida (PYR)	Separar <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Enterococcus</i> de los demás estreptococos.	<i>S. pyogenes</i> y <i>Enterococcus</i> poseen la capacidad de hidrolizar el substrato PYR (pirridonil β -naftilamida) debido a que poseen la enzima l-piroglutamil aminopeptidasa. En general siempre se revelan por un cambio de color.
Leucina Aminopeptidasa	Detectar la presencia de la enzima leucina aminopeptidasa (LAP).	La LAP es una exopeptidasa que hidroliza un péptido adyacente para liberar un grupo amino, se le llama leucina aminopeptidasa porque reacciona más rápidamente con compuestos de leucina
Prueba de CAMP	Separar <i>S. agalactiae</i> de los demás EBH's.	Se basa en que los EBHB producen un factor llamado CAMP (factor de monofosfato de adenina cíclica) que aumenta la zona de hemólisis producida por un estafilococo productor de β -lisina.
Sensibilidad a la Bacitracina (Taxo A)	Separar a <i>Streptococcus pyogenes</i> de los demás EBH's.	<i>Streptococcus pyogenes</i> es sensible a bajas concentraciones de bacitracina (discos conteniendo 0.04U). También existe un 5% de cepas de <i>S. agalactiae</i> que son sensibles a la Bacitracina.
Sensibilidad a la Optoquina (Taxo P)	Diferencia a <i>S. pneumoniae</i> , el cual es susceptible de los demás estreptococos.	La sensibilidad a la optoquina es la medida de la fragilidad de la membrana celular bacteriana a este.
Sensibilidad al Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	Determinar la susceptibilidad o resistencia de un microorganismo al SXT.	El trimetoprim inhibe la reductasa ácida dihidrofólica, que inhibe a la enzima reductasa, interfiriendo con el metabolismo del ácido fólico, la secuencia de síntesis de pirimidina y con el metabolismo de un fragmento de carbono de la bacteria.
Voges-Proskauer	Se utiliza para determinar la capacidad de algunos microorganismos de producir acetilmetilcarbinol, producto final	La glucosa es degradada a ácido pirúvico. Existen dos grupos de fermentación, en la primera se producen ácidos y la otra el producto final es el 2,3-butanodiol, que es un producto neutro.

	neutro, a partir de fermentación de glucosa.	
--	--	--

Fuente: Mahon C, Manuselis G, Lehman D. Textbook of diagnostic microbiology. (3th ed.). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier, 2007; 1133-1146. Y Gini G. Manual de Procedimientos para la Identificación de las Bacterias con Importancia Clínica. (3ra. ed.). Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2007.

Anexo 5. Tabla de interpretación de resultados de las pruebas de sensibilidad a la bactericina (Taxo A), trimetropim-sulfametoxazol (Taxo SXT) y prueba de CAMP.

	TAXO A	TAXO SXT	CAMP
<i>Streptococcus pyogenes</i>	S	R	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	R	R	+
<i>Streptococcus</i> beta hemolítico del grupo no A, no B de Lancefield	R	S	-

Fuente: Gini G. Manual de Procedimientos para la Identificación de las Bacterias con Importancia Clínica. (3ra. ed.). Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2007.