

2ej  
111



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

## “Enfermedades Producidas por los Estreptococos de los Grupos C y G de Lancefield y su Diagnóstico en el Laboratorio”.

### TRABAJO MONOGRAFICO

Que para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

**María del Socorro Ruiz Palma**

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	PAGINA
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	3
a. Antecedentes	3
b. Taxonomía	4
c. CARACTERISTICAS PRESENTES EN EL GENERO <u>STREPTOCOCCUS</u>	5
c.1. Morfología	5
c.2. Metabolismo	5
c.3. Cultivo	6
c.4. Estructura antigénica y composición de la pared celular	8
d. Clasificación	10
e. Bacteriófagos	15
f. POLISACARIDOS ANTIGENICOS DE LOS GRUPOS C Y G	16
g. ESPECIES COMPRENDIDAS DENTRO DE LOS GRUPOS C Y G	18
h. CARACTERISTICAS CULTURALES Y BIOQUIMICAS DE LOS ESTREPTOCOCOS DE LOS GRUPOS C Y G	21
i. PRODUCTOS EXTRACELULARES PRODUCIDOS POR LOS GRUPOS A, C Y G	26
III. PATOLOGIA	36
a.1. ENDOCARDITIS INFECCIOSA	36
a.2. SEPTICEMIA NEONATAL	45

	PAGINA
a.3. MENINGITIS	51
a.4. FARINGOAMIGDALITIS	55
a.5. NEUMONIA	58
a.6. ARTRITIS INFECCIOSA	60
IV. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	65
a. CULTIVO DE SANGRE	65
b. CULTIVO DE LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO	68
c. CULTIVO DE EXUDADOS FARINGEOS	71
d. CULTIVO DE ESPUTO	71
e. CULTIVO DE LIQUIDO SINOVIAL	72
f. PREPARACION DE LAS PLACAS DE AGAR SANGRE	73
g. PRUEBAS SEROLOGICAS	75
h. PRUEBA DE FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS	75
i. SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	77
V. CONCLUSIONES	81
ANEXO I	84
I.1. PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACION DE ESTREPTOCOCOS	84
I.2. COMPOSICION Y PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO	118
BIBLIOGRAFIA	124

## I. INTRODUCCION

Los miembros del género Streptococcus están ampliamente distribuidos en la naturaleza y varias especies se encuentran formando parte de la flora habitual del hombre, el cual sin duda es uno de los seres más susceptibles de contraer enfermedades estreptocócicas.

Anteriormente se pensaba que los únicos estreptococos, cuya importancia médica justificaba su investigación completa en el laboratorio, eran los pertenecientes al grupo A de Lancefield (S. pyogenes); sin embargo, en la actualidad no puede negarse la participación de otros, entre los que destacan el B, C, D y G, en diversos procesos infecciosos lesivos, ya que junto con el antes mencionado, constituyen más del 90% de los estreptococos aislados a partir de muestras clínicas.

Con respecto a los grupos C y G, a los cuales antes sólo se les acreditaba patogenicidad para los animales, se ha comprobado en los últimos años un notable incremento de casos clínicos humanos, lo cual probablemente se deba a que hoy en día se emplean con mayor frecuencia las pruebas serológicas: cabe mencionar que algunos miembros de estos grupos dan positiva la prueba de sensibilidad a 0.04 U de bacitracina y, por ello, existe la posibilidad de que se hayan reportado como S. pyogenes en más de una ocasión.

Este trabajo se enfoca hacia la revisión de los aspectos más relevantes en los que, desde el punto de vista de la patología humana, se encuentran involucrados los grupos C y G: las regiones anatómicas afectadas por ellos, los diagnósticos clínico y de laboratorio, la epidemiología y, desde luego, el tratamiento óptimo de las enfermedades que provocan, son temas abordados de manera tan detallada, como lo permite la publicación de investigaciones recientes.

## II. GENERALIDADES

### a. ANTECEDENTES.

Los estreptococos (del griego streptós, trenzado y kókkos, grano) presentan una historia interesante por constituir un género de bacterias singulares, contándose entre los microorganismos más ubicuos que le han causado al hombre, a través de los siglos, un número grande de enfermedades (26,57).

Hacia 1836, Richard Bright, reconocía ya la relación de la fiebre escarlatina, la glomerulonefritis y la insuficiencia renal crónica a un mismo agente etiológico (enfermedad de Bright) (57). En 1874, Billroth (24) fue el primero en describir células globulares que crecían en cadenas, provenientes de los exudados purulentos de la erisipela y de heridas infectadas y Ehrlich (1877), asignó el término Streptococcus a estos microorganismos (94). Al año siguiente, Rosenbach aplicó el nombre Streptococcus pyogenes a los cocos que habiendo sido aislados de lesiones supurativas en el hombre, crecían en cadenas (94) y, en 1932, Courn estableció firmemente la relación existente entre los estreptococos y la fiebre reumática (57).

Actualmente, se sabe que una sola especie estreptocócica, puede ser responsable de una gran variedad de enfermedades (24).

b. TAXONOMIA.

De acuerdo con el Manual de Bergey (26), el reino Procariotae, presenta dos divisiones:

I. Cianobacterias

II. Bacterias

Desde el punto de vista de la Microbiología Médica, la segunda es la más interesante.

Al grupo 14, en el que se encuentran comprendidos los cocos Gram positivos, pertenecen tres familias:

Micrococcaceae

Streptococcaceae

Peptococcaceae

a su vez, la familia Streptococcaceae se subdivide en cinco géneros:

Aerococcus

Gemella

Leuconostoc

Pediococcus

Streptococcus

Considerando por un lado, lo expuesto por R. Facklam en el sentido de que el estado taxonómico de Gemella y Pediococcus es incierto (ya que propone la posibilidad de que Gemella sea en realidad un estreptococo viridans y, en forma similar, que las especies del género Pediococcus sean aerococos o estreptococos) y por otro lado, que no se han



aislado cepas de Leuconostoc provenientes del hombre, puede establecerse que los únicos miembros de importancia clínica en la familia, son entonces los de los géneros Aerococcus y Streptococcus (62). En este último, es precisamente en el que se encuentran clasificadas las bacterias que son objeto de este estudio.

### c. CARACTERISTICAS PRESENTES EN EL GENERO STREPTOCOCCUS.

#### c.1. MORFOLOGIA.

Los estreptococos son células esféricas u ovoides, cuyas dimensiones oscilan entre 0.6 y 1 micra de diámetro; son inmóviles (con excepción de algunas cepas del grupo serológico D), no forman esporas y son Gram positivos, aunque pueden perder esta propiedad a medida que las células envejecen; su agrupación característica en cadenas largas sólo se manifiesta en preparaciones obtenidas a partir de muestras biológicas o de cultivos líquidos (8,26,53,79) y la longitud de aquéllas es variable encontrándose condicionada por ciertos factores ambientales (52); por otro lado, su contenido de G + C (reportado para 15 especies) fluctúa entre 33 y 42 moles por ciento (26).

#### c.2. METABOLISMO.

Todos los estreptococos son facultativos (20,60,94) y quimiorganótrofos: fermentan carbohidratos y producen áci-

do láctico pero no gas (homofermentativos); algunas especies utilizan ácidos orgánicos como el málico y el cítrico y también aminoácidos tales como serina y arginina; además, son bencidina (-), catalasa (-) y oxidasa (-) (8,20,26,62).

### c.3. CULTIVO.

Los estreptococos crecen bien en la mayoría de los medios enriquecidos (8). Los requerimientos nutricionales de la gran mayoría son complejos: incluyen bases púricas y pirimidicas, péptidos, vitaminas y, ocasionalmente, ácidos grasos y tensión de CO<sub>2</sub> elevada; en contraste, algunas especies (S. bovis) desarrollan con tan sólo glucosa, amonio y sales inorgánicas (26).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque varios miembros pueden desarrollar entre 10° y 45°C (79).

En los medios sólidos, las colonias de estreptococos son pequeñas (por lo general de alrededor de 1 mm de diámetro), translúcidas o ligeramente opacas, circulares, convexas y aparecen como diminutas gotas de rocío sobre la superficie de agar. En comparación, las originadas por los neumococos se presentan aplanadas y translúcidas (8).

En medios líquidos, se ha observado que la adición de glucosa favorece considerablemente el crecimiento; sin embargo, bajo estas condiciones, el pH puede disminuir tanto que es posible que detenga el desarrollo; por esta razón,

se acostumbra utilizar un medio que, además de dicho carbohidrato, contenga amortiguadores (caldo Todd-Hewitt), o bien otros con alto contenido de glucosa a los que deben agregarse constantemente álcalis diluidos para evitar la variación de este parámetro (94).

En medios líquidos, los estreptococos desarrollan formando precipitados de microgránulos que generalmente se adhieren a la pared o al fondo del recipiente y pocas veces producen turbidez (79).

En las placas de agar sangre, puede observarse que los estreptococos hemolíticos originan alguno de estos tres tipos de colonias: mucóide, mate o lustrosa.

Las mucóides las desarrollan cepas que producen cápsulas grandes, esto es, que contienen gel de ácido hialurónico en abundancia, el cual confiere a la colonia una apariencia brillante. Las colonias mate, se pensó que reflejaban la producción de proteína M, pero es posible que simplemente sean colonias mucóides deshidratadas; no obstante esto último, que fue postulado por Wilson (24,26), es posible que haya que reconsiderarlo, debido a que los estudios que se han realizado coinciden en señalar que son el resultado de la acción tardía de la hialuronidasa en el desarrollo colonial. Por su parte, las lustrosas son más pequeñas y están formadas por células que no generan hialuronato o bien, que no lo retienen como gel capsular (24).

#### c.4. ESTRUCTURA ANTIGENICA Y COMPOSICION DE LA PARED CELULAR.

La pared celular de los estreptococos está compuesta principalmente por un mucopéptido que, en cuanto a composición, es similar en todo el género, aunque existen algunas diferencias en lo que se refiere a los puentes interpéptido; muchas cepas presentan en esta estructura, polisacáridos antigénicos conocidos como sustancia C específica de grupo, los cuales se encuentran unidos al mucopéptido y constituyen la base del sistema de clasificación de Lancefield; en algunos grupos, sus miembros poseen, además, antígenos polisacáridos específicos de tipo, ya sea formando parte de la estructura de la pared celular o situados más superficialmente constituyendo microcápsulas (94). Por otro lado, los estreptococos también pueden presentar antígenos de ácidos teicoicos; esto se puede observar en los pertenecientes al grupo D, cuyo antígeno específico de grupo es un ácido glicérol teicoico. En general, la mayor parte de estos microorganismos, en común con muchas otras bacterias Gram positivas, poseen simplemente ácido teicoico, que es un polímero de glicerofosfato con una unión éster de D-alanina (94).

En varios grupos de Lancefield, existen además antígenos proteicos de superficie, entre los que destaca por su importancia la denominada proteína M; ésta se encuentra distribuida en la superficie de la célula, unida a la fimbria,

la cual por cierto está ausente en la mayoría de las cepas M<sup>-</sup> (24).

La proteína M es uno de los principales factores de virulencia con que cuentan los estreptococos, debido a que les confiere resistencia a la fagocitosis; actualmente, existen aproximadamente 70 tipos descritos en función de sus características serológicas (86) y puede asegurarse que esta proteína no sólo se encuentra en el grupo A de Lancefield ya que se ha logrado poner de manifiesto en otros grupos (26). Son propiedades comunes de las proteínas M: su marcada estabilidad al calor (se pueden hervir durante 30 minutos o más a pH = 2), su alta resistencia al ácido y su gran solubilidad en alcohol (26).

Aunque se han identificado otros dos tipos de proteínas de la pared celular que figuran como antígenos de superficie, ninguno parece estar relacionado con la virulencia: los antígenos T, que si bien resisten la digestión por enzimas proteolíticas (pepsina y tripsina), son destruidos rápidamente por calor y pH ácido; por esta razón, no se encuentran en los extractos ácidos que contienen proteína M (18,24,53). Por otro lado, de la proteína R se han encontrado dos inmunológicamente distintas: una designada 3R que se destruye con tripsina o pepsina y la otra 28R, hidrolizada solamente por la acción de esta última (24).

Por último, se ha encontrado una fracción nucleoprotei

ca (antígeno P), similar antigénicamente tanto en los estreptococos hemolíticos como en los no hemolíticos y en los neumococos, que presenta reacción cruzada con las de origen estafilocócico (18,24).

#### d. CLASIFICACION DE LOS ESTREPTOCOCOS.

Aunque la mayoría de las cepas que frecuentemente causan enfermedad en el hombre (o en animales domésticos) se han estudiado ampliamente (94), existen otras que forman parte de la flora habitual del cuerpo humano o que viven en forma saprofita que continúan sin ser clasificadas; por consiguiente, aún existe cierta dificultad para proporcionar una descripción clara de varias especies (94). Sin embargo, para superar esta limitante, se han venido usando desde hace tiempo tres características generales.

La primera, se basa en los cambios producidos por el desarrollo de los estreptococos en agar sangre; ésta ha sido especialmente útil para reconocer ciertas especies patógenas (94); a principios del siglo XX, Hugo Schottmüller había demostrado la reacción hemolítica producida por los estreptococos en agar sangre; años más tarde, J. H. Brown (1919), trabajando en el Instituto Rockefeller, se constituyó como el primero en describir sus diferentes reacciones hemolíticas (57) y, como lo propusiera desde entonces, pueden observarse varios tipos de hemólisis, sobre todo en co-

lonias subsuperficiales:

Alfa ( $\alpha$ ): rodea a la colonia una zona indefinida de eritrocitos parcialmente lisados, frecuentemente acompañada por una coloración verdosa a parduzca (8,62).

Beta ( $\beta$ ): rodea a la colonia una zona clara, incolora, en la que los eritrocitos han sufrido destrucción total, lo cual indica una lisis completa (8,62).

Gamma ( $\gamma$ ): no se observa actividad hemolítica alrededor de las colonias (8,62).

Si bien las observaciones de Brown se basaron en el examen microscópico de colonias subsuperficiales en placas de agar sangre, con el tiempo, se han aplicado a la caracterización de las aparecidas en la superficie (62).

Una segunda característica considerada para efectuar una clasificación presuntiva, son las pruebas bioquímicas y fisiológicas; por lo regular, la capacidad para producir cambios bioquímicos específicos, tales como la fermentación de azúcares, es de poco valor para la subdivisión primaria de los estreptococos, aunque las pruebas individuales pueden ser útiles para caracterizar ciertas cepas o especies (94); por otra parte, las pruebas que se basan en la capacidad de crecimiento bajo condiciones extremas de temperatura o de pH, o bien en presencia de ciertas sustancias químicas son, con frecuencia, de mayor significado.

Por último, la presencia de los polisacáridos antigé-

nicos específicos de grupo (94), no dejan de constituirse como una de las mejores opciones:

A principios de los años 30's, Rebeca Lancefield identificó cinco grupos de estreptococos antigénicamente distintos, a los que llamó A, B, C, D y E, con base en las diferencias serológicas provenientes de los polisacáridos C de la pared celular; desde entonces, se ha extendido el número de grupos existentes a 21, clasificados de la letra A a H y de la K hasta la W (72).

Los antígenos (ya sean polisacáridos o ácidos teicoicos de la pared celular), pueden extraerse de las células enteras por medio de ácido clorhídrico diluido, formamida, ácido nitroso diluido, autoclave o enzimas líticas; estos extractos se prueban contra sueros específicos de grupo mediante reacciones de precipitación en tubos capilares (53).

De las tres características generales mencionadas anteriormente, ninguna ha resultado, en forma individual, completamente satisfactoria para realizar una subdivisión de este género.

En el pasado, la clasificación generalmente aceptada fue la de Sherman (1937), quien reconoció cuatro divisiones principales en los estreptococos: piógenos, enterococos, lácticos y viridans (94), diseñada en función de su habitat y otras propiedades fisicoquímicas.

Todas las clasificaciones antes señaladas, no incluyen



a Streptococcus pneumoniae, el cual está considerado actualmente dentro del género Streptococcus, según el Manual de Bergey (26). En esta edición del Manual, se ha omitido dicha clasificación, no sin dejar de considerarla de cierta utilidad, porque las especies de estreptococos que se han venido identificando no se ajustan a una división determinada (26). Agregado a la dificultad de una división primaria, también tenemos que, aparte del sistema utilizado por el CDC (Centro de Control de Enfermedades) de Atlanta Georgia, EUA, para realizar la identificación y diferenciación de los estreptococos, existe otro esquema que proviene de Inglaterra (32).

Aunque en general hay acuerdo entre ambos esquemas, también existen áreas de discrepancia. Ambos reconocen a los estreptococos típicos de los grupos A, B, C y G, incluyendo las cuatro especies dentro del grupo C; sin embargo, la concordancia no es evidente con respecto al grupo F, las cepas de colonias "diminutas" de los grupos A, C y G o los estreptococos beta hemolíticos sin antígenos de grupo que son clasificados como Streptococcus milleri por los taxónomos británicos.

Otros aspectos en los que difieren ambos esquemas son:

(a) El CDC reconoce dos "especies" que no son beta hemolíticas y que se encuentran en la clasificación viridans, estas son: Streptococcus anginosus-constellatus y

Streptococcus MG-intermedius, que los británicos incluyen en la clasificación "milleri".

- (b) Mientras que el CDC utiliza Streptococcus mitis y Streptococcus sanguis biotipo II, los británicos emplean Streptococcus mitior y Streptococcus mitior dextrana positivo. El acuerdo es evidente en la descripción de estas especies, pero las pruebas finales para diferenciación son distintas (32).

Actualmente, más que preocuparse por proponer una subdivisión de los estreptococos, el interés de los microbiólogos se encuentra enfocado a la obtención de un sistema que sea útil para lograr la identificación correcta de estos microorganismos, por lo cual el CDC emplea para propósitos del diagnóstico práctico más que desde un punto de vista taxonómico, la siguiente subdivisión de los estreptococos en dos categorías:

- (a) En esta se encuentran los estreptococos beta hemolíticos que con pocas excepciones se clasifican de acuerdo al esquema de Lancefield y
- (b) La segunda categoría en la que se incluyen a los estreptococos alfa hemolíticos (viridans) y no hemolíticos, que pertenecen ya sea a grupos de Lancefield o a otras especies no agrupables.

#### e. BACTERIOFAGOS.

Los estreptococos pueden ser hospedadores de dos clases de fagos (Maxted 1964): los virulentos, que tienen un amplio rango de acción lítica y los temperados, los cuales los lisogenizan y sólo cuando son reactivados los destruyen. En 1934, Evans (94) describió la lisis de los estreptococos del grupo A, cuando crecían con otros del grupo C pero estos últimos infectados por un fago; posteriormente, Maxted en 1957, demostró que este fenómeno se debía a una enzima asociada al fago pero separable de él, la cual atacaba la pared celular de los estreptococos de los grupos A, C y E; la proteína funcional en cuestión, es una N-acetil-muramil L-alanil amidasa, que se ha detectado en partículas virales maduras y en colas de fagos fragmentados (53).

Zabriskie (1964), demostró que la capacidad de producir toxina eritrogénica podía transferirse de una cepa de S. pyogenes a otra mediante lisogenización con fagos temperados (94).

En los últimos años, los estudios realizados sobre conversión lisogénica y transducción, han demostrado que los fagos tienen la capacidad de transferir información genética determinante para la síntesis de un gran número de productos y características biológicamente importantes en estreptococos de los grupos A, C y G (96); así, se ha puesto de manifiesto que la transducción intergrupo transfiere re-

sistencia a antibióticos entre los grupos A, C, G y esto se ha comprobado en ambas direcciones, ésto es, del grupo A al G y viceversa. Es posible que este fenómeno se verifique debido a la similitud de los receptores en el peptidoglicano de los grupos mencionados, pudiendo ser ésta la causa de la aumentada prevalencia de resistencia a la eritromicina entre los estreptococos (96).

La importancia clínica que tiene la transducción en la resistencia, no sólo a eritromicina sino también a bacitracina, es que la primera se usa en el tratamiento de enfermedades estreptocócicas en pacientes sensibles a la penicilina y, la segunda, se emplea frecuentemente durante la terapia local del impétigo (96).

Por lo antes mencionado, es posible establecer que el intercambio de determinantes genéticos entre los estreptococos del grupo A y otros grupos, el cual está mediado por fagos, es un factor importante en la biología y la ecología de estos microorganismos.

#### f. POLISACARIDOS ANTIGENICOS DE LOS GRUPOS C Y G.

En 1924, Hitchcock (94) fue el primero en demostrar que la mayoría de los estreptococos responsables de enfermedades humanas poseían un polisacárido antigénico serológicamente activo y el trabajo de Rebeca Lancefield (1933) (94), demostró que éste se podía extraer. La relevancia de estos

hallazgos se hizo evidente, cuando se comprobó que la distribución de dichos antígenos de grupo en los microorganismos se relacionaba íntimamente tanto con ciertos huéspedes animales como con determinadas enfermedades. En aquel entonces, la mayoría de las enfermedades humanas graves eran debidas al grupo A y como las cepas de la mastitis bovina presentaban un grupo polisacárido diferente, se clasificaron como grupo B; por otro lado, las responsables del padecimiento en otros mamíferos pertenecían al grupo C, etc. Sin embargo, en la actualidad, el hombre es afectado con frecuencia también por los miembros de los grupos B, C, D y G (94).

Los grupos polisacáridos de los estreptococos son completamente atóxicos y funcionan como haptenos, ya que sólo actúan como inmunógenos cuando se encuentran unidos a la pared celular bacteriana (94).

#### f.1. Grupo C

Los datos reportados por Krause (58), indican que las paredes celulares de los estreptococos del grupo C contienen un mucopéptido similar al del grupo A, constituido principalmente por N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurámico, alanina, lisina, ácido glutámico y glicina. Análogamente, su carbohidrato específico de grupo, es también parecido al de S. pyogenes, ya que está compuesto por ramnosa y hexosamina; ésta, en el grupo C, es N-acetilgalactosamina y cons-

tituye el principal determinante antigénico de grupo.

#### f.2. Grupo G

En ciertos aspectos, el contenido químico de las paredes celulares y antígenos específicos de grupo de los estreptococos del grupo G, se asemeja a los del A y al C; mientras las paredes tripsinizadas de éstos presentan dos componentes principales: una matriz de mucopéptido formada por N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurámico y cuatro aminoácidos, y el carbohidrato específico de grupo, el cual está constituido por ramnosa y N-acetilhexosamina, el mucopéptido del grupo G es similar y los azúcares constituyentes del carbohidrato son ramnosa, N-acetilgalactosamina y galactosa. Estudios serológicos sugieren que el monosacárido L-ramnosa es el componente que determina su especificidad antigénica (22).

#### g. ESPECIES COMPRENDIDAS DENTRO DE LOS GRUPOS C Y G.

##### g.1. Grupo C

Las especies en este grupo son:

S. equisimilis

S. zooepidemicus

S. equi

S. dysgalactiae

las tres primeras son beta hemolíticas y la última produce reacción alfa (53); de acuerdo con Edwards (1934) (94), el grupo se subdivide en base a su acción sobre sorbitol y

trealosa.

S. equisimilis. Tal como S. pyogenes, fermenta trealo sa pero no sorbitol, pero es más resistente a la acción de la bilis: la mayoría de las cepas crecen en agar bilis al 10% e inclusive algunas lo hacen cuando la concentración se incrementa hasta 40%; los microorganismos que la integran no son capsulados y algunas cepas producen antígenos T y R. Mientras que la literatura inglesa menciona cinco serotipos, el Manual de Bergey reconoce ocho, de acuerdo con esquemas que utilizan reacciones de aglutinación, precipitación y características bioquímicas. Estos microorganismos se han aislado del tracto respiratorio superior de humanos y animales tanto normales como enfermos; las cepas que provienen de personas, son generalmente fibrinolíticas, mientras que las de origen animal no lisan la fibrina humana (26,94).

S. zooepidemicus. Los miembros de esta especie fermentan sorbitol pero no trealosa, son capsulados y, en cuanto al número de serotipos existentes, existe una gran discrepancia entre los investigadores: la literatura británica incluye dos, el Manual de Bergey ocho y, en una publicación reciente de la Sociedad Americana de Microbiología (72), se hace referencia a quince. Esta especie se ha aislado de la sangre, exudados inflamatorios y lesiones de animales enfermos: causan septicemia en vacas, conejos y cerdos y la mayoría de las cepas se han aislado de infecciones de heridas

en caballos, aunque algunos autores la han asociado con padecimientos en aves (26,94).

S. equi. Esta especie se caracteriza por ser tanto trealosa como sorbitol negativos, es la causa de obstrucciones respiratorias en equinos y se aísla con menor frecuencia en otros animales. La cápsula es demostrable en algunas cepas cuando se examinan cultivos jóvenes desarrollados en caldo adicionado de suero y, de acuerdo con Bazeley y Battle (1940), sólo existe un serotipo (26,94).

S. dysgalactiae. El nombre ha sido asignado por los médicos veterinarios para subrayar su carácter no hemolítico; se han reconocido al menos tres tipos serológicos y los microorganismos de esta especie se han aislado de la leche y la ubre de las vacas con mastitis aguda (26,94).

Además de estas cuatro especies, el polisacárido del grupo C se ha encontrado en unas pocas cepas de S. milleri (94).

#### g.2. Grupo G

El grupo G de Lancefield (Lancefield y Hare, 1935) no cuenta aún con un conjunto de especies universalmente aceptado (62,94).

Los estreptococos que poseen al polisacárido de grupo y presentan la forma de colonia "grande", con frecuencia se denominan S. canis, debido a que se han aislado de la gar-



ganta de los perros (72); estos microorganismos se asemejan a S. pyogenes: fermentan trealosa pero no sorbitol. De esta especie, se han reconocido al menos tres tipos serológicos mediante aglutinación; uno de ellos es el T-16 de Griffith. Varias cepas poseen el antígeno M-12 y algunas son ocasionalmente sensibles a la bacitracina. Estos microorganismos se han aislado principalmente del hombre y de la garganta de animales enfermos (particularmente del perro). Cabe mencionar que algunas cepas, en especial las que son fibrinolíticas, resultan indiferenciables de S. pyogenes, a menos que se realicen métodos serológicos (26,94).

Por otro lado, se distingue dentro de los estreptococos del grupo G, a los que siendo beta hemolíticos, producen colonias de la forma "diminuta"; estos últimos son denominados según el Manual de Bergey Streptococcus anginosus. Además de presentarse en estos microorganismos, el polisacárido del grupo G se encuentra ocasionalmente en algunas cepas de S. milleri (26,94).

#### h. CARACTERISTICAS CULTURALES Y BIOQUIMICAS DE LOS ESTREPTOCOCOS DE LOS GRUPOS C Y G.

##### h.1. Grupo C

S. equisimilis. La morfología microscópica y macroscópica de esta especie se asemeja a la de S. pyogenes: son células esféricas u ovoides que miden entre 0.6 y 1 micra de

diámetro y sus colonias en agar sangre, tras 18 a 24 horas de incubación, miden alrededor de 0.5 mm de diámetro y son circulares, convexas, de bordes regulares, transparentes o translúcidas; comúnmente presentan una superficie lisa o semimate (26,62) y, por lo general, se encuentran rodeadas por zonas de hemólisis beta cuyo tamaño es dos o aún cuatro veces mayor que el de la colonia (90).

Los miembros de esta especie producen ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa, trealosa, salicina y glicerol, aunque de éste solamente en condiciones aeróbicas. Normalmente no fermentan arabinosa, rafinosa, inulina, manitol y sorbitol y sólo las cepas de origen equino son lactosa negativa (26,94).

S. zooepidemicus. Su morfología celular y colonial es indiferenciable a la de S. pyogenes (26), esta especie produce ácido a partir de glucosa, sacarosa, sorbitol y salicina y su capacidad para fermentar lactosa y maltosa varía según las diferentes cepas; los microorganismos son consistentemente xilosa, arabinosa, trealosa, rafinosa, inulina, glicerol y manitol negativos (26,94).

S. equi. Esta especie presenta células ovoides o esféricas que también miden entre 0.6 y 1 micra de diámetro; en el pus, el eje largo de las células se dispone en forma transversal al de la cadena, aunque en ocasiones se muestra paralelo; en este último caso pueden parecer estreptobacii-

los. Se agrupan en pares o formando cadenas cortas o largas, siendo común encontrar en caldo las cadenas largas; en agar sangre, la colonia es húmeda en un principio pero se seca rápidamente transformándose al final en mate y manifiesta amplias zonas de hemólisis (26).

Este microorganismo manifiesta un patrón pequeño de fermentación: produce ácido a partir de glucosa, maltosa, sacarosa y salicina, pero no de arabinosa, lactosa, trealosa, rafinosa, inulina, glicerol, manitol o sorbitol (26).

S. dysgalactiae. Presenta células esféricas u ovoides que se encuentran formando cadenas de dimensiones regulares y, aunque sus colonias son similares macroscópicamente a las de S. pyogenes, esta especie es alfa hemolítica.

Con respecto a su comportamiento bioquímico, puede establecerse que producen ácido de glucosa, maltosa, sacarosa y trealosa, y no de rafinosa, inulina, glicerol o manitol; su actividad sobre lactosa, sorbitol y salicina es variable (26).

## h.2. Grupo G

En este grupo se pueden distinguir dos tipos de colonias: las denominadas "grandes", originadas por los microorganismos designados generalmente como S. canis, las cuales son microscópica y macroscópicamente indiferenciables de las cepas de S. pyogenes productoras de colonias "mate", y las consideradas "diminutas" (Streptococcus grupo G ti-

po I), cuyas células presentan un diámetro más pequeño que el común en el género, esto es, de 0.4 a 0.8 micras (38) y que manifiestan zonas de hemólisis total relativamente grandes, tras un tiempo de incubación de 48 a 96 horas.

Los microorganismos mencionados en primer lugar presentan el siguiente patrón bioquímico: producción de ácido a partir de glicerol (sólo en condiciones aeróbicas), glucosa, lactosa, sacarosa y trealosa; su actividad sobre salicina e inulina es variable y no actúan sobre manitol, sorbitol y rafinosa (26).

Por su parte, los que originan colonias "diminutas", producen ácido al utilizar glucosa, maltosa, salicina, rafinosa, sacarosa, lactosa y trealosa, mientras que no lo hacen a partir de inulina, xilosa, arabinosa, glicerol, manitol y sorbitol (26).

En la tabla 2.1 se resumen las características fermentativas de estos grupos.

TABLA 2.1

	Grupo	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Salicina	Arabinosa	Lactosa	Trealosa	Sorbitol	Rafinosa	Inulina	Glicerol	Manitol
<u>S. equisimilis</u>	C	+	+	+	+	-	+b	+	-	-	-	+a	-
<u>S. zooepidemicus</u>	C	+	v	+	+	-	v	-	+	-	-	-	-
<u>S. equi</u>	C	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<u>S. dysgalactiae</u>	C	+	+	+	v	ND	v	+	v	-	-	-	-
<u>S. canis</u>	G	+	ND	+	v	ND	+	+	-	-	-c	+a	-
Estreptococos de colonia "diminuta"	G	+	+	+	+	-	v	v	-	+	-	-	-

- a Sólo en condiciones aeróbicas
- b Las cepas equinas no fermentan lactosa
- c Existen cepas ocasionalmente positivas
- ND No determinado
- v Algunas positivas, otras negativas

## i. PRODUCTOS EXTRACELULARES PRODUCIDOS POR LOS GRUPOS A, C Y G.

Los estreptococos del grupo A elaboran una gran cantidad de productos extracelulares, muchos de los cuales se han estudiado ampliamente y se han puesto de manifiesto también en otros miembros del género.

### i.1. HEMOLISINAS.

En 1895, Marmorek (94) demostró que algunos estreptococos lisaban los glóbulos rojos y que este agente lítico era filtrable; posteriormente, Todd y Weld, establecieron que muchos miembros hemolíticos de este género producían dos lisinas distintas: una activa sólo en forma reducida y la otra oxígeno estable, a las que Todd (1938) designó respectivamente estreptolisina O y estreptolisina S. Ambas hemolisinas son entonces las responsables de las zonas de hemólisis alrededor de las colonias de estreptococos en agar sangre (24,53) y se diferencian principalmente por su antigenicidad y su susceptibilidad a la inactivación por oxidación: la estreptolisina O es antigénica y oxígeno lábil y, la S, no es inmunogénica pero sí estable en presencia de oxígeno.

ESTREPTOLISINA O (SLO). La SLO es una proteína de aproximadamente 50,000 a 60,000 daltons (52,53), con actividad hemolítica y letal sólo cuando está reducida; esta

última característica no varía sus propiedades antigénicas (94); aún cuando se inactiva en presencia de oxígeno, su capacidad lítica puede revertirse mediante la adición de agentes reductores (53,62), tales como cisteína o beta mercaptoetanol. Es producida por la mayoría de las cepas del grupo A y muchas del B, C, F y G (100), pero no se ha detectado en los miembros de otros grupos; se sabe también que las lisinas O de los grupos A, C y G son idénticas inmunológicamente (94) y poseen actividad citotóxica para eritrocitos, leucocitos y células miocárdicas en cultivo de tejidos (53,94).

En 1939, Hewitt y Todd demostraron que el colesterol inhibía la actividad hemolítica y letal de la estreptolisina O y, por ello, se ha postulado que los glóbulos rojos tienen receptores de aquella naturaleza química en la membrana (38); es posible que por esta razón, la respuesta inmune producida por la SLO sea más potente después de una infección faríngea o sistémica que de una cutánea, ya que en la piel se encuentran una gran cantidad de lípidos que pueden provocar la inactivación local de la SLO (53); sin embargo, el colesterol que se encuentra en el suero normal no posee esta actividad (24,94). Por otra parte, la hemolisina en cuestión presenta reacciones inmunológicas cruzadas y propiedades similares a las lisinas oxígeno-lábiles de los neumococos, Clostridia y Bacillus (53,94).

ESTREPTOLISINA S (SLS). Es la responsable de la hemólisis presente alrededor de las colonias estreptocócicas incubadas aeróbicamente en las placas de agar sangre, aunque también es capaz de llevar a cabo su actividad biológica en condiciones anaeróbicas (26); es sintetizada por la mayoría de las cepas de los grupos A, B, C y G, y también por los miembros de otros, particularmente los alfa hemolíticos (94). En 1967, Bernheimer estableció que químicamente el agente hemolítico en cuestión era un polipéptido compuesto por tan sólo 28 aminoácidos y, por ende, determinó la razón de su aparente carencia de inmunogenicidad. Normalmente, su actividad es neutralizada por el suero humano, aunque ello no es debido a la presencia de anticuerpos, sino a otros de sus constituyentes normales aún no determinados; además, lisa a los eritrocitos más lentamente que la SLO y, como es inhibida por fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (53), los investigadores postulan que, probablemente, su acción se desarrolla sobre los fosfolípidos de las membranas celulares de los mamíferos y/o de sus organelos subcelulares.

1.2. EXOTOXINA PIROGENA (TOXINA ERITROGENICA). La mayoría de las cepas de los estreptococos del grupo A producen esta toxina, la cual es responsable del exantema que se presenta durante la fiebre escarlatina (24,52); existen por



lo menos tres formas inmunológicamente diferentes: A, B y C (24,26,53), siendo sus pesos moleculares: 8,000, 17,000 y 13,200 daltons, respectivamente; las tres son termolábiles y relativamente estables frente a ácidos, álcalis y pepsina (53).

Watson (38) y sus colegas, estudiaron las toxinas pirogénicas producidas por los estreptococos y observaron que mostraban propiedades eritrogénicas sólo en animales sensibles, la toxicidad primaria se manifestaba como pirogenicidad, letalidad, citotoxicidad, inmunosupresión, un aumento dramático de la susceptibilidad del huésped a las endotoxinas de bacilos Gram negativos y los efectos secundarios eran el resultado de la hipersensibilidad; algunos autores sugieren que las características anteriores son las responsables de los síntomas que se presentan en la fiebre escarlatina y, que la última es la que provoca el exantema (94); por esta razón, se prefiere emplear el término "exotoxinas pirógenas estreptocóccicas" para designar a estas substancias.

Aunque mucho se desconoce acerca de sus mecanismos moleculares de acción, se ha logrado detectar que la toxina tipo C causa un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica frente a las endotoxinas y bacterias, y ejerce su efecto pirético actuando directamente sobre el hipotálamo (53).

Por lo expuesto anteriormente, es muy probable que se tenga que modificar lo que se piensa acerca del efecto de estas toxinas, en el sentido de que la reacción de enrojecimiento producida en la piel al aplicar la toxina, indica que el individuo no posee inmunidad y que aquellos que sí cuentan con ella, no presentan alteración alguna, porque se propone que dicho exantema se debe al fenómeno de hipersensibilidad y no a la falta de inmunidad.

Estas toxinas inducen la respuesta inmune provocando la formación de antitoxina específica, la que inyectada en alguna zona enrojecida de pacientes con escarlatina, produce la decoloración correspondiente de ésta, debido a la neutralización de la toxina (reacción de Schultz-Charlton); cabe señalar que las personas que poseen antitoxina, aunque no muestren exantemas, porque se neutralice la acción de la toxina, continuarán siendo susceptibles a la infección estreptocócica (52).

Anteriormente se consideraba que estas toxinas sólo eran producidas por determinadas cepas de S. pyogenes infectadas por fagos lisogénicos (que les confieren la información genética requerida para su síntesis), ahora se sabe que, además, este fenómeno puede presentarse en los grupos C y G (24).

i.3. NUCLEASAS. Los estreptococos del grupo A elaboran cuatro nucleasas serológicamente distintas, designadas con las letras A a la D, todas las cuales actúan como DNAsas y, las de los tipos B y D, exhiben además actividad sobre el RNA (26,94); los diferentes serotipos tienen pesos moleculares que varían entre 25,000 y 30,000 daltons y requieren de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para desarrollar su actividad óptima (53, 101), siendo ésta independiente de la tensión de oxígeno (Deibel, 1963) (26). Debido a que estas enzimas no penetran la membrana plasmática de las células pertenecientes a mamíferos, no son citotóxicas, sin embargo, son capaces de despolimerizar el DNA que se acumula en el pus como resultado de la desintegración de los leucocitos polimorfonucleares; por esta razón, los productos comerciales que contienen estreptocinasa y desoxirribonucleasa estreptococcica (estrep-todornasa) se han empleado para licuar exudados purulentos (debridamiento enzimático) en enfermedades tales como el empiema neumococcico (24).

Entre los estreptococos que elaboran nucleasas se cuentan los de los grupos B, C, G y L, aunque según algunos investigadores, éstos lo hacen en menor proporción que los pertenecientes al A (94).

i.4. ESTREPTOCINASA (FIBRINOLISINA). En 1939, Tillet y Garner describieron una sustancia presente en los filtrados

de cultivos de estreptococos que promovía la lisis de los coágulos de sangre humana; inicialmente, se denominó fibrinolisis estreptocócica y, más tarde, se demostró que catalizaba la conversión del plasminógeno en plasmina, por lo que se le dió un nuevo nombre: estreptocinasa (24). La mayoría de los estreptococos de los grupos A, C y G la producen, pero en cantidades que varían de una cepa a otra (94); se han logrado identificar dos variantes de la enzima: A y B, diferentes tanto en antigenicidad como en movilidad electroforética (24).

Experimentos efectuados en animales de laboratorio, sugieren que la estreptocinasa, en presencia de plasminógeno humano, puede aumentar la severidad de las lesiones estreptocócicas. De acuerdo con Ward (1967) (94), la plasmina generada por la acción de la estreptocinasa actúa sobre el componente C3 del complemento para redituar un producto con actividad quimiotáctica; aunque frecuentemente se ha mencionado que su acción es interferir la formación de barreras de fibrina para permitir así que el microorganismo se disemine eficazmente, no existe evidencia concluyente que apoye esta atractiva hipótesis. De hecho, la invasividad de las lesiones estreptocócicas no parece estar afectada por los anticuerpos antiestreptocinasa (24).

i.5. DIFOSFOPIRIDIN NUCLEOTIDASA (DPNasa). La mayoría de

las cepas de los grupos A, C y G (26) producen una enzima extracelular que hidroliza al difosfopiridín nucleótido, denominada DPNasa (nicotinamida adenina dinucleotidasa) o NADasa y que libera nicotinamida a partir del difosfopiridín nucleótido (24,26). Esta exoenzima muestra efectos leucotóxicos sólo cuando las células estreptocócicas son ingeridas por los fagocitos (18,94).

Según Lazarides y Bernheimer (1957) (94), la DPNasa está presente en algunos tipos M (3 y 12) pero no en otros (1 y 19) (94).

1.6. HIALURONIDASA. Muchos estreptococos, incluyendo aquellas cepas que tienen cápsulas de ácido hialurónico, producen hialuronidasa (94); sin embargo, la producción de cápsula y hialuronidasa rara vez coinciden: al agregarse hialuronidasa a un cultivo de una cepa normalmente capsulada, se impide la detección de cápsulas porque éstas se destruyen. Muchos estreptococos que forman ácido hialurónico durante la etapa temprana de su crecimiento in vitro, producen posteriormente hialuronidasa la cual hidroliza al ácido hialurónico (94). Sólo ciertas cepas del grupo A (principalmente aquéllas que pertenecen a los tipos 4 y 22) producen la enzima in vitro y nunca forman cápsula (24).

La síntesis de la enzima, la efectúan no sólo los grupos A y C sino también los B, R, S, T, S. canis, los neumoco

cos, e inclusive cepas de otros estreptococos no hemolíticos.

La hialuronidasa es antigénica, la forma producida por las cepas del grupo A es inmunológicamente distinta a la sintetizada por las del C y el G (94); aunque anteriormente se le llamó "factor de diseminación" por su impresionante efecto lítico sobre la sustancia fundamental del tejido conectivo, existe poca evidencia experimental de que la hialuronidasa favorezca la invasión de los tejidos por los estreptococos bajo condiciones naturales (94).

En relación al grupo C, Timoney (93) demostró que en cepas de S. equi productoras de cápsula, la presencia de la enzima se encuentra asociada a un fago temperado; el autor sugiere también que la hialuronidasa relacionada con el correspondiente virus, es la responsable de que estos microorganismos originen colonias mate. Por último, respecto a la función de la enzima asociada al fago, se piensa que ésta permite la penetración del virus a la cápsula de las nuevas células huésped.

Además de producir estas sustancias extracelulares que comparten otros grupos, los estreptococos del grupo A también producen ATPasa, fosfatasa, esterasas, amilasa, N-acetilglucosaminidasa, neuraminidasa, lipoproteínasa, una toxina cardiohepática y, bajo condiciones adecuadas (especialmente cuando disminuye el pH del medio), una proteasa que

es capaz de hidrolizar varias proteínas elaboradas por el mismo microorganismo, incluyendo la estreptolisina O, la estreptocinasa, la hialuronidasa y el antígeno M (24,53, 94).

### III. PATOLOGIA

La importancia de los diferentes grupos serológicos como agentes etiológicos de diversas enfermedades en humanos se ha puesto de manifiesto ultimamente a pesar de que fueron caracterizados por Rebeca Lancefield desde 1933.

Con respecto a los grupos C y G, se describen a continuación las enfermedades que causan con mayor frecuencia.

#### a.1. ENDOCARDITIS INFECCIOSA.

Aunque anteriormente no se les señalaba papel alguno en esta enfermedad, los estreptococos de los grupos C y G pueden encontrarse como agentes etiológicos del padecimiento, que se define como una infección en el endocardio (11,14, 16,17,25,35,37,42,61,65,80,87,95,97). Durante muchos años, la endocarditis infecciosa se ha clasificado como aguda o subaguda en función de la velocidad de la evolución; la primera se debe con mayor frecuencia a Staphylococcus aureus y en menor proporción a neumococos, estreptococos del grupo A, gonococos u otros agentes como H. capsulatum, Brucella y Listeria (11,49). A menudo se presenta en válvulas cardíacas normales, causando su destrucción rápida y provocando elevados índices de mortalidad, no obstante la administración de tratamientos apropiados (11). Por lo general, su duración es de días a semanas y se presenta como consecuencia



de la existencia de otros focos metastásicos.

En el caso de la endocarditis infecciosa subaguda, ésta se presenta en personas con lesiones cardíacas congénitas o adquiridas, previas al establecimiento de los microorganismos implicados y, normalmente, puede durar meses e inclusive uno o dos años; la mayoría de las veces (aproximadamente un 50% de los casos), se debe a estreptococos del grupo viridans (generalmente S. sanguis y S. mitis), los cuales se encuentran formando parte de la flora bacteriana de la boca y de las vías respiratorias superiores; les sigue en frecuencia S. faecalis (15%), el cual está presente en la flora perineal y fecal, este microorganismo afecta principalmente a personas de edad avanzada, en las que comúnmente también está causando padecimientos genitourinarios (11,49). En relación al porcentaje de incidencia de estos microorganismos, en los últimos años se ha visto una tendencia creciente de endocarditis enterocócica y una frecuencia menor de Streptococcus viridans (11). El resto de los microorganismos que se encuentran causando la enfermedad, incluye los estreptococos del grupo A y otros grupos y, además, otras bacterias tales como Salmonella, Streptobacillus, Serratia, Bacteroides, Haemophilus, Brucella, Neisseria, Listeria y los difteroides; aunque los bacilos Gram negativos originan menos del 15% de los casos, su incidencia es considerablemente elevada en pacientes con próte-

sis cardíacas y toxicómanos. Por otra parte, los hongos que más comúnmente causan el padecimiento son Candida, Aspergillus e Histoplasma. Los dos primeros a menudo se presentan en pacientes con catéteres intravenosos o que han recibido corticoesteroides, antimicrobianos de amplio espectro o sustancias citotóxicas. Además, existen reportes de que también Blastomyces, Cryptococcus, Mucor y Torulopsis han causado endocarditis (11).

Ambas formas mencionadas de la endocarditis (aguda y subaguda) pueden ser provocadas tanto por los estreptococos del grupo C como por los pertenecientes al G. Debido a que la correlación existente entre agente infeccioso, velocidad de la evolución y valvulopatía subyacente no siempre es perfecta, en ocasiones resulta más útil clasificar la infección de acuerdo al microorganismo responsable (por ejemplo, endocarditis enterocócica, etc.) que subdividirla en aguda y subaguda.

En la enfermedad causada por Streptococcus viridans, al parecer la puerta de entrada es la infección de la cavidad bucal y, en el caso de pacientes sin dentadura, se asocia a úlceras bucales por dentaduras artificiales mal adaptadas. Por su parte, la endocarditis debida a los enterococos, aparece en ocasiones después de intervenciones quirúrgicas de las vías urinarias, del aparato digestivo o por el uso prolongado de catéteres intravenosos (11).

En general, la edad media de los pacientes con endocarditis infecciosa varía de 40 a 50 años y aproximadamente el 50% o más son mayores; es poco frecuente en niños y se presenta más en hombres que en mujeres.

#### SIGNOS Y SINTOMAS DE LA ENFERMEDAD:

En la endocarditis infecciosa subaguda, aunque la fiebre es infalible, puede pasar desapercibida o manifestarse sólo por la tarde; en la mayoría de los casos se presenta leucocitosis pero, en general, ésta no rebasa cifras de 15,000 GB/mm<sup>3</sup>, pudiendo ser normal en muchas ocasiones. Los escalofríos se presentan con poca frecuencia, las pruebas anormales que se asocian comúnmente con enfermedad inflamatoria también son positivas, incluyendo sedimentación globular incrementada, proteína C reactiva positiva, factor reumatoide positivo e incremento de la gamma globulina sérica. Los frotis de sangre periférica, particularmente los provenientes del lóbulo de la oreja, muestran una gran cantidad de macrófagos, la esplenomegalia es detectable casi en todos los casos y generalmente existe soplo cardíaco; la presencia de petequias se atribuye a la vasculitis que acompaña a la endocarditis y prevalece principalmente en brazos, pecho, abdomen y axilas; una característica propia de estas máculas es la de no perder su color bajo presión.

Otros signos que pueden estar presentes en el padecimiento son: hemorragias en astilla (líneas subungueales de

color rojo oscuro), manchas de Roth (hemorragias retinianas ovales con un centro claro y pálido), nódulos de Osler (son pequeños nódulos hipersensibles que se encuentran con mayor frecuencia en las yemas de los dedos de manos o pies y que persisten horas o días) y las lesiones de Janeway (son zonas hemorrágicas no hipersensibles y maculares que se presentan en palmas y plantas; se observan más en la endocarditis infecciosa aguda).

Los signos y síntomas de la endocarditis infecciosa aguda son semejantes a los descritos para la forma subaguda, pero la fiebre, que generalmente es intermitente, los escalofríos y la leucocitosis (20,000 a 30,000 GB/mm<sup>3</sup>) son más pronunciados; por lo general, la anemia severa es rara y el bazo, aunque normalmente se encuentra aumentado de tamaño, difícilmente se palpa. Las petequias y artralgias y los otros signos mencionados son poco comunes.

La enfermedad se inicia de manera abrupta, está precedida regularmente por infecciones supurativas, es de evolución rápida y, en la mayoría de los casos resulta mortal (21,49).

Estos y otros signos y síntomas que corresponden a ambas formas de la enfermedad, se resumen en el cuadro 3.1.

CUADRO 3.1

SIGNOS Y SINTOMAS DE LA ENDOCARDITIS INFECCIOSA	
ENDOCARDITIS AGUDA	ENDOCARDITIS SUBAGUDA
Fiebre elevada (39° a 40°C)	Fiebre de 38° a 38.5°C, de curso prolongado y predominio vespertino
Escalofríos	
Esplenomegalia (40%)	Esplenomegalia
Soplos cardíacos	Soplos cardíacos que va- rían en sitio e intensi- dad
Hemorragias en astilla (4.6%)	Anorexia
Manchas de Roth (4.6%)	Anemia
Nódulos de Osler (1.5%)	Fatiga
Lesiones de Janeway (3%)	Pérdida de peso
Mialgias y artralgias	Embolia (émbolos bacte- rianos o de fibrina)

Con respecto a la endocarditis causada por estreptococos beta hemolíticos, una revisión de la literatura (14) publicada en 1978 indicó que, de 68 casos, la distribución de los grupos serológicos, había sido la siguiente:

GRUPO SEROLOGICO	NUMERO DE CASOS
A	5
B	24
C	8
G	14
H	7
K	3
L	3
M	2
O	2
TOTAL	68

Por lo que se refiere al grupo G, han aparecido posteriormente otras publicaciones que subrayan su importancia en la incidencia de endocarditis y establecen que el tipo de colonia "grande" (S. canis) es la de mayor frecuencia (14,17,61,95,97); además, se ha podido observar que dichos microorganismos pueden causar tanto la forma aguda como la subaguda; esta última, es poco común durante la primera década de la vida y, cuando se presenta en la niñez, se asocia más a enfermedades congénitas del corazón que a procesos reumáticos. Tal es el caso del padecimiento que se presentó en un niño de 11 años con valvulopatía congénita (97); los estudios de laboratorio realizados en este paciente proporcionaron los siguientes resultados: título de antiestrep-

tolisina 0, 833 unidades Todd, proteína C reactiva positiva y factor reumatoide negativo; lógicamente a los 12 días de estar hospitalizado, se sospechó el desarrollo de fiebre reumática aguda, instituyéndose una terapia antiinflamatoria; una nueva titulación de antiestreptolisina reveló 1,250 U Todd y fue hasta que se aisló al estreptococo del grupo G del cultivo de garganta, que pudo determinarse que el foco metastásico eran las vías respiratorias altas.

Un análisis de 16 casos de endocarditis producida por el grupo G (61) aporta la siguiente información: la población adulta es la más frecuentemente afectada (la edad media fue de 52 años) e involucra generalmente a las válvulas cardíacas del lado izquierdo (de los 16 casos, en 10 estaba afectada la mitral y en 5 la aórtica); la mortalidad, a pesar de que la terapéutica incluya penicilina, es alta (aproximadamente del 30%) al contrario de lo que sucede en otros pacientes con endocarditis debida a estreptococos sensibles a la penicilina; además, existe destrucción valvular aguda a un grado tal, que se requiere el reemplazo de la válvula.

Generalmente los estreptococos del grupo G son extremadamente sensibles a la penicilina, sin embargo, se han detectado cepas resistentes; por ejemplo, Noble (76) publicó un trabajo en el que se demostró que el microorganismo toleró la acción de la penicilina e inclusive el de la vancomi-

cina; anteriormente, Blair (14) comprobó que algunas bacterias eran menos sensibles a cloramfenicol y vancomicina; esto tiene gran importancia clínica porque la vancomicina es, normalmente, la droga de elección para tratar la endocarditis estreptocócica, cuando el paciente es alérgico a la penicilina.

En cuanto a la endocarditis causada por el grupo C, para 1982 se sabía de aproximadamente 14 casos (16,25,37,42,65,80,87). Estos microorganismos pueden producir tanto la forma aguda como la subaguda y, en algunos casos, se ha sugerido que los animales pueden ser la fuente de infección, siendo S. equisimilis la especie de mayor frecuencia, seguida por S. zooepidemicus. Por otro lado, existen reportes de que al igual que los del grupo G, pueden causar un aumento de anticuerpos contra la SLO.

A pesar de que todos los miembros de este grupo son sensibles a la penicilina, una publicación (80) destaca su resistencia a este antibiótico, encontrándose que la diferencia entre la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) fue de 128 veces, por lo que estos autores sugieren que al inicio de la terapia de la endocarditis, se emplee la combinación de penicilina y gentamicina mientras se obtienen los resultados de las pruebas de sensibilidad correspondientes.

Aunque de un total de 4,705 casos revisados de endocar



ditis, los estreptococos beta hemolíticos sólo causaron el 0.5%, es importante subrayar que los grupos C y G han originado la enfermedad tanto a pacientes con valvulopatía preexistente como a otros sin previa alteración clínica.

#### a.2. SEPTICEMIA NEONATAL.

En el neonato, la septicemia representa una infección bacteriana generalizada, en la que se obtienen generalmente cultivos positivos de sangre y que afecta al enfermo frecuentemente durante las primeras cuatro semanas de vida. Este padecimiento, en ausencia de tratamiento, tiene consecuencias fatales y no todos los casos pueden tratarse exitosamente con los agentes antimicrobianos con los que se dispone en la actualidad (46). En el canal del parto puede existir una gran cantidad de microorganismos, algunos de los cuales son altamente virulentos; entre los más importantes, se cuentan: cocos Gram positivos (Staphylococcus y Streptococcus), cocos Gram negativos (N. meningitidis y N. gonorrhoeae), bacilos entéricos Gram negativos (E. coli, Proteus, Klebsiella, Pseudomonas, Salmonella, etc.), algunos anaerobios (Bacteroides fragilis), virus (citomegalovirus, herpes, rubéola), hongos, clamidias, micoplasmas y protozoarios (Trichomonas vaginalis y Toxoplasma gondii). De los anteriores, sólo algunos se encuentran constantemente involucrados en casos de septicemia neonatal, siendo variable su inciden-

cia de un hospital a otro y de una década a otra (5); sin embargo, cabe señalar que, de los agentes bacterianos, los microorganismos tales como E. coli, Klebsiella, Staphylococcus aureus, Streptococcus del grupo B y los enterococos, son los de más elevada frecuencia (5,46).

Para propósitos terapéuticos y epidemiológicos existen, para la mayoría de los autores, dos formas de enfermedad: la de inicio temprano y la de inicio tardío, las cuales presentan características diferentes, según se muestra en el cuadro 3.2 (5,46).

CUADRO 3.2

SEPTICEMIA NEONATAL		
CARACTERISTICAS PRINCIPALES	INICIO TEMPRANO	INICIO TARDIO
Edad de inicio	Primeras 48 horas de edad	Más de 7 días de edad
Complicaciones obstétricas	Frecuentes	No frecuentes
Niños prematuros	Frecuente	No frecuente
Signos dominantes:		
Enfermedad respiratoria	Frecuente	No frecuente
Meningitis	No frecuente	Frecuente
Modo de transmisión	Madre a hijo	Contacto con equipo contaminado y humanos infectados
Mortalidad	Alta	Relativamente baja

La enfermedad de inicio temprano es multisistémica y casi siempre provoca la muerte durante los primeros días de vida. Los enfermos tienen antecedentes de complicaciones obstétricas tales como ruptura prematura de membranas, corioamnionitis o fiebre materna preparto; la mayoría son prematuros, con bajo peso al nacer y adquieren al patógeno al pasar a través del canal del parto durante el nacimiento. El índice de mortalidad que muestra esta forma del padecimiento varía entre el 15 y 50 por ciento.

La forma de inicio tardío ocurre comúnmente después de la primera semana de vida, aunque en algunas ocasiones se presenta dentro de los cinco días que siguen al nacimiento; aquí, la mayoría de las infecciones se adquieren al entrar en contacto el neonato con el material y/o equipo contaminado, o bien con personas portadoras de patógenos que laboran en los hospitales; en este caso, los principales microorganismos son Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa y su mortalidad es menor comparada con la exhibida por las de inicio temprano (10 a 20 por ciento) (5).

Las manifestaciones clínicas de la septicemia neonatal pueden considerarse semejantes a las de otras afecciones no infecciosas; los signos más frecuentes son: disnea, hiper o hipotermia, anorexia, irritabilidad, sopor y astenia. Otros datos menos comunes son el vómito y la diarrea; además, dependiendo de la gravedad, se pueden agregar períodos de ap-

nea, ictericia, petequias, equimosis y escleroderma, los cuales son de mal pronóstico. Pueden existir, por otro lado, manifestaciones clínicas relacionadas con otros focos sépticos tales como meningitis, neumonía, otitis, onfalitis, artritis y osteomielitis (5).

En muchas ocasiones, aún cuando se manifiestan signos y síntomas y existen ciertas evidencias de laboratorio, no es posible diferenciar las infecciones bacterianas de las causadas por otros agentes, ya que por ejemplo, el síndrome de rubéola congénita, la toxoplasmosis y las infecciones por citomegalovirus o herpes simple son indistinguibles de las septicemias neonatales bacterianas; sin embargo, cuando estas afecciones tienen origen en el útero, generalmente se asocian con abortos o malformaciones congénitas (46). Además de éstos, otros padecimientos presentes en el recién nacido que pueden confundirse clínicamente con la septicemia son: tuberculosis, histoplasmosis diseminada y coccidiodomicosis; por tal motivo, deberán considerarse sus respectivos agentes etiológicos en los análisis microbiológicos correspondientes.

Ahora bien, aunque la septicemia por estreptococos en el neonato se asocia más comúnmente a los microorganismos pertenecientes a los grupos A, B y D de Lancefield (5,8), existen casos publicados en los cuales el agente causal es del grupo G (2,4,8,15,30,68,74).

Como se mencionó anteriormente, los estreptococos del grupo G comprenden dos especies diferentes, establecidas de acuerdo a su morfología macroscópica y características bioquímicas (17): una es productora de colonias "grandes" (S. canis) y otra de tipo "diminuto" (S. anginosus); como ambas pueden aparecer con cierta frecuencia formando parte de la flora normal de garganta, piel, tracto gastrointestinal y tracto genital femenino, no resulta sorprendente que se encuentren causando la enfermedad en el neonato.

Cuando se realizó una revisión de los casos de septicemia neonatal (30) que se presentaron durante un período de cinco años (del 10. de julio de 1974 al 10. de julio de 1979) en los recién nacidos del Hospital de Nueva York, de un total de 305, siete fueron causados por el grupo G; por lo tanto puede establecerse una incidencia de 0.5 por cada 1,000 nacimientos, en comparación, sólo ocurrieron seis casos del grupo B, correspondiendo su frecuencia a 0.43 por cada 1,000 nacimientos.

La septicemia neonatal ocasionada por el grupo G, no había sido mencionada sino hasta 1974 cuando Baker (8) la reportó en un infante que nació después de sólo 34 semanas de gestación con bajo peso (1,450 gramos). Aquí, fue posible establecer como fuente de infección a la madre, ya que mediante cultivo vaginal se detectó a la misma bacteria que se identificó como estreptococo beta hemolítico del grupo G

productor de colonia "diminuta" (S. anginosus). Los microorganismos aislados resultaron susceptibles a penicilina G, ampicilina, eritromicina, lincomicina, cloramfenicol y cefalotina y resistentes a gentamicina, kanamicina y estreptomomicina.

Las demás publicaciones no indican la especie que se ha aislado y sólo en una (2) se reporta la realización de las pruebas bioquímicas que diferencian entre las dos que integran al grupo G; destacándose que S. canis produjo dos casos de septicemia neonatal. Los recién nacidos que padecieron la enfermedad presentaron al menos una de las siguientes complicaciones: nacimiento antes de completarse el embarazo (prematurez), bajo peso al nacer o ruptura prematura de membranas; en un caso reportado que no presentó ninguna de las anteriores, el origen del padecimiento se asoció a la manipulación mecánica (74).

En general, la forma de septicemia desarrollada por los infantes fue la de inicio temprano ya que en la gran mayoría, al efectuarse el cultivo de la vagina de la madre, sí se pudo aislar al mismo estreptococo y por consiguiente se concluyó que ésta había sido la fuente de infección.

En dos casos (68,74), a pesar de que se llegó a la identificación del agente causal y la terapia que se aplicó fue la correcta, los recién nacidos fallecieron.

En la literatura, únicamente existe publicado un caso

de septicemia neonatal debida a estreptococos del grupo C, en el cual el paciente desarrolló también meningitis (91); se trataba de un niño de 14 días de nacido con un peso de 3,180 gramos, al que no se le pudo establecer la fuente de infección.

### a.3. MENINGITIS

Hasta antes de 1977, no existían reportes que citaran al grupo C como responsable de esta enfermedad, pero a partir de esa fecha las publicaciones han empezado a mencionar este hecho con cierta frecuencia (1,23,42,64,69,81,91).

La meningitis es un proceso inflamatorio que afecta las cubiertas del sistema nervioso central, concretamente, meninges y encéfalo (19). Una gran cantidad de microorganismos pueden producir el padecimiento, siendo los más importantes:

H. influenzae tipo b

S. pneumoniae

N. meningitidis

M. tuberculosis

T. pallidum

virus

Los tres primeros producen alrededor del 70% de las meningitis piógenas (11); las frecuencias relativas con que aparecen las diferentes especies, guardan relación con la

edad, por ejemplo, en el neonato, los bacilos Gram negativos como E. coli y Pseudomonas son, junto con los estreptococos del grupo B, los de mayor incidencia. Después del primer mes de vida y durante la mayor parte de la infancia, prevalece H. influenzae tipo b; en adultos, S. pneumoniae y N. meningitidis producen la mayor parte de los casos. Los factores que se encuentran relacionados con la etiología de la meningitis son: la edad, otros focos de infección (S. pneumoniae y H. influenzae), intervenciones quirúrgicas y/o fracturas de cráneo, inmunodeficiencias, deficiente estado nutricional y, en casos especiales, la localización geográfica del paciente (19). Así por ejemplo, en los individuos afectados por enfermedades anergizantes o en los que reciben fármacos inmunosupresores, los estreptococos, Staphylococcus aureus y diversos agentes infecciosos oportunistas pueden ser los causantes del padecimiento.

Generalmente, las infecciones meningoencefálicas son consecuencia de la entrada de los microorganismos a la sangre a partir de focos de infección extraencefálica aunque también pueden producirse porque el agente causal se instala en encéfalo (infección directa) o por continuidad (otitis media, mastoiditis).

El comienzo clínico de la meningitis piógena suele ser repentino, con cefalalgia intensa, fiebre (37.5° a 41°C), vómitos y escalofríos; la enfermedad progresa rápidamente



presentándose letargo, confusión, delirio, estupor y pérdida del conocimiento. Todas las variantes de meningitis presentan los signos de irritación meníngea, esto es, cuello rígido y signos positivos de Kerning o de Brudzinski (11).

El signo de Kerning, se presenta debido a hipertonia muscular provocada por la meningitis, que se hace evidente por el dolor o resistencia a la extensión completa de las rodillas estando los muslos en ángulo recto con el cuerpo.

En el signo de Brudzinski, al doblar la cabeza del paciente (anteroflexión) se produce un movimiento de flexión de los muslos y piernas. Al realizar la flexión pasiva de los miembros inferiores se provoca un movimiento similar del miembro opuesto al que también se le denomina reflejo contralateral.

Si bien algunos pacientes sufren meningitis bacteriana sin presentar síntomas respiratorios, la mayor parte de los que se ven afectados por alguno de los tres agentes etiológicos más comunes presentan antecedentes o síntomas asociados a infección de las vías respiratorias: otitis media, mastoiditis o neumonía (11,21).

Cuando se administra el tratamiento adecuado en forma inmediata, la mayoría de los pacientes sobreviven; sin embargo, aproximadamente el 20% experimenta secuelas neurológicas permanentes, tales como hidrocefalia, ceguera, sorde-

ra, parálisis de nervios craneales, convulsiones, retardo mental y aparición ulterior de abscesos cerebrales.

Acercas de los estreptococos del grupo C que ocasionan meningitis, aunque se sabe que pueden residir en el tracto genital femenino, no se ha podido relacionar su presencia en ese sitio, con la aparición de la enfermedad en recién nacidos; no obstante, Appelbaum (1) y Stewardson (91) han publicado su participación en la meningitis neonatal. En el caso de los adultos, la enfermedad se ha asociado con el contacto con animales y, en un reporte (64), se logró identificar la fuente de infección al aislar al mismo microorganismo de la garganta de un caballo; las especies que se han encontrado con mayor frecuencia son: S. zooepidemicus y S. equisimilis.

Los grupos que con mayor frecuencia producen la enfermedad son: A, B y D; refiriéndose al género (excluyendo a S. pneumoniae), puede establecerse que ocasionan aproximadamente el 10% del total de las meningitis bacterianas (69) y que generalmente, la enfermedad evoluciona a partir de una fuente primaria de infección, tal como la otitis media, mastoiditis, endocarditis o un trauma craneoencefálico; sin embargo, en algunos casos debidos al grupo C no se han detectado infecciones previas a su incidencia (64).

En relación a la especie alfa hemolítica (S. dysgalactiae), puede considerarse que no es un microorganismo que

causa el padecimiento con regularidad: únicamente se conoce un reporte de meningitis en una recién nacida, la cual respondió bien a la terapia con penicilina y tobramicina (81).

#### a.4. FARINGOAMIGDALITIS.

En la faringe puede encontrarse prácticamente cualquier agente infeccioso; sin embargo, para fines prácticos, el padecimiento puede subdividirse, de acuerdo a su etiología, en faringoamigdalitis estreptocócica y no estreptocócica (19). En la primera, interviene de una manera relevante el estreptococo beta hemolítico del grupo A, ya que no sólo ocasiona las molestias que la enfermedad produce comúnmente en el paciente, sino también las secuelas no supurativas tales como la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda (19).

El grupo A puede encontrarse en casi un tercio de los pacientes con faringitis aguda y, aunque afecta predominantemente a los individuos en edad escolar (de 5 a 7 años), no resulta difícil aislarlo en otros grupos etarios.

El cuadro clínico de la faringoamigdalitis se caracteriza por la aparición abrupta de escalofríos, dolor abdominal, cefalea intensa, dolor y ardor faríngeos que se agudizan durante los movimientos de la deglución. La exploración de la zona muestra una faringe intensamente roja o edemato-

sa, amígdalas hipertróficas con puntos purulentos, edema de la úvula y petequias en el paladar blando. Este cuadro no siempre se presenta en la forma anteriormente descrita, ya que puede adoptar la apariencia de un cuadro catarral o bien puede ser que las manifestaciones faringoamigdalinas sean poco aparentes. Otra bacteria que es capaz de producir el mismo patrón es Corynebacterium diphtheriae.

Con respecto a la faringoamigdalitis no estreptocócica, ésta se debe, en su mayoría, a agentes virales; los más frecuentes son los adenovirus: son responsables del padecimiento en niños menores de 3 años, independientemente de que pueden afectar a otros grupos etarios; este grupo de virus es capaz de ocasionar un cuadro indistinguible del estreptocócico (19); los otros virus que producen faringoamigdalitis son: el grupo herpes (herpes virus humano tipos 1 y 4) y Coxsackie A. También es posible encontrar en faringe a otros agentes bacterianos que tienen la capacidad de producir patología, tales como S. pneumoniae, H. influenzae, B. pertussis y M. pneumoniae.

En relación a los estreptococos beta hemolíticos de los grupos C y G, existen algunos reportes que los mencionan como causantes de faringoamigdalitis (13,41,67,84); uno de ellos se refiere al estudio sobre enfermedades respiratorias que se realizó en EUA durante el período comprendido de 1958 a 1969 y que incluyó afecciones de las vías respiratorias al

tas y bajas (faringoamigdalitis, bronquitis y neumonía) (67); en esta investigación, los estreptococos beta hemolíticos se aislaron de faringe en el 7.1% de los adultos y en el 9.3% de los niños de la población considerada. En dos terceras partes de los cultivos correspondientes a los adultos, desarrollaron los de los grupos B, C y G y sólo en el tercio restante se manifestó el grupo A; en los niños, se presentó la misma distribución pero en forma invertida.

Por otro lado, refiriéndose a los casos de faringitis que ocasionan los grupos C y G (13,29,50,66), hasta el momento no se puede establecer una asociación entre ellos y la fiebre reumática, a pesar de que los síndromes que se observan en las epidemias están relacionados con la incidencia de esta afección.

Por lo que respecta a la glomerulonefritis, sólo en un brote de faringitis (29) se le señala como secuela de infección faríngea originada por estreptococos del grupo C (S. zooepidemicus). Cabe señalar que las manifestaciones de la enfermedad faríngea e incluso la elevación de los anticuerpos antiestreptolisina O que provocan los grupos C y G son semejantes a las producidas por el grupo A (13,50,66,67); por esta razón no debe pensarse en este último grupo como el único que puede originar patologías relacionadas con títulos elevados de anticuerpos contra la SLO.

## a.5. NEUMONIA.

En la infección del parénquima pulmonar, los microorganismos causales pueden llegar a los pulmones tanto por vía aérea (que es lo más frecuente) como por vía hematogéna. Existe una diversidad de agentes etiológicos capaces de producir neumonía; los principales son los siguientes (59):

Bacterias: S. pneumoniae

Especies estreptocócicas

Staphylococcus aureus

H. influenzae

E. coli

K. pneumoniae

Legionella pneumophila

y otras Gram negativas

Virus: Influenza

Parainfluenza

Adenovirus

Sincicial respiratorio

Rinovirus

Otros: Mycoplasma pneumoniae

Toxoplasma gondii

Histoplasma capsulatum

Coccidioides immitis

Pneumocystis carinii

Desde el punto de vista práctico, es importante diferenciar a la neumonía que se origina en el individuo previamente sano (neumonía primaria), de la que se presenta en el paciente con una enfermedad subyacente o con cualquier causa que lo predisponga a la infección (neumonía secundaria). Es muy probable que la neumonía primaria sea inicialmente de origen viral y, posteriormente, bacteriano. Por lo que respecta al foco infeccioso en la neumonía secundaria, uno posible es el intestino, ya que los microorganismos Gram negativos se aíslan con bastante frecuencia.

En cuanto a las manifestaciones clínicas que pueden aparecer, independientemente del tipo de neumonía, están las siguientes: fiebre, anorexia, vómito, malestar general, disnea, polipnea, aleteo nasal, tiros, cianosis así como tos, cuyas características varían de acuerdo al estado evolutivo, generalmente al principio es seca y posteriormente se vuelve húmeda; lógicamente, la intensidad de los signos estará de acuerdo a la gravedad del caso. Sin embargo, es importante señalar que en el recién nacido con frecuencia no hay fiebre sino hipotermia y, además, la tos suele no presentarse (59).

En relación a los casos de neumonía originados por los estreptococos del grupo C, es posible afirmar que estas bacterias son capaces de producir tanto la forma primaria como la secundaria (70,75,85,89); la primera se asocia con el

contacto con animales y, la segunda, probablemente surge como consecuencia de la endocarditis que ocasionan los miembros de este grupo. Respecto a los signos predominantes de la enfermedad, éstos son semejantes a los que se describen para la neumonía originada por el grupo A: tos, dolor en el pecho y fiebre de curso prolongado. Hasta el momento sólo S. equisimilis y S. zooepidemicus se han encontrado produciendo la enfermedad y, en cuanto al tratamiento, a pesar de que los estreptococos de este grupo generalmente son sensibles a la penicilina, la recuperación de los pacientes es lenta e incluso fatal (89).

#### a.6. ARTRITIS INFECCIOSA.

La artritis puede ser causada por varios microorganismos: rickettsias, virus, hongos, parásitos y bacterias; la ocasionada por estas últimas, generalmente es el resultado de su diseminación hematógica y, con menos frecuencia, puede tener origen en una herida profunda, en la aspiración o inyección de la articulación correspondiente o en la dispersión de una osteomielitis contigua (11).

En animales de laboratorio, la artritis bacteriana se inicia con la diseminación de los microorganismos en toda la superficie de la membrana sinovial y 24 a 48 horas después se hace evidente una infiltración pronunciada de leucocitos polimorfonucleares, la congestión vascular y la proli



feración de las células del revestimiento sinovial. En algunos casos, los mecanismos de defensa del huésped pueden erradicar la infección articular inicial, sin embargo, si la multiplicación bacteriana persiste, ésta ocasionará la acumulación de un derrame purulento que dará como resultado alteraciones crónicas y algunas veces irreversibles, las cuales se acompañarán de las características clínicas típicas de la artritis bacteriana, tales como articulación tumefacta y dolorosa al contacto o presión (43).

Con respecto a la división que se hace de la enfermedad en función de los agentes etiológicos que la producen, se denomina artritis bacteriana gonocócica si el microorganismo causal es N. gonorrhoeae y, cuando se trata de una bacteria diferente, se llama artritis bacteriana no gonocócica; en esta última, la distribución no ha cambiado notablemente en varios años (cuadro 3.3).

CUADRO 3.3

ARTRITIS BACTERIANA NO GONOCOCCICA EN ADULTOS TRATADOS EN EL BOSTON UNIVERSITY MEDICAL CENTER DE 1965 A 1982 <sup>+</sup>	
Tipo de bacteria	Número de pacientes
<u>Staphylococcus aureus</u>	39
Especies estreptocóccicas	26
Bacilos Gram negativos	22
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	6
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	4

<sup>+</sup> No se incluyen los pacientes con osteomielitis o articulación protética.

Cabe señalar que los datos de este cuadro no difieren mucho de los encontrados en otros grandes centros hospitalarios urbanos (43).

En cuanto a las especies estreptocóccicas, anteriormente sólo se mencionaba al grupo A, sin embargo, en los últimos años han surgido informes de artritis ocasionadas por otros grupos como el G y el B (40,43,61,63,73).

En relación a las manifestaciones clínicas, en la artritis bacteriana no gonocócica, aproximadamente el 70% de los pacientes presentan temperatura elevada (rara vez mayor de 38.9°C) durante las primeras 24 horas de hospitalización, los escalofríos no son muy frecuentes y los signos inflama-

matorios tienden a ser muy notables; pero si el paciente se encuentra bajo terapia inmunosupresora, es posible que el dolor, la tumefacción y el eritema se enmascaren. Por lo general, sólo está afectada una articulación, regularmente la de la rodilla, pero no se descarta la posibilidad de que la enfermedad se presente en forma poliarticular.

El riesgo de desarrollar artritis bacteriana no gonocócica aumenta cuando el huésped padece una enfermedad crónica debilitante o se ha sometido a terapia inmunosupresora; por esto, en la gran mayoría de los pacientes que adquieren la enfermedad por vía hemática, es posible encontrar una o más alteraciones clínicas asociadas con la incidencia de la enfermedad (11,43).

Por lo que respecta a los casos de artritis ocasionados por el grupo G (40,61,63,73), la presencia del padecimiento se relaciona con algún factor de riesgo como la terapia con corticoesteroides, enfermedades malignas o con diabetes mellitus; únicamente en una ocasión no se encontró alguna alteración clínica previa (95). Por lo regular, la artritis es poliarticular y, como en otras pioartrosis bacterianas, involucra con mayor frecuencia a la articulación de la rodilla. Las fuentes de bacteriemia, aunque no están bien determinadas, parecen ser la endocarditis y las infecciones en piel.

La respuesta a la terapia con penicilina es variable:

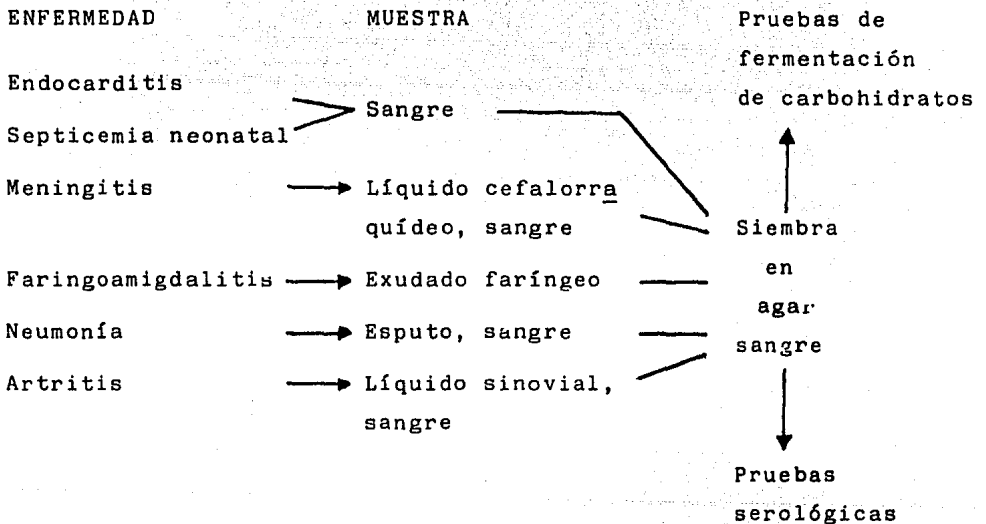
algunos pacientes se recuperan y otros, a pesar de someterse a un tratamiento prolongado, requieren de varias aspiraciones de la articulación para curar completamente.

En relación a los estreptococos del grupo C, a la fecha existen dos reportes de artritis producida por estos microorganismos (47,89); por esta razón, resulta difícil efectuar un análisis que pueda describir la forma predominante de la enfermedad.

Otros padecimientos en los que se encuentran involucrados en forma esporádica los estreptococos del grupo C son: osteomielitis (6) y pericarditis (48) y los del grupo G, en peritonitis (55). Ambos grupos de microorganismos se han aislado de sepsis puerperal (36,81) y de infecciones en heridas, piel y tracto genitourinario (12,35,44,77). En pacientes inmunocomprometidos, el estreptococo del grupo C puede causar septicemia (3) y el del grupo G: meningitis y otitis media (14); este mismo tipo de pacientes también han sufrido de celulitis, ya sea originada por el grupo C o por el G (14,70).

#### IV. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Un esquema de la metodología empleada en el aislamiento e identificación de los estreptococos de los grupos C y G sería el siguiente:



##### a. CULTIVO DE SANGRE (9,27,82).

La presencia de microorganismos en un líquido corporal normalmente estéril como la sangre, puede representar la evidencia de una infección activa que tiene el riesgo de propagarse a otros órganos o tejidos de la economía; por és to, el laboratorio de microbiología clínica cumple una función muy importante en el diagnóstico, al aislar a los agen tes causales mediante hemocultivos.

### a.1. TOMA DE LA MUESTRA.

Con respecto a la cantidad de muestras y al intervalo en que se recolectan, Reller (82) recomienda proceder en la siguiente forma:

(a) Si se sospecha de sepsis aguda, meningitis, osteomielitis, artritis o neumonía bacteriana aguda, se efectúan dos hemocultivos (de dos sitios de venopunción) antes de iniciar la terapéutica antimicrobiana.

(b) En endocarditis aguda se realizan tres hemocultivos (de venopunturas diferentes) durante las primeras dos horas de evaluación, antes de comenzar la terapéutica.

(c) En endocarditis subaguda se llevan a cabo tres hemocultivos en el primer día (con una diferencia de 15 minutos aproximadamente) y si ninguno presenta crecimiento a las 24 horas, se efectúan tres más. En el caso de que el tratamiento antimicrobiano se haya iniciado dos semanas antes, conviene realizar diariamente dos hemocultivos separados durante tres días consecutivos.

Para la extracción de la sangre se emplean jeringa y aguja estériles; una vez que se ha palpado el sitio óptimo de venopuntura se procede a desinfectar la piel con alcohol etílico o isopropílico al 70 por ciento y, posteriormente, se utiliza tintura de yodo al 1 ó 2 por ciento efectuando la descontaminación en forma concéntrica del centro hacia afuera; si el paciente es hipersensible al yodo, la piel se

prepara con una doble aplicación de alcohol. Después de desinfectar, no debe tocarse el sitio de venopuntura a menos que se usen guantes estériles o que se realice una descontaminación previa con alcohol y si al punccionar por primera vez no se obtiene la sangre, será necesario cambiar la aguja por otra nueva.

Con el objeto de reducir el efecto bactericida del suero, se recomienda tomar un volumen de sangre tal que la relación sangre:medio se encuentre entre 1:5 y 1:10 (en neonatos y niños pequeños se recomienda tomar de 1 a 5 ml y para adultos el volumen mínimo es de 10 ml); una vez que se ha obtenido la muestra y habiendo realizado la desinfección del tapón de hule con alcohol, se procede a inocular la sangre a través del tapón en la botella que contiene el medio correspondiente (el bifásico agar de tripticasa y soya-caldo de tripticasa y soya adicionado de polianetol sulfonato de sodio como anticoagulante, a una concentración de 0.025 a 0.05 por ciento); cabe mencionar que en el tratamiento de la piel y del tapón de hule, el desinfectante debe actuar durante aproximadamente 1 minuto. Inmediatamente después de depositar la muestra en la botella, se debe mezclar con el medio para evitar su coagulación. El yodo remanente se limpia con alcohol.

La botella de hemocultivo se incuba a 37°C y después de 24 horas se saca de la incubadora, sin agitarla para bus

car evidencias del crecimiento tales como turbidez, hemólisis o formación de pequeñas colonias; además puede realizarse una tinción de Gram. En caso de detectarse desarrollo, se procede a resembrar en el medio apropiado que, en este caso, es el agar sangre.

#### b. CULTIVO DE LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (45,51,57,62,90,92).

El líquido cefalorraquídeo (LCR) es un ultrafiltrado de plasma que se encuentra ocupando los espacios no tisulares del cerebro y la médula espinal; su volumen es de aproximadamente 150 ml y a la vez que constituye un medio nutritivo es también una vía de excreción de productos metabólicos y entre sus principales funciones mecánicas se cuentan la amortiguación y regulación del contenido intracraneal.

##### b.1. TOMA DE LA MUESTRA.

La forma más frecuente de recolectar el LCR es por punción lumbar. Una vez que se coloca al paciente en posición sentada, se le pide que incline el torso hacia adelante para separar las apófisis espinosas de las vértebras lumbares, a continuación se procede a desinfectar la piel con tintura de yodo y alcohol, previa anestesia local con novocaína al 1%; la punción se practica entre la tercera y cuarta vértebras lumbares; generalmente al serle retirado el mandril de la aguja y si ésta se encuentra ubicada en el canal medular, comenzará a fluir el líquido, adaptándose entonces el manó-



metro para medir la presión (en el individuo normal se encuentra aproximadamente entre 90 y 150 mm de agua).

El líquido se recolecta en tres tubos de ensayo estériles para evitar la contaminación, destinándose el tercero de éstos para el cultivo; es conveniente colocar una pequeña cantidad de oxalato de potasio para prevenir una coagulación eventual que pudiera invalidar el estudio citológico.

Después de obtener la muestra, se retira la aguja tomando todas las precauciones para evitar una infección.

En la meningitis ocasionada por los estreptococos de los grupos C y G, al igual que en otras meningitis bacterianas, el LCR presentará las alteraciones correspondientes (cuadro 4.1).

Con el objeto de concentrar la mayor cantidad posible de microorganismos, el tubo que contiene el LCR destinado al cultivo se centrifuga a 1,000 X g durante 15 minutos y obtenido el sedimento, se hace un frotis con tinción de Gram, se siembra en agar sangre y en un medio líquido como la infusión de cerebro corazón.

metro para medir la presión (en el individuo normal se encuentra aproximadamente entre 90 y 150 mm de agua).

El líquido se recolecta en tres tubos de ensayo estériles para evitar la contaminación, destinándose el tercero de éstos para el cultivo; es conveniente colocar una pequeña cantidad de oxalato de potasio para prevenir una coagulación eventual que pudiera invalidar el estudio citológico.

Después de obtener la muestra, se retira la aguja tomando todas las precauciones para evitar una infección.

En la meningitis ocasionada por los estreptococos de los grupos C y G, al igual que en otras meningitis bacterianas, el LCR presentará las alteraciones correspondientes (cuadro 4.1).

Con el objeto de concentrar la mayor cantidad posible de microorganismos, el tubo que contiene el LCR destinado al cultivo se centrifuga a 1,000 X g durante 15 minutos y obtenido el sedimento, se hace un frotis con tinción de Gram, se siembra en agar sangre y en un medio líquido como la infusión de cerebro corazón.

CUADRO 4.1

ALTERACIONES EN EL ESTUDIO FISICO, CITOLOGICO Y QUIMICO DEL LCR EN LA MENINGITIS BACTERIANA.

	ASPECTO	PRESION	CELULAS	PREDOMINIO
NORMAL	agua de roca	50-100 mm H <sub>2</sub> O en infantes 100-200 mm H <sub>2</sub> O en adultos	1 a 10	mononucleares
MENINGITIS BACTERIANA	turbio o purulento	aumentada	100 a 500 has ta incontables	polimorfonucleares
	PROTEINAS	GLUCOSA	pH	ACIDO LACTICO
NORMAL	15 a 45 mg por 100 ml	50 a 90 mg por 100 ml	7.34 a 7.4	4.3 ± 0.6 mg por 100 ml
MENINGITIS BACTERIANA	elevadas, 50 a 100 o más	muy baja o ausente	bajo, de 7.3 o menos	más de 30 mg por 100 ml

### c. CULTIVO DE EXUDADOS FARINGEOS (33).

#### c.1. TOMA DE LA MUESTRA.

Para obtener la muestra el procedimiento más recomendable es el siguiente:

Se inclina la cabeza del paciente hacia atrás y se ilumina bien la garganta; en seguida, se empuja la lengua hacia abajo con un abatelenguas de modo que se pueda observar la parte posterior de la garganta y se procede a tomar la muestra; para ello se frota el hisopo de arriba hacia abajo en la parte posterior de la garganta haciendo lo mismo con cualquier mancha blanca que se encuentre en la zona de las amígdalas, evitando en lo posible tocar la lengua y las mejillas; por último se descarga el hisopo en el agar sangre.

### d. CULTIVO DE ESPUTO (57,90).

#### d.1. TOMA DE LA MUESTRA.

El esputo es la muestra que más comúnmente se investiga en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas de las vías respiratorias bajas.

La muestra se obtiene provocando un acceso de tos profunda, previo enjuague de la boca con solución salina o agua estéril, con el fin de reducir el número de bacterias orofaríngeas contaminantes. El esputo se recolecta en un

frasco de boca ancha, estéril y de cierre hermético; se observa primero su aspecto macroscópico y después de preparar un frotis con tinción de Gram se procede a sembrar directamente en la placa de agar sangre.

#### e. CULTIVO DEL LIQUIDO SINOVIAL (43,90).

El líquido sinovial en su estado normal es de color amarillo claro, casi incoloro y no coagula espontáneamente; contiene menos de 200 glóbulos blancos por  $\mu$ l, de los cuales menos del 25% son polimorfonucleares, no tiene cristales, su contenido total de proteína es de 1.8 mg/dl y el de glucosa se encuentra ligeramente disminuido con respecto al del suero.

##### e.1. TOMA DE LA MUESTRA.

La muestra se obtiene mediante la aspiración de la articulación; con una parte del líquido se efectúa la cuenta diferencial (igual que si se tratara de una cuenta de leucocitos en sangre), utilizando para ello azul de metileno al 0.1% en solución salina; la proteína y la glucosa se cuantifican con cualquiera de las técnicas utilizadas para estimar estos compuestos en el suero. Por otro lado, el resto de la muestra se concentra por centrifugación: una porción del sedimento se tiñe al Gram y, la otra, se siembra en una placa de agar sangre.

En la artritis causada por estreptococos, el líquido sinovial se manifiesta turbio, con una cuenta leucocitaria de 10,000 a 100,000 glóbulos blancos por  $\mu$ l, observándose más del 90% de leucocitos polimorfonucleares; la proteína se encontrará elevada y la glucosa estará disminuida más del 40% de la concentración sérica.

#### f. PREPARACION DE LAS PLACAS DE AGAR SANGRE (33,86).

Las placas se elaboran con un 5% de sangre de carnero ya que ésta es la cantidad recomendada para visualizar correctamente la hemólisis de los estreptococos. Para obtener dicha concentración se mezcla 1 ml de sangre desfibrinada estéril con 20 ml de la base de agar derretida (generalmente exenta de azúcares fermentables, por ejemplo el de tripticasa y soya). En la inoculación primaria las placas deben tener aproximadamente 4 mm de espesor, lo cual se logra vertiendo los 21 ml de la mezcla sangre-base de agar a una caja de Petri de 90 mm de diámetro.

##### f.1. SIEMBRA EN AGAR SANGRE.

El procedimiento correcto para sembrar una placa de agar sangre se indica en la figura 4.1 (33).

Con el hisopo se inocula aproximadamente un sexto de la placa: se hace girar sobre el medio de modo que toda la superficie del hisopo entre en contacto con el agar; poste

riormente, se utiliza una asa de alambre para realizar las estrías y, enseguida, se introduce el asa hasta el fondo del agar en forma perpendicular a la superficie para asegurar un corte limpio sin bordes irregulares; por último, se efectúa un estriado adicional con el asa, con el objeto de dispersar los microorganismos y obtener colonias aisladas. Cabe señalar que mediante la punción del agar es posible visualizar con más claridad las descripciones de hemólisis mencionadas en el capítulo II, aunque lo ideal para determinarla es usar placas inoculadas en profundidad (la siembra se realiza antes de vertir el medio). Las placas inoculadas se incuban aeróbicamente a 37°C durante toda la noche.

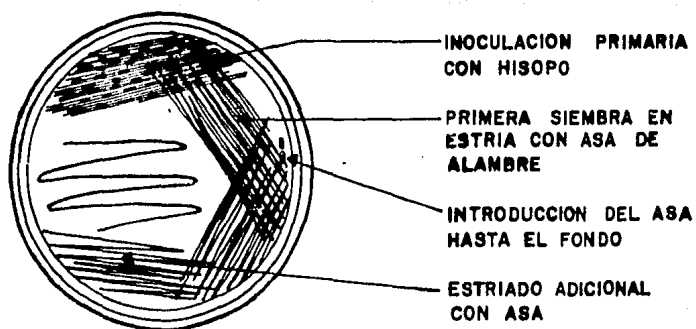


Fig. 4.1. Procedimiento para inocular una placa de agar sangre.

#### g. PRUEBAS SEROLOGICAS.

La identificación serológica se realiza comúnmente con cualquiera de los reactivos disponibles comercialmente para la prueba de coaglutinación (Phadebact) o de aglutinación con partículas de látex (Streptex), los cuales tienen una exactitud por arriba del 95% (34); cabe mencionar que, para ambas pruebas, se han realizado modificaciones al procedimiento original, las cuales permiten efectuar la determinación del antígeno de grupo directamente del aislamiento primario en la placa de agar sangre (34, 88) e inclusive a partir de muestras clínicas (98,100).

#### h. PRUEBA DE FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS.

Estas pruebas se realizan después de conocer el grupo serológico; si se trata de identificar a las especies beta hemolíticas del grupo C se efectúan las fermentaciones de trealosa y sorbitol siendo la formulación del medio empleado la siguiente:

- 1) Caldo infusión de corazón: 22.5 g en 900 ml de agua destilada.
- 2) Trealosa o sorbitol: 10 g en 100 ml de agua destilada.
- 3) Un ml de indicador (1.6 g de púrpura de bromocresol en 100 ml de etanol al 95%).



Se mezclan 1, 2 y 3 y se distribuye en cantidades de 3 ml en tubos de ensayo de 13 X 100 mm con tapa de rosca; posteriormente, se esteriliza en autoclave durante 10 minutos a 121°C. La reacción es positiva si el indicador vira de color púrpura a amarillo. Los patrones de fermentación de trealosa y sorbitol se encuentran en la tabla 2.1 en el capítulo II.

En el caso del grupo G, por lo general no se llevan a cabo estas pruebas, ya que la morfología colonial determina si se trata de los estreptococos de colonia "grande" (S. canis) o "diminuta" (S. anginosus); sin embargo, si llega a ser necesario, bastará analizar la fermentación de rafinosa para diferenciar a las dos especies.

### i. SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.

Por lo general, los estreptococos de los grupos C y G de Lancefield son susceptibles a la penicilina G; sin embargo, en ocasiones la respuesta al tratamiento con este antibiótico es pobre, sobre todo en los casos de endocarditis (17); incluso existen reportes que indican la tolerancia\* de estos microorganismos a la penicilina G, cefalotina y a vancomicina (76,80), por esta razón es importante conocer los patrones de susceptibilidad de ambos grupos.

El estudio de Lam (61) en el que se examina la actividad de penicilina G, ampicilina, cefotaxima, cefalotina, cefoxitina, vancomicina, gentamicina, clindamicina, eritromicina y cloramfenicol sobre los estreptococos del grupo G, indica lo siguiente: (a) todos los antimicrobianos probados, con excepción del cloramfenicol, exhiben una buena actividad inhibitoria contra los estreptococos del grupo G, el 100% de las cepas presentó una CIM de  $2.5 \mu\text{g/ml}$  o menos; en el caso del cloramfenicol, la resistencia que se indica es congruente con el reporte de Tuazon (95). (b) Entre los antimicrobianos que pudieran utilizarse en los pacientes

\* definida como la proporción entre la Concentración Bactericida Mínima (CBM) y la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) que es igual o mayor a 32.

alérgicos a la penicilina, sólo la vancomicina presentó un efecto bactericida significativo, con una CBM de 1.25  $\mu\text{g/ml}$  o menos para el 100% de las cepas; además, ninguna de éstas exhibió tolerancia a la vancomicina, lo cual no está de acuerdo con los estudios de Noble (76) y Rolston (83). Cabe mencionar que la tolerancia se ve afectada por el inóculo y el medio (61), Lam empleó un inóculo en fase logarítmica y, como medio, el caldo de Todd-Hewitt; Noble (76) no describe la metodología que utilizó. (c) La eritromicina, la clindamicina y el cloramfenicol, a pesar de poseer una actividad in vitro excelente contra otros estreptococos tales como los del grupo A y los neumococos, mostraron una eficacia bactericida muy pobre contra los del grupo G. (d) La penicilina G, la ampicilina y la cefotaxima fueron los agentes bactericidas más activos con una CBM de 0.08  $\mu\text{g/ml}$  o menos para el 100% de las cepas; prácticamente todos los datos mencionados coinciden con los reportados por Rolston (cuadro 4.2), quien probó las cepas de los estreptococos de los grupos C y G con 9 antimicrobianos.

CUADRO 4.2

RANGOS DE CIM Y CBM DE NUEVE ANTIMICROBIANOS PRBADOS  
CON CUARENTA Y CUATRO CEPAS DE ESTREPTOCOCOS DE LOS  
GRUPOS C Y G AISLADOS DE HUMANOS.

Agente	CIM $\mu\text{g/ml}$		CBM rango en $\mu\text{g/ml}$	
	Rango	50%	90%	
Penicilina	0.03-0.06	0.03	0.03	0.03-32
Vancomicina	0.03-0.5	0.06	0.12	0.03-4
Cefalotina	0.03-0.5	0.03	0.06	0.03-1
Cefmenoxima	0.03-0.12	0.03	0.06	0.03-0.12
Cefotaxima	0.03-0.25	0.03	0.12	0.03-0.25
Moxalactam	0.03-8.0	2.0	8.0	0.03-8.0
Piperacilina	0.03-0.5	0.03	0.03	0.03-0.5
Azlocilina	0.03-0.25	0.03	0.06	0.03-0.25
Eritromicina	0.03-1.0	0.12	1.0	0.03-4.0

En conclusión, se puede afirmar que la penicilina re-  
tiene su lugar como el antibiótico de elección para las en-  
fermedades debidas a los estreptococos de los grupos C y  
G, aunque se debe tener presente la tolerancia que pueden  
exhibir algunas cepas; las alternativas son las nuevas pe-  
nicilinas semisintéticas, la tercera generación de cefa-  
losporinas y, en los pacientes alérgicos a la penicilina,  
la vancomicina o la eritromicina. Sin embargo, como estos  
estreptococos no suelen tener un patrón de susceptibilidad

definido, lo más recomendable sería probar la actividad inhibitoria y bactericida para cada cepa.

## V. CONCLUSIONES

1. Con respecto a la endocarditis infecciosa, los estreptococos de los grupos C y G de Lancefield causan tanto la forma aguda como la subaguda.
2. Sobre la septicemia neonatal, los estreptococos del grupo G actúan como patógenos endógenos y, cuando menos, se les ha demostrado participación en la enfermedad de inicio temprano. En cuanto al grupo C, aunque estos microorganismos pueden residir en el tracto genital femenino, no se les considera agentes causales de dicho padecimiento.
3. Acerca de la meningitis, los estreptococos del grupo C se encuentran involucrados, observándose que el contacto con animales es la fuente de infección más importante; por su parte, los del grupo G pueden originar la enfermedad en pacientes inmunocomprometidos.
4. Los estreptococos de los grupos C y G son agentes etiológicos de faringoamigdalitis, la cual es indistinguible en cuanto a síntomas y signos, de la producida por el grupo A. Por otro lado, se requieren estudios más profundos para establecer si estos microorganismos pueden ser causa de secuelas no supurativas.
5. Por lo que toca a la neumonía, de ambos grupos, sólo se

reporta al C como agente etiológico tanto de la forma primaria como de la secundaria; la primera se asocia al contacto con animales y, la segunda, probablemente surge como consecuencia de endocarditis.

6. A últimas fechas, se ha detectado que los estreptococos del grupo G originan artritis infecciosa, manifestando las características presentes en las demás pioartrosis bacterianas.
7. En relación a las antiestreptolisinas O séricas, tanto el grupo C como el G inducen su elevación, por lo que no sólo debe asociarse este fenómeno con las infecciones debidas a S. pyogenes.
8. Para identificar a los grupos C y G en el laboratorio, se partirá de la siembra en agar sangre, tomando colonias aisladas; posteriormente, se practicarán las pruebas serológicas ya sea de coagulación o de aglutinación con partículas de látex (dado que ambas poseen una exactitud mayor al 95%) y, por último, se efectuarán las pruebas de fermentación para determinar la especie.
9. Por lo que se refiere a la sensibilidad frente a los antimicrobianos, se debe identificar el grupo de Lancefield responsable del padecimiento para establecer la terapia adecuada, ya que no todas las cepas de los grupos C y G son sensibles a la penicilina G.

10. El 7.5% de los estreptococos beta hemolíticos aislados de muestras clínicas que son sensibles a la bacitracina (0.04 U) pertenecen a los grupos C y G, por lo cual debe complementarse el análisis con alguna de las pruebas serológicas para incrementar la confiabilidad del diagnóstico de laboratorio.
11. Aunque los grupos C y G de Lancefield se encuentran como flora habitual en el humano, el clínico y el microbiólogo deben estar concientes de su patogenicidad, ya que si no se administra el tratamiento adecuado, la situación de los pacientes afectados puede complicarse.



## ANEXO I

## I.1. PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACION DE ESTREPTOCOCOS

Los estreptococos pueden identificarse mediante pruebas microbiológicas entre las que se cuentan:

1. Prueba de la bacitracina y de sulfametoxazol-trimetoprim (SXT).
2. Determinación de la presencia del factor CAMP o hidrólisis del hipurato de sodio.
3. Hidrólisis de esculina en presencia de bilis al 4%.
4. Capacidad para desarrollar en presencia de NaCl al 6.5%.

## PRUEBA DE LA BACITRACINA (57,72,88)

En 1953, Maxted observó que los estreptococos del grupo A eran más sensibles que los demás beta hemolíticos a un rango determinado de concentración de bacitracina (0.02 a 0.04 unidades). Actualmente, el uso del disco de bacitracina es el método que más se emplea en los laboratorios clínicos para realizar una identificación de mediana confiabilidad de los estreptococos del grupo A. En general, se ha comprobado que los resultados de la prueba concuerdan con los de la clasificación serológica; sin embargo, aunque el disco de bacitracina identifica al 99.5% de las cepas del grupo A, existe una porción estimada entre el 5 y 15% de otros estreptococos sensibles a la bacitracina, aislados de fuentes clínicas que pueden pertenecer a grupos distintos al A.

Por ejemplo, un 6% de los estreptococos beta hemolíticos del grupo B y el 7.5% de los pertenecientes a los grupos C y G son sensibles a la bacitracina a las concentraciones mencionadas anteriormente.

Jelinkova y Rotta (88) también han señalado otras limitaciones de la prueba, entre las que puede mencionarse el hecho de que algunas cepas del grupo A muestran una sensibilidad relativamente baja; además, han observado que si dicha concentración se aumenta, la prueba se hace positiva para algunas cepas de los grupos C y G. Estos investigadores afirman que la confiabilidad de la prueba, en el trabajo de rutina, depende del origen del material a probar; si éste proviene de una enfermedad estreptocócica humana, su seguridad es grande (90 a 95%); si se examinan portadores de los grupos C y G, es menos segura y cuando se trata de probar cepas de origen animal, su seguridad es muy baja debido a que algunos miembros del grupo L son sensibles a la bacitracina.

Para realizar convenientemente la prueba de la bacitracina, el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Georgia, EUA., recomienda seguir las siguientes instrucciones (88):

1. Emplear discos diferenciales y no de susceptibilidad; habrá que asegurarse de adquirir discos que contengan de 0.02 a 0.04 U y no de concentraciones mayores; los discos que se em

plean para la prueba de susceptibilidad poseen una concentración demasiado elevada para diferenciar exactamente entre los estreptococos del grupo A y los demás.

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

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

4. Probar únicamente estreptococos beta hemolíticos. La prueba está destinada a diferenciar estreptococos beta hemolíticos: debe determinarse correctamente el tipo de hemólisis porque muchos estreptococos alfa hemolíticos, incluso los neumococos, son sensibles a la concentración diferencial de bacitracina. Debido a que los lotes de discos pueden variar, cada lote nuevo debe probarse con cepas de estreptococos pertenecientes al grupo A y a otros grupos.

5. Interpretar como positiva la prueba cuando exista cualquier zona de inhibición, independientemente de su tamaño. Para efectuar la lectura de la prueba, deben aplicarse los siguientes criterios: a) toda zona de inhibición, cualquier-

ra que sea su diámetro, indica que el cultivo es sensible; b) la ausencia de zonas de inhibición (crecimiento hasta la orilla misma del disco) significa que el cultivo es resistente. Maxted (88) no especificó que la zona debía tener tal o cual tamaño; además, no se conocen datos experimentales que digan que los diámetros de la zona deban medirse con el fin de diferenciar a los estreptococos del grupo A de los demás.

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

La prueba de la bacitracina se realiza en la siguiente forma:

Se toma un inóculo abundante (de 3 a 4 colonias o una asada de un caldo incubado durante toda la noche) de un cultivo puro de estreptococos beta hemolíticos y se estría en agar de infusión con 5% de sangre de carnero. Una vez colocado el disco, se incuba a 37°C y, al día siguiente, se efectúan la lectura e interpretación de la prueba.

Se deberá tener presente que otras cepas de estreptococos beta hemolíticos distintas del grupo A también pueden producir una reacción positiva, por lo cual el reporte de laboratorio deberá decir: "identificación presuntiva de es

estreptococos beta hemolíticos del grupo A por bacitracina" o "estreptococos beta hemolíticos no pertenecientes al grupo A por bacitracina".

#### PRUEBA SXT (72)

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

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

#### DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL FACTOR CAMP (57,72,86,88)

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

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

grupo B.

La prueba se efectúa trazando una sola estria del cultivo de estreptococos en sentido perpendicular a una estria de una cepa de Staphylococcus aureus productora de hemolisina beta. Las estrias de ambos microorganismos no deben estar en contacto sino separadas aproximadamente 1 cm como se muestra en la figura A. Para realizar la prueba, se emplea una base de agar de tripticasa y soya adicionada de sangre de carnero que ha sido resuspendida en solución salina. Una vez que se ha inoculado la placa, se incuba aeróbicamente por 18 horas. Aunque la reacción de CAMP ocurre para los estreptococos del grupo B tanto en condiciones aerobias como anaerobias, si la incubación es en atmósfera parcial de  $CO_2$ , se observarán algunas cepas del grupo A como CAMP positivas y si se incuba anaerobiamente, habrá un número mayor de reacciones falsas positivas producidas por el grupo A. Por esta razón, la prueba deberá realizarse, de preferencia, en aerobiosis.

Las lecturas podrán hacerse desde las 5 ó 6 horas de incubación; en una prueba positiva, la zona donde se intensifica la lisis asume la forma de una punta de flecha como se aprecia en la figura B.

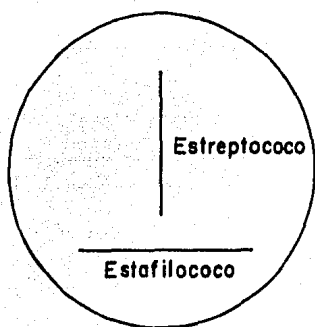


FIGURA A

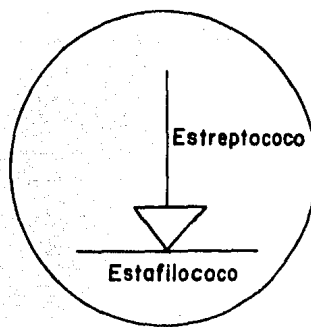
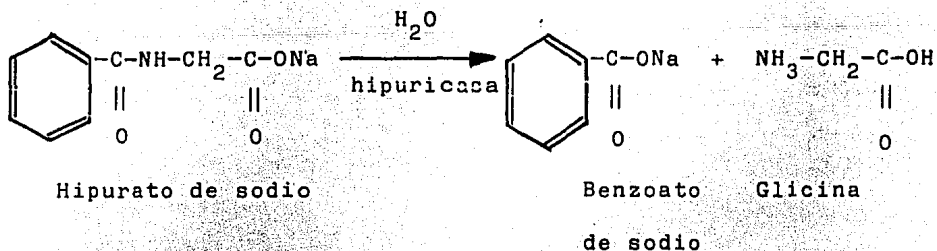


FIGURA B

Otros grupos CAMP positivos son: el E, M y U; sin embargo, no es común encontrarlos en infecciones humanas.

#### HIDROLISIS DEL HIPURATO DE SODIO (57,72)

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



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

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

La prueba del hipurato se realiza inoculando un tubo de caldo hipurato con dos o tres colonias del microorganismo sospechoso. En seguida, se incuba a 35°C durante 20 horas o más. Después de este tiempo, se centrifuga el medio para sedimentar las células y se transfieren 0.8 ml del sobrenadante a un tubo limpio al que se le agregan 0.2 ml del reactivo acidificado de cloruro férrico. Si el precipitado que se forma después de añadir el cloruro férrico, persiste más de 10 minutos, es que se ha formado benzoato de sodio, lo cual a su vez indica que hubo hidrólisis y, por ello, la prueba se considera positiva.

Para identificar la glicina, se utiliza el reactivo de ninhidrina: este compuesto es un oxidante energético que desamina grupos alfa amino, liberando  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$ . El amoníaco reacciona con la ninhidrina residual dando un color púrpura.

En esta prueba se inocula una asada de una suspensión



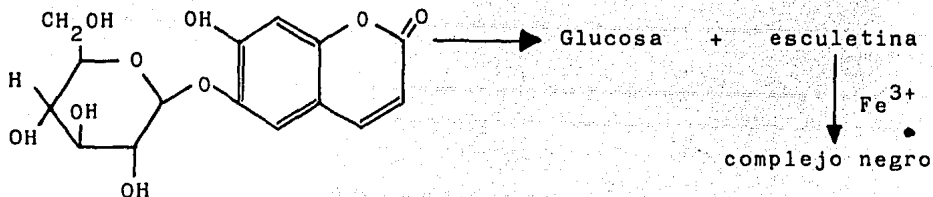
de cultivo del microorganismo a investigar en 0.4 ml de reactivo de hipurato de sodio al 1% y se incuba durante 2 horas a 35°C. Después se agregan 0.2 ml del reactivo de ninhidrina; si aparece un color púrpura intenso, la prueba es positiva.

#### HIDROLISIS DE ESCULINA EN PRESENCIA DE BILIS AL 4% (57,72)

La prueba se basa en la capacidad que poseen ciertas bacterias, particularmente los estreptococos del grupo D, de hidrolizar esculina en presencia de bilis al 1 ó 4%. La esculina químicamente es un derivado de la cumarina (6-beta-glucósido-7-hidroxycumarina), que por su estructura pertenece a la clase de compuestos conocidos como glucósidos.

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

La reacción que se efectúa es la siguiente:



No se conoce la fórmula química exacta del complejo de hierro formado con la esculetina.

La prueba se efectúa en un tubo con agar inclinado o en placa. En ambos casos, se inoculan en el medio de agar bilis esculina 2 ó 3 colonias del microorganismo a estudiar y se incuba a 35°C; la prueba es positiva si el agar se ennegrece en 24 ó 48 horas.

CAPACIDAD PARA DESARROLLAR EN PRESENCIA DE NaCl AL 6.5% (72,88)

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

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

Los microorganismos no enterocócicos del grupo D: S.

bovis y S. equinus así como S. viridans no crecen en este medio.

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

En la prueba en placa, se inoculan dos o tres colonias en el medio y se incuba toda la noche en una atmósfera normal o con CO<sub>2</sub> a 35°C. La prueba es positiva si el crecimiento es visible en la superficie y es negativa si no hay desarrollo después de 24 horas.

La prueba bilis esculina positiva y el crecimiento en caldo con NaCl al 6.5% confirman la presencia de los enterococos.

Ahora bien, si todas las pruebas microbiológicas se efectúan debidamente, permitirán identificar de material clínico a más del 95% de los estreptococos patógenos; no obstante, las identificaciones resultantes serán presuntivas y deberán, siempre que sea posible, complementarse con alguna de las pruebas serológicas.

Facklam (62) sugiere que se consideren los siguientes criterios para agrupar a los estreptococos cuando sólo se realizan pruebas microbiológicas:

1. El grupo A. Son beta hemolíticos, sensibles a bacitracina, resistentes a SXT, reacción de CAMP negativa y bilis-esculina negativa.
2. El grupo B. Son beta hemolíticos, su sensibilidad a bacitracina y a SXT es variable (aunque la mayoría de las cepas son resistentes a ambos agentes), reacción CAMP positiva y bilis-esculina negativa; las cepas del grupo B que no son beta hemolíticas presentarán patrones de reacción similares.
3. Los grupos C, F y G. Son beta hemolíticos y reaccionarán en tres formas a la bacitracina y al SXT: a) la mayoría de las cepas son resistentes a bacitracina y sensibles al SXT, b) un número considerable de estas cepas son sensibles a los dos agentes mencionados y c) unas cuantas serán resistentes a ambos. Con respecto a las pruebas CAMP y bilis-esculina, la reacción es negativa.
4. El grupo D. Aunque la mayoría de las cepas son no hemolíticas, algunas pueden presentar reacciones alfa y beta. Todos los miembros del grupo son resistentes a bacitracina y reaccionan negativamente en CAMP. Los siguientes patrones de reacción a SXT, bilis-esculina y desarrollo en NaCl al 6.5% son característicos en los enterococos:
  - a) la mayoría de las cepas reaccionan positivamente en bilis-esculina, crecen en NaCl y son resistentes al SXT,
  - b) algunas cepas son sensibles a SXT, reaccionan positi

vamente en bilis-esculina y desarrollan en NaCl y c) algunas son resistentes a SXT, crecen en NaCl pero son bilis-esculina negativo.

Sin embargo, la mejor opción que existe para identificar a los estreptococos consiste en demostrar la presencia del carbohidrato específico de grupo mediante una reacción entre el antígeno y el suero correspondiente (pruebas serológicas). De esta forma se podrá detectar a cual de los veintidós grupos (designados de la letra A a la W excepto I y J) pertenece el microorganismo en cuestión.

De acuerdo con la tabla I.1, para agrupar al 99% de los estreptococos beta hemolíticos procedentes de muestras clínicas bastará con emplear los sueros del A al G.

TABLA I.1

REACCIONES SEROLOGICAS DE LOS ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLITICOS DE ORIGEN HUMANO IDENTIFICADOS DE 1969 A 1975 EN EL CENTRO DE CONTROL DE ENFERMEDADES (CDC) DE ATLANTA, GEORGIA EUA.		
GRUPO	NUMERO	PORCENTAJE DEL TOTAL
A	9,587	67
B	3,444	24
C	435	3
F	133	1
G	535	4
NINGUNO	80	1

Las pruebas serológicas que se utilizan para determinar el grupo serológico incluyen:

1. Prueba de precipitinas
2. Coaglutinación
3. Aglutinación con látex
4. Contrainmunolectroforesis
5. Inmunofluorescencia.

En la prueba de precipitinas se extraen los determinantes antigénicos de las células y, posteriormente se hacen reaccionar con sueros adsorbidos de especificidad conocida; esta extracción puede realizarse utilizando ácido en caliente (Lancefield), formamida en caliente (Fuller), autoclave (Rantz y Randall), ácido nitroso (El Kholy), enzima de S. albus (Maxted), enzima de S. albus-lisozima (Watson) o enzima pronasa B (Ederer) (57).

La técnica de Lancefield (88), se considera el procedimiento estándar con el que deben compararse todas las demás; desafortunadamente es relativamente compleja y requiere mucho tiempo. Sin embargo, si se desea tipificar a los estreptococos de los grupos A y B, es necesario utilizarla porque es la única que extrae los antígenos del tipo proteina, los polisacáridos (grupos A, B, C, F y G) y los de ácido teicoico (grupos D y N). Para la extracción del antígeno, las cepas se cultivan en 30 ml de caldo Todd-Hewitt o en otro medio adecuado. Después de incubar toda la noche

(16 a 24 horas) a 35° - 37°C, se sedimentan las células por centrifugación y se elimina el sobrenadante. Al sedimento se le añaden una gota de púrpura de metacresol al 0.04% y aproximadamente 0.3 ml de HCl 0.2 N en solución salina al 0.85%. Una vez que se ha mezclado bien, se transfiere la suspensión a un tubo de Khan, si ésta no es de color rosa de finido (pH de 2.0 a 2.4) se añadirá otra gota de HCl; después se coloca el tubo en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y se agita constantemente; enseguida se vuelve a centrifugar y se decanta el sobrenadante en otro tubo de Khan; el sobrenadante se neutraliza con NaOH 0.2 N preparada en agua destilada hasta que el extracto adquiera un color ligeramente púrpura (pH de 7.4 a 7.8) y, por último, se vuelve a centrifugar y se decanta el sobrenadante en un frasco pequeño con tapa de rosca.

La técnica con formamida caliente de Fuller también es relativamente compleja y, aunque extrae todos los antígenos de grupo, destruye los de tipo proteico haciendo imposible la tipificación de los estreptococos de los grupos A y B. Las cepas que se utilizan para extraer el antígeno se cultivan en 5 ml de caldo Todd-Hewitt o en otro medio adecuado, se incuban a 35° - 37°C durante toda la noche (16 a 24 horas), posteriormente se centrifuga para sedimentar las células y al sedimento se le agregan 0.1 ml de formamida; se mezcla bien y, enseguida, se coloca el tubo en un baño de acei-

te a 150°C durante 15 minutos. Después de enfriar el tubo con agua corriente, se le añaden 0.25 ml de alcohol ácido preparado con 95 partes de alcohol anhidro (100%) y 5 partes de HCl 2N, se agita y se vuelve a centrifugar; al sobrenadante (que se decanta en un tubo pequeño) se le agregan 0.25 ml de acetona; a continuación se agita la mezcla y nuevamente se centrifuga pero ahora se elimina el sobrenadante y el precipitado resultante primero se resuspende en 1 ml de solución salina con una gota de indicador rojo de fenol y, por último, se neutraliza con una pizca de carbonato de sodio. Si a pesar de agitar, el precipitado no se disuelve en la solución salina se deberá centrifugar otra vez y se procederá a neutralizar el sobrenadante en la forma descrita anteriormente.

Contraria a las anteriores, la técnica de autoclave de Rantz y Randall es relativamente sencilla y, aunque se extrae menos antígeno de grupo, puede utilizarse eficazmente para realizar el agrupamiento serológico. Las células para la extracción se cultivan en 30 ml de caldo Todd-Hewitt o en otro medio adecuado. Después de incubar toda la noche (16 a 24 horas) a 35° - 37°C, se sedimentan las células por centrifugación y se elimina el sobrenadante. Al tubo que contiene el sedimento se le agregan 0.5 ml de solución de NaCl al 0.85% y se le introduce al autoclave a 121°C durante 15 minutos. Por último, se centrifuga y el líquido sobre



nadante se decanta en un recipiente limpio.

La técnica de ácido nitroso de El Kholy se basa en una extracción sencilla; requiere únicamente de un ajuste de pH y no es necesario emplear calor. Los estudios que se han realizado utilizando esta técnica sólo han incluido algunas cepas de colecciones bacterianas pero ninguna muestra clínica con estreptococos de los grupos D y F, por lo que no se conoce su efectividad en estos microorganismos. Para la extracción del antígeno las cepas se cultivan en una placa de agar sangre o en 5 ml de caldo Todd-Hewitt u otro medio adecuado. Después de incubar a 35° - 37°C durante toda la noche (16 a 24 horas), si se utiliza el medio líquido, las células se recuperarán por centrifugación resuspendiéndolas después en una gota de solución salina y, cuando se emplea el medio sólido, se añadirá una o dos gotas de suero fisiológico para transferirlas a un tubo pequeño. Enseguida se agregan a la suspensión correspondiente, provenientes de cualquiera de los dos medios, dos gotas de solución de  $\text{NaNO}_2$  4 M (276 g de  $\text{NaNO}_2$  por litro de agua destilada) y una gota de ácido acético glacial. Una vez que se ha mezclado bien, se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos, tiempo después del cual la suspensión se neutraliza con NaOH 1 N a un pH de 7.4, utilizando como indicador púrpura de metacresol. Por último, la suspensión se centrifuga para clarificarla.

La técnica de Maxted permite identificar en forma sencilla a los grupos A, B, C, F y G pero no proporciona buenos resultados con el grupo D. En esta técnica, las cepas se cultivan en una placa de agar sangre a 37°C durante 16 ó 24 horas. Después, se resuspende una asada del cultivo en un tubo que contiene 0.25 ml de solución enzimática de Streptomyces albus (de venta comercial). El tubo con el inóculo y la solución enzimática se coloca en un baño de agua a 45°C hasta que la solución está clara (aproximadamente unos 90 minutos); se deja enfriar a temperatura ambiente y, enseguida, se centrifuga a 2000 rpm por 10 minutos al cabo de los cuales el sobrenadante se deposita en un tubo limpio.

La técnica de Ederer con pronasa B es similar a la de Maxted y, aunque también es fácil de realizar, no es mejor que ésta; además, no extrae los antígenos de los grupos D y F tan bien como lo hacen las técnicas de Lancefield, Fuller, Rantz y Randall o Watson. La extracción del antígeno se efectúa con la solución de enzima tamponada la cual contiene 20 mg de pronasa B por ml de solución reguladora de boratos, cuya preparación se describe a continuación:

Se disuelven 12.404 g de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) en 100 ml de NaOH 1 N y se afora a un litro con agua destilada; de esta solución, 525 ml se mezclan con 475 ml de HCl 0.1 N y 10 ml de  $CaCl_2$  1 M. Para conservar la solución de enzima tamponada se distribuye en porciones de 0.5 ml en tubos de

13 X 75 mm y tapados con corcho se congelan a  $-20^{\circ}$  ó  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

A partir de una placa de agar sangre incubada a  $35^{\circ}$  -  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16 ó 24 horas, se toma con un hisopo todo el cultivo y se deposita en la solución de enzima tamponada; el hisopo se hace girar y escurrir lo más posible apretándolo contra las paredes del tubo; a continuación, la suspensión se deja reaccionar durante 2 horas a  $35^{\circ}$  -  $45^{\circ}\text{C}$ , después se centrifuga de 15 a 30 minutos y se decanta el so brenadante en un recipiente.

Por último, la de Watson tiene una ventaja sobre las otras dos que emplean enzimas, ya que extrae el antígeno del grupo D igual que lo hace para los de los estreptococos beta hemolíticos de los grupos A, B, C, F y G; desafortunadamente, los reactivos para esta técnica son mucho más caros que los de cualquiera de las mencionadas. Para la extracción del antígeno se emplea una mezcla enzimática que se elabora de la siguiente manera:

Se prepara una solución que contiene 25 mg de lisozima por cada 5 ml de agua destilada; a ésta se le agrega la enzima de Streptomyces albus y la mezcla se centrifuga; el so brenadante se almacena en cantidades de 0.5 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$  en tubos de 10 X 75 mm con tapón de corcho.

En forma semejante a la técnica anterior, el cultivo

de la placa de agar sangre incubado a 35° - 37°C durante 16 ó 24 horas, se transfiere con un hisopo a la solución de enzimas (0.5 ml) y después, la mezcla se incuba en un baño de agua a 45° - 50°C por 90 minutos; posteriormente, se centrifuga y el sobrenadante se deposita en un recipiente.

La eficiencia de todas las técnicas mencionadas depende en gran medida de la calidad de los sueros que se emplean en la prueba de precipitinas. En la tabla I.2 se indican las técnicas de extracción con las ventajas y limitaciones que deben considerarse para adoptarlas en el laboratorio clínico.

TABLA I.2

TECNICAS DE EXTRACCION ANTIGENICA PARA AGRUPAR SEROLOGICAMENTE A LOS ESTREPTOCOCOS.			
<u>Investigador</u>	<u>Técnica</u>	<u>Ventajas</u>	<u>Limitaciones</u>
Lancefield	Acido caliente	Extrae antígenos de tipo proteico, carbohidratos y ácidos teicoicos	Es compleja, requiere tiempo y dos ajustes de pH
Fuller	Formamida caliente	Extrae a todos los antígenos de grupo	Es compleja, requiere un ajuste de pH y destruye los antígenos proteicos de los grupos A y B
Rantz y Randall	Autoclave	Es sencilla, extrae a todos los antígenos de grupo	
El Kholy	Acido nitroso	Relativamente sencilla	No se sabe que tan bien funciona con los grupos D y F, requiere un ajuste de pH
Maxted	Enzima de <u>Streptomyces albus</u>	Es sencilla	No extrae el antígeno de la mayoría de las cepas del grupo D
Ederer	Enzima pronasa B	Es sencilla	No extrae bien los antígenos de los grupos D y F
Watson	Mezcla enzimática: <u>Streptomyces albus</u> -lisozima	Es sencilla, extrae todos los antígenos de grupo	Es la más costosa

## PRUEBA DE PRECIPITINAS (TECNICA DEL CDC)

El procedimiento del CDC para efectuar la prueba de precipitinas difiere del descrito originalmente por la Dra. Lancefield en que el antígeno (extracto) se coloca sobre el suero y no al revés; está comprobado (62) que la técnica de la Dra. Lancefield no funciona óptimamente cuando dichos sueros tienen baja potencia; por consiguiente, la técnica del CDC es la más recomendable.

Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Sumergir un tubo capilar (de los empleados para vacunas con un diámetro exterior de 1.2 a 1.5 mm de vidrio boro-silicatado de Kimble, abierto en ambos extremos y ligeramente pulido al fuego) en el suero (en un frasco pequeño con tapa de rosca) hasta que se haya formado por acción capilar una columna de aproximadamente 1 cm de altura (es importante que los tubos capilares se encuentren estériles para evitar que los sueros se contaminen).
2. Limpiar el tubo con una toallita facial, sosteniéndolo de modo que no entre aire en el extremo.
3. Sumergir el tubo en el extracto hasta llegar a una cantidad igual a la columna de suero; si llegara a quedar alguna burbuja de aire entre el extracto y el suero, se descartará el tubo y se repetirá todo el procedimiento.
4. Limpiar el tubo con cuidado para que las huellas digita-

- les, el suero o el extracto que pudieran quedar en el exterior no simulen u oscurezcan una reacción positiva.
5. Sumergir el extremo inferior del tubo en la plastilina hasta que un pequeño tapón llene la apertura sin permitir que se mezclen los reactivos. El tapón de plastilina, en el mismo extremo que los reactivos, evitará que éstos abandonen su lugar mientras el tubo esté invertido.
  6. Hecho lo anterior, se invierte el tubo y se inserta suavemente en una barra de plastilina.
  7. Después de 5 ó 10 minutos, se examina con luz brillante contra un fondo oscuro; la presencia de una nube o anillo blanco en el centro de la columna a los 5 minutos, indica que la reacción es fuertemente positiva y si es débil, el precipitado tardará más tiempo en formarse; dado que después de 30 minutos, la reacción puede desvanecerse o puede aparecer un falso positivo, habrá que examinar los tubos capilares a intervalos frecuentes entre los 10 y los 30 minutos.

#### COAGLUTINACION (72,78)

La coaglutinación se basa en la afinidad que posee la proteína A de Staphylococcus aureus por la región Fc de la IgG; fundamentándose en tal propiedad, los anticuerpos que se obtienen contra los estreptococos de los grupos A, B, C,





que se emplea únicamente con las colonias (78).

Para efectuar la prueba directa a partir de las colonias, se eligen cuidadosamente las de estreptococos beta hemolíticos (en el caso de los grupos A, B, C, F y G); posteriormente, con una asa se toman entre 1 y 5 colonias que se utilizan como inóculo.

Cuando la prueba se efectúa a partir de cultivos líquidos de una noche, la turbidez debe ser evidente (equivalente a una densidad del estándar 2 ó 3 de Mac-Farland).

A continuación, se trate de cultivos líquidos o sólidos, se deposita sobre una laminilla una gota del reactivo seleccionado (sueros de los grupos A, B, C, D, F ó G) y cerca de ella se coloca el inóculo; empleando una asa o aplicador se mezclan ambos reactantes y, enseguida, se balancea la laminilla durante 1 minuto inclinándola a un ángulo de 45° cada dos segundos. La coagulación ocurre generalmente entre 15 segundos y 2 minutos; después de este tiempo no es recomendable hacer lecturas porque el reactivo se puede evaporar y la reacción podría interpretarse erróneamente como positiva.

En relación a las reacciones cruzadas que deberán considerarse están las siguientes:

S. pneumoniae coaglutina con el suero para el grupo C y, en ocasiones, algunas cepas de S. faecalis provocan una

coaglutinación dudosa con el mismo reactivo.

Los miembros del género Listeria poseen similitudes antigénicas con los estreptococos del grupo B y, por lo tanto, reaccionan positivamente con el suero dirigido contra este grupo.

#### AGLUTINACION CON PARTICULAS DE LATEX (72)

En esta prueba se emplean partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos contra los estreptococos de los grupos A, B, C, D, F y G; la reacción de aglutinación se produce cuando la suspensión de látex se mezcla con el reactivo correspondiente.

En este fundamento se basa la prueba Streptex Streptococcus Test la cual tiene como variante el uso de una enzima (pronasa) que extrae el carbohidrato específico de grupo; dicho sistema puede aplicarse a cultivos puros provenientes de medios sólidos y/o líquidos (34,88): en el primer caso, a partir de un cultivo puro de estreptococos incubados durante toda la noche a 35°C en agar de tripticasa y soya adicionado de sangre de carnero, se prepara una suspensión abundante de células transfiriendo como mínimo tres asadas del cultivo a 0.4 ml de solución de pronasa (proporcionada en el equipo); enseguida, se mezcla la suspensión y se incuba a 56°C por una hora y el último paso consiste en centrifugar para obtener el sobrenadante, el cual se proba-

rá con el reactivo de látex.

Para efectuar la prueba a partir de medio líquido, los estreptococos se inoculan en 20 ml de caldo Todd-Hewitt y se incuban a 35°C durante toda la noche (18 horas); después de este tiempo, se centrifuga el medio para recuperar las células y, enseguida, se prepara una suspensión abundante en 0.4 ml de solución de pronasa; una vez que se ha mezclado bien, se incuba a 56°C por una hora y, por último, se centrifuga para obtener el sobrenadante que se probará con el reactivo de látex.

El procedimiento a seguir para la prueba empleando el medio sólido y/o líquido se expone a continuación:

Con una pipeta Pasteur se deposita sobre una placa una gota de extracto del antígeno y junto a ésta se coloca una gota de los reactivos de aglutinación para los grupos A, B, C, D, F ó G; con un aplicador se mezclan ambos reactantes y se balancea la placa durante 2 minutos o hasta que se observa una aglutinación definida.

#### CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (31,88)

La contrainmunolectroforesis (CIE) es una técnica inmunológica que sirve para la detección de antígenos solubles o anticuerpos; se usa mucho en la identificación de los antígenos bacterianos a partir de suero, líquidos pleurales, orina, esputo y líquido cefalorraquídeo. La combina-

ción de CIE y observación directa al microscopio proporciona una detección del 85% en un lapso de una hora; además, por medio de la CIE es posible obtener resultados positivos en muestras falsas negativas mediante tinción de Gram y cultivo dado que se está detectando antígeno soluble.

Este método inmunológico se basa en que casi todos los antígenos bacterianos solubles poseen carga negativa en un medio ligeramente alcalino ( $\text{pH} = 8.2 - 8.6$ ) y, bajo las mismas condiciones, el anticuerpo (generalmente IgG de conejo) es neutro o bien posee carga pequeña.

Para efectuar la CIE, se practican dos pocillos opuestos en un portaobjetos cubierto con gel de agarosa: uno de ellos se llena con el antígeno y, el otro, con el anticuerpo específico. Se coloca un campo eléctrico a través del portaobjetos, en forma tal que el antígeno sea atraído hacia el ánodo y, el anticuerpo, aprovechando el flujo normal de la solución reguladora (electroendosmosis), lo sea hacia el cátodo. El complejo antígeno-anticuerpo formado en la zona de equivalencia se observa como una línea de precipitación entre los dos pocillos (Fig. 1.2).

Con respecto a la sensibilidad de la CIE, Smaron (88) reporta que se requieren de  $10^5$  a  $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro para que se puedan detectar los antígenos de los estreptococos de los grupos A, B, C y D.

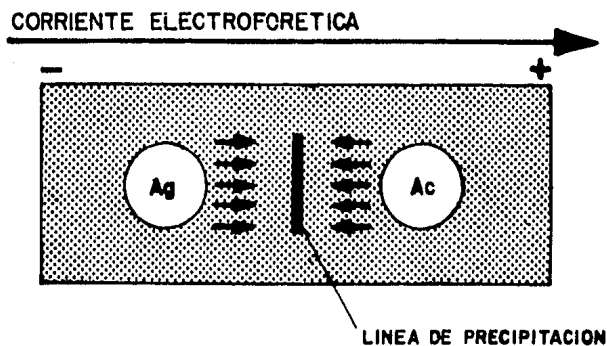


Fig. 1.2. Principio de la contraelectroforesis (CIE).

En cuanto a su uso en el diagnóstico de las enfermedades producidas por estreptococos, la CIE se emplea básicamente en la identificación del antígeno del grupo B en los casos de meningitis (31,99) y, por lo regular, el corrimiento de las muestras sigue la técnica descrita por Edwards (31): se emplea una cámara de plástico para electroforesis (de la casa Hyland) y placas preparadas con solución reguladora de barbiturato de sodio ( $\text{pH} = 8.6$ ) en 1% de agarosa. Los pocillos de las placas con una capacidad de  $10 \mu\text{l}$  cada uno, se encuentran a 3 mm de distancia; las placas se someten a una corriente de 30 miliampers por 30 minutos y a temperatura ambiente, se inspeccionan dos veces por hora y después de ser incubadas toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ .

#### INMUNOFLUORESCENCIA (33,39,88,90)

Los fluorocromos son colorantes fluorescentes que ab-

sorben la energía luminosa de cierta longitud de onda y emiten la luz de otra en un lapso de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  segundos (88,90); ésta es la propiedad en la cual se basa la técnica de inmunofluorescencia introducida por Coons (39) en 1941. En la práctica, los fluorocromos de mayor uso son el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el isocianato de tetrametilrodamina, cuyos espectros de absorción y emisión son característicos. La absorción máxima del FITC es a 490-495 nm y emite su color verde característico a 517 nm; por su parte, el isotiocianato de tetrametilrodamina emite luz roja y tiene su absorción máxima a 550 nm (39).

La técnica de inmunofluorescencia puede ser directa o indirecta; en la primera (Fig. 1.3), se añade a la extensión del material problema el anticuerpo marcado con el compuesto fluorescente y, una vez que termina el tiempo de reacción, el anticuerpo marcado que no se combina es eliminado mediante lavados; posteriormente, la preparación se observa con el microscopio de luz ultravioleta para determinar la presencia del antígeno la cual es puesta de manifiesto por la fluorescencia.

En la técnica indirecta (Fig. 1.4), los reactivos son: el antígeno, el anticuerpo A y una antigammaglobulina marcada con el compuesto fluorescente dirigida contra el anticuerpo A. En primer lugar, se añade el anticuerpo (que generalmente es el problema) al antígeno y después de incu-

bar se elimina con lavados lo que no haya reaccionado; a continuación, se agrega el anticuerpo marcado, se vuelve a incubar y a lavar y, si el anticuerpo A está presente, se observará la fluorescencia en el microscopio.

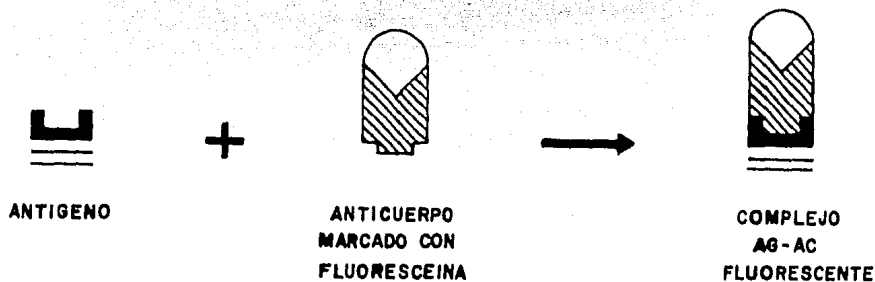


Fig. 1.3. Inmunofluorescencia directa

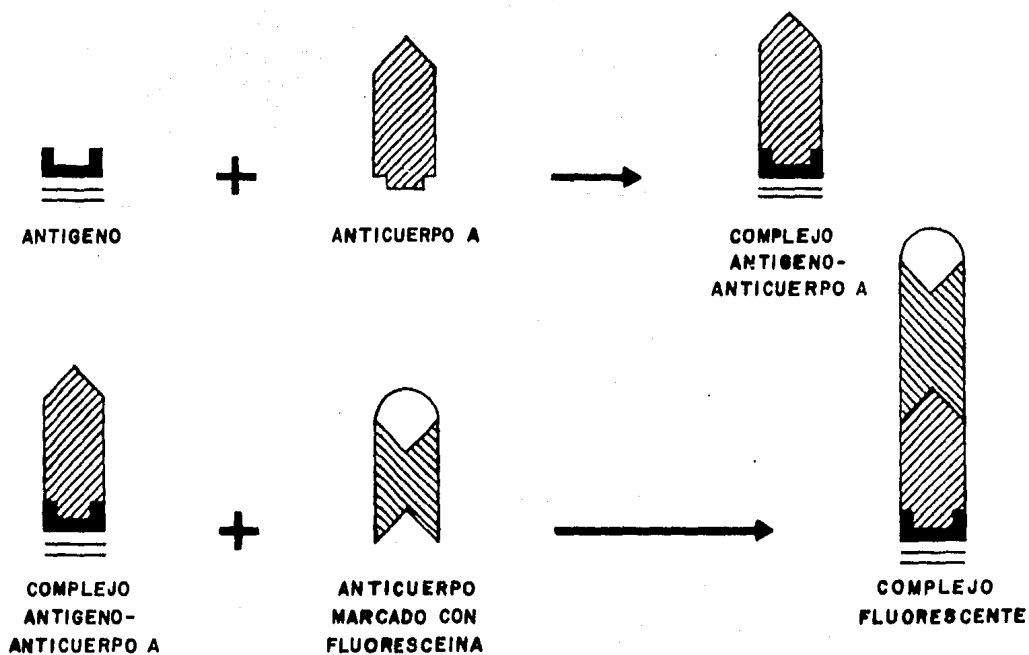


Fig. 1.4. Inmunofluorescencia indirecta

En comparación con las técnicas bacteriológicas y serológicas convencionales, las de inmunofluorescencia son rápidas, ya que permiten obtener resultados a partir de las muestras clínicas en 1 ó 4 horas; desafortunadamente, como lo demuestran los trabajos de Cherry, Moody, Eveland y Nahmias (88), de todos los procedimientos (aplicados aproximadamente a 30 especies de bacterias), sólo un número muy limitado se encuentra estandarizado; además, se requiere de personal bien entrenado y de equipo adecuado.

Entre las técnicas de inmunofluorescencia completamente aceptadas y de uso en la rutina se cuenta la de anticuerpos fluorescentes (técnica directa) para la identificación de los estreptococos del grupo A a partir de exudados faríngeos (33,88).

La técnica estándar (33,88) para preparar las láminas se describe a continuación:

- a. Se coloca el hisopo (del exudado faríngeo) en 1 ml de caldo Todd-Hewitt, tripticasa y soya o infusión de corazón y se incuba a 37°C durante 2 - 5 horas.
- b. Se retira el hisopo y se centrifuga el caldo por 5 minutos a aproximadamente 2000 rpm.
- c. El sobrenadante se vierte en una solución desinfectante y el borde del tubo se limpia con un algodón humedecido con desinfectante. Las células se resuspenden en 1 ml



- de solución salina amortiguada estéril (pH = 7.5) y se centrifuga nuevamente.
- d. La solución salina se vierte en desinfectante y mientras el tubo está en posición invertida, se elimina el diluyente con un algodón humedecido con desinfectante.
  - e. Después de colocar el tubo de ensayo en una gradilla durante 2 ó 3 minutos, se mezcla el sedimento con el diluyente y con una pipeta Pasteur se transfiere la mayor cantidad posible de sedimento a la lámina que se utiliza para la prueba.
  - f. Una vez que se ha secado el frotis al aire, se cubre con etanol al 95% durante un minuto y se espera a que el excedente se evapore. Los frotis ya secos están listos para utilizarse o guardarse en congelación si se van a emplear posteriormente.

Para efectuar la tinción, el procedimiento a seguir es:

- a. Se cubre el frotis con el conjugado globulina antiestreptococo del grupo A marcada con FITC.
- b. Después de incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda, se elimina el exceso de conjugado con una toalla de papel empapada de desinfectante.
- c. Las placas se sumergen en solución salina amortiguada

estéril con un pH de 7.5 y, posteriormente, se transfieren a un segundo recipiente que contiene la misma solución dejándolas reposar durante 10 minutos. Por último, se sumergen en agua destilada y se dejan secar al aire.

- d. Para la observación de las placas se añade una gota de glicerol amortiguado de montaje (pH = 9.0) y encima de ella se coloca un cubreobjetos (con una gota de esmalte de uñas en cada esquina) tratando de impedir la formación de burbujas. Los frotis coloreados y montados pueden refrigerarse (no congelarse) y examinarse dentro de las 24 a 48 horas siguientes, sin que haya pérdida significativa en el brillo de la fluorescencia.

Las cepas de los estreptococos del grupo A exhibirán una fluorescencia de 3+ a 4+ con las células bien delineadas de color amarillo verdoso brillante y centro no coloreado claramente definido; los estreptococos de otros grupos y los estafilococos no mostrarán dichas características.

Las principales ventajas de la técnica de anticuerpos fluorescentes son que es rápida y no se requieren cultivos puros. Con respecto a la identificación de los estreptococos de los grupos B, C, D, F y G, aunque se dispone de los sueros, no se recomienda usarlos debido a su baja potencia y porque se presentan reacciones cruzadas (33).

I.2. COMPOSICION Y PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO  
CALDO DE TODD-HEWITT (Updyke y Nickle)

El caldo de Todd-Hewitt se diseñó originalmente para detectar la producción de hemolisina estreptocócica; la modificación de Updyke y Nickle se emplea de preferencia para realizar el estudio de investigación serológica de los estreptococos.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Infusión de carne corazón	500.0
Peptona	20.0
Dextrosa	2.0
Cloruro de sodio	2.0
Fosfato disódico	0.4
Carbonato de sodio	2.5

Preparación:

Se disuelven 30 gramos del polvo en un litro de agua destilada, se distribuye y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

CALDO DE TRIPTICASA Y SOYA

Es un medio muy rico en nutrientes que permite la multiplicación abundante de los estreptococos. Se emplea como

medio líquido para el hemocultivo.

**Composición:**

**Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Peptona Trypticase	17.0
Peptona Phytone	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	2.5
Dextrosa	2.5

pH final 7.3  $\pm$

**Preparación:**

Se hace una suspensión con 30 gramos del polvo en un litro de agua destilada; se mezcla bien y se calienta ligeramente para completar la disolución. Posteriormente, se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 118° - 121°C (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos. Si se van a preparar volúmenes mayores, se deberá incrementar el tiempo de esterilización pero no la presión ni la temperatura.

**AGAR SANGRE**

(Agar para infusión)

Este medio se emplea para determinar la actividad hemolítica de los estreptococos y es el recomendado para realizar la prueba de la bacitracina.

**Composición:**

**Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Infusión de músculo cardíaco	375
Peptona Thiotone	10
Cloruro de sodio	5
Agar	15

pH final ± 7.3

**Preparación:**

Se suspenden 40 gramos del polvo en un litro de agua destilada y se deja reposar durante 5 minutos. Se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente. Se hierve durante un minuto. Si se emplean matraces de 100 y 1000 ml, el medio se esteriliza a 121°C (15 libras de presión) durante 20 y 30 minutos respectivamente y cuando se distribuye en tubos se esteriliza por 15 minutos en las mismas condiciones. Después de la esterilización cuando el agar se encuentra a una temperatura entre 45° - 50°C se le añade sangre de carnero desfibrinada estéril al 5% con una rotación suave para que la sangre se distribuya uniformemente en el medio. La mezcla se vacía en las placas correspondientes.

**AGAR DE TRIPTICASA Y SOYA**

Es un medio sólido, muy rico en nutrientes, que per-

mite la multiplicación abundante de los estreptococos. Se emplea en la prueba de CAMP, SXT y para el hemocultivo.

Composición:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona Trypticase	15
Peptona Phytone	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

pH final 7.3  $\pm$

Preparación:

Se suspenden 40 gramos del polvo en un litro de agua destilada; se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente durante un minuto para que se disuelva; después, se esteriliza entre 118° y 121°C a una presión no mayor de 15 libras durante 15 minutos. Si se van a preparar volúmenes mayores, se deberá aumentar el tiempo de esterilización pero no la presión ni la temperatura. Una vez esterilizado el medio, se deja enfriar aproximadamente a 45°C y se añade de 5 a 10% de sangre de carnero desfibrinada estéril, se homogeniza y se vacía en las placas correspondientes.

#### MEDIO PARA LA HIDROLISIS DEL HIPURATO DE SODIO

Para determinar la hidrólisis del hipurato de sodio

se utiliza el siguiente medio:

Caldo de infusión de corazón	25 g
Hipurato de sodio	10 g
Agua destilada	1000 ml

Después de vertir el medio en tubos con tapa de rosca de 15 X 125 mm y de apretar la tapa para impedir la evaporación se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

En la prueba se usa como revelador el siguiente reactivo:

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12 g
HCl al 2%	100 ml

El HCl al 2% se prepara agregando 5.4 ml de HCl concentrado (37%) a 94.6 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### MEDIO PARA LA PRUEBA DE HIDROLISIS DE ESCULINA

Para prepararlo se utiliza el siguiente procedimiento:

1. Se agregan 23 g de agar nutritivo a 400 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ; se mezcla bien y se calienta hasta que la consistencia sea coloidal.
2. Se agregan 40 g de bilis de buey a 400 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ; se mezcla bien y se calienta hasta que se disuelva.

3. Se agregan 0.5 g de citrato férrico a 100 ml de H<sub>2</sub>O, se mezcla bien y se calienta hasta que se disuelva.
4. Se agrega 1 g de esculina a 100 ml de H<sub>2</sub>O, se calienta suavemente para disolverla y se esteriliza por filtración (Seitz o Millipore).

Se combinan las soluciones 1, 2 y 3, se mezclan bien y se mantienen a 100°C por 10 minutos; después de esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, se enfría el medio hasta los 50°C y se le agrega en forma aséptica la solución de esculina esterilizada; se mezcla bien y se vierte a tubos con tapa de rosca de 16 X 125 mm colocándolos en un plano inclinado.

#### MEDIO CON NaCl AL 6.5%

- 1) Caldo de infusión de corazón: 25 gramos
- 2) NaCl: 60 gramos
- 3) Un ml de indicador (1.6 gramos de púrpura de bromocresol en 100 ml de etanol al 95%).
- 4) Dextrosa: 1 gramo
- 5) Agua destilada: 1000 ml

Se añaden los reactivos juntos hasta completar 1000 ml; no debe compensarse la pérdida de volumen causada por el NaCl. Se distribuye en tubos adecuados (15 X 125 mm con tapón de rosca) y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.



## BIBLIOGRAFIA

1. Appelbaum P. C. "group C streptococcal meningitis". Ma  
yo Clin. Proc. (letter) 53(11): 763-764. (1978).
2. Appelbaum P. C., Friedman ZVI., Fairbrother P. F., Hell  
mann J. and Hallgren E. J. "Neonatal sepsis due to  
group G streptococci". Acta Paediatr. Scand. 69(4):  
559-562. (1980).
3. Appelbaum P. C., Shaikh B., Gordon R. A. and Hallgren  
E. J. "Septicemia due to Streptococcus equisimilis in  
a child with acute lymphoblastic leukemia". Cancer.  
44(4): 1226-1227. (1979).
4. Ancona R. J., Thompson T. R. and Ferrieri P. "Group G  
streptococcal pneumonia and sepsis in a newborn infant".  
J. Clin. Microbiol. 10(5): 758-759. (1979).
5. Arredondo J. L. "Sepsis neonatal". Infectologia. 9:  
236-241. (1984).
6. Asplin C. M., Beeching N. J. and Slack M. P. "Osteomie-  
litis due to Streptococcus equisimilis (group C)".  
Br. Med. J. 1(6156): 89-90. (1979).
7. Bailey W. R., Scott E. G. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO.  
6a. ed., Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires,  
(1983).
8. Baker C. J. "Unusual occurrence of neonatal septicemia  
due to group G Streptococcus". Pediatrics. 53: 568-570.  
(1974).
9. Bartlett R. C., Ellner P. D. and Washington J. A. BLOOD  
CULTURES. Cumulative Techniques and Procedures in Clini  
cal Microbiology. American Society for Microbiology.  
Washington, D. C. (1974).
10. BBL, MANUAL DE PRODUCTOS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATO-  
RIO. Editores Asociados, S. A. México, (1974).
11. Beeson P. B., McDermott W. and Wyngaarden J. B. TRATADO  
DE MEDICINA INTERNA. 15ava. ed., volumen 1. Nueva Edi-

- torial Interamericana. México, (1983).
12. Belcher D. W., Afoakwa S. N., Osei-Tutu E., Wurapa F. K. and Osei L. "Non-group-A streptococci in ghanaiian patients with pyoderma". *Lancet (letter)* 2(7943): 1032. (1975).
  13. Benjamin J. T. and Periello V. A. "Pharyngitis due to group C hemolytic streptococci in children". *J. Pediatr.* 89(2): 254-256. (1976).
  14. Blair D. C. and Martin D. B. "Beta hemolytic streptococcal endocarditis: predominance of non-group A organisms". *Am. J. Med. Sci.* 276(3): 269-277. (1978).
  15. Brans Y. W. "Group G streptococcal sepsis". *Pediatrics.* (letter) 55: 745-746. (1975).
  16. Brown J. and Savage D. "Group C streptococcal endocarditis". *South. Med. J.* 73(1): 86. (1980).
  17. Bouza E., Meyer R. D. and Busch D. F. "Group G streptococcal endocarditis". *Am. J. Clin. Pathol.* 70(1): 108-111. (1978).
  18. Burnett G. W. and Schuster G. S. REVIEW OF PATHOGENIC MICROBIOLOGY. The C. V. Mosby Co. USA, (1974).
  19. Calderón J. E. CONCEPTOS CLINICOS DE INFECTOLOGIA. 8a. ed., Ediciones Francisco Méndez Cervantes. México, (1983).
  20. Cowan S. T., Steel K. J. MANUAL PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA MEDICA. 2a. ed., Cía. Editorial Continental, S. A. México, (1979).
  21. Cluff L. E., Jhonson J. E. CLINICAL CONCEPTS OF INFECTIOUS DISEASES. Williams and Wilkins Co. Baltimore, (1972).
  22. Curtis S. N. and Krause R. M. "Immunochemical studies on the specific carbohydrate of group G streptococci". *J. Exp. Med.* 119: 997-1004. (1964).
  23. Chung S. J. "Meningitis caused by Streptococcus equisimilis (group C)". *South. Med. J.* 75(6): 769. (1982).
  24. Davies B. D., Dulbecco R., Eisen H. and Ginsberg H.

- MICROBIOLOGY. 3th. ed., Harper and Row Publishers Inc. USA, (1980).
25. Davies M. K., Ireland M. A. and Clarke D. B. "Infective endocarditis from group C streptococci causing stenosis of both the aortic and mitral valves". *Thorax* 36: 69-71. (1981).
  26. Deibel R. H. and Seeley H. W. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8th. ed., Williams and Wilkins Co. USA, (1974).
  27. De la Cruz R., Arredondo J. L. "Hemocultivos y septicemia". *Infectología* 5: 119-126. (1984).
  28. Drusin L. M., Ribble J. C. and Topf B. "Group C streptococcal colonization in a newborn nursery". *Am. J. Dis. Child.* 125: 820-821. (1973).
  29. Duca E., Teodorovici G., Radu C., Vita A., Talasman-Niculescu P., Bernescu E., Feldi C. and Rosca V. "A new nephritogenic Streptococcus". *J. Hyg. (Camb.)* 67: 691-698. (1969).
  30. Dyson A. E. and Read S. E. "Group G streptococcal colonization and sepsis in neonates". *J. Pediatr.* 99(6): 944-947. (1981).
  31. Edwards M. S. and Baker C. J. "Prospective diagnosis of early group B streptococcal infection by countercurrent immunoelectrophoresis". *J. Pediatr.* 94(2): 286-288. (1979).
  32. Facklam R. R. "The major differences in the american and british Streptococcus taxonomy schemes with special reference to Streptococcus milleri". *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3(2): 91-93. (1984).
  33. Facklam R. R. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESTREPTOCOCOS. Center for Disease Control Publication.
  34. Facklam R. R., Cooksey R. C. and Wortham E. C. "Eva-

- valuation of commercial latex agglutination reagents for grouping streptococci". *J. Clin. Microbiol.* 10(5): 641-646. (1979).
35. Feingold D. S., Stagg N. L. and Kunz L. J. "Extrarespiratory streptococcal infections". *N. Engl. J. Med.* 275(7): 356-361. (1966).
  36. Filker R. S. and Monif G. R. "Postpartum septicemia due to group G streptococci". *Obstetrics and Gynecology (Suppl)* 53(3): 28S - 30S. (1979).
  37. Finnegan P., Fitzgerald M. X. M., Cumming G. and Geddes A. M. "Lancefield group C streptococcal endocarditis". *Thorax* 29: 245-247. (1974).
  38. Freeman B. A. BURROWS. TEXTBOOK OF MICROBIOLOGY. 21st. ed., W. B. Saunders Co. Philadelphia, (1979).
  39. Fudenberg H. H., Stites D. P., Caldwell J. L., Wells J. V. INMUNOLOGIA CLINICA. 2a. ed., Editorial El Manual Moderno. México, (1980).
  40. Fujita N. K., Lam K. and Bayer A. S. "Septic arthritis due to group G Streptococcus". *JAMA.* 247(6): 812-813. (1982).
  41. Fulginiti V. A., Ey J. L. and Ryan K. J. "Recurrent group C streptococcal tonsillitis in an adolescent male requiring tonsillectomy". *Clin. Pediatr. (Phila.)* 19(12): 829-830. (1980).
  42. Ghoneim ATM. and Cooke E. M. "Serious infection caused by group C streptococci". *J. Clin. Pathol.* 33(2): 188-190. (1980).
  43. Goldenberg D. L., Reed J. I. "Artritis bacteriana". *Infectología* 6: 158-173. (1985).
  44. Goldmann D. A. and Breton S. J. "Group C streptococcal surgical wound infections transmitted by an anorectal and nasal carrier". *Pediatrics.* 61(2): 235-237. (1978).
  45. González S. N., Torales T. A., Gómez B. D. INFECTOLOGIA CLINICA. 1a. ed., Editorial Trillas. México, (1984).

46. Gotoff S. P. and Behrman R. E. "Neonatal septicemia". *J. Pediatr.* 76(1): 142-153. (1970).
47. Hamilton M. E. and Gibson R. S. "Group C streptococcal arthritis". *N. Y. State J. Med.* 80(11): 1746-1747. (1980).
48. Hanson G. and Engel P. J. "Purulent pericarditis caused by B-hemolytic group C Streptococcus". *Arch. Intern. Med.* 141(10): 1351-1353. (1981).
49. Harrison T. R. *MEDICINA INTERNA*. 4a. ed., La Prensa Médica Mexicana. México, (1973).
50. Hill H. R., Caldwell G. G., Wilson E., Hager D. and Zimmerman R. A. "Epidemic of pharyngitis due to streptococci of Lancefield group G". *Lancet* 2: 371-374. (1969).
51. Iovine E., Selva A. A. *EL LABORATORIO EN LA CLINICA*. 2a. ed., Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, (1979).
52. Jawetz E., Melnick J. L., Adelberg E. A. *MANUAL DE MICROBIOLOGIA*. 9a. ed., Editorial El Manual Moderno. México, (1981).
53. Joklik W., Willett H. P., Amos D. B. *ZINSSER. MICROBIOLOGIA*. 17ava. ed., Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, (1983).
54. Keville M. W. and Doern G. V. "Comparison of the API 20S Streptococcus identification system with an immunorephoresis procedure and two commercial latex agglutination tests for identifying beta hemolytic streptococci". *J. Clin. Microbiol.* 16(1): 92-95. (1982).
55. Khan A. J., Evans H. E., Macabuhay M. R., Lee Y-E. and Werner R. "Primary peritonitis due to group G Streptococcus: A case report". *Pediatrics.* 56(6): 1078-1079. (1975).
56. Köhler W. and Cederberg A. "Streptococcus zooepidemicus (group C streptococci) as a cause of human infection".

- Scand. J. Infect. Dis. 8: 217-218. (1976).
57. Koneman E. W., Allen S. D., Dowell V. R., Sommers H. M. DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO. TEXTO Y ATLAS COLOR. 1a. ed., Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, (1983).
  58. Krause R. M. and McCarty M. "Studies on the chemical structure of the streptococcal cell wall. II. Composition of group C walls and chemical basis for serologic specificity of the carbohydrate moiety". J. Exp. Med. 115: 49-62. (1962).
  59. Kumate J., Gutiérrez G. MANUAL DE INFECTOLOGIA. 7a. ed., Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". México. (1980).
  60. Kunz L. J. and Moellering R. C. DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR BACTERIAL, MYCOTIC AND PARASITIC INFECTIONS. American Health Association. USA, (1981).
  61. Lam K. and Bayer A. S. "Serious infections due to group G streptococci. Report of 15 cases with in vitro-in vivo correlations". Am. J. Med. 75(4): 561-570. (1983).
  62. Lennette E. H., Balows A., Hausler W. J., Truant J. MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA. 3a. ed., Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, (1982).
  63. Lin A. N., Karasik A., Salit I. E. and Fam A. G. "Group G streptococcal arthritis". J. Rheumatol. 9: 424-427. (1982).
  64. Low D. E., Young M. R. and Harding G. K. "Group C streptococcal meningitis in an adult. Probable acquisition from a horse". Arch. Intern. Med. 140(7): 977-978. (1980).
  65. Martinez-Luengas F., Inclan G. M., Pastor A., Montejo M., Barron J., Baroja A. and Aguirre C. "Endocarditis due to Streptococcus zooepidemicus". Can. Med. Assoc. J. 127(1): 13. (1982).
  66. McCue J. D. "Group G streptococcal pharyngitis. Analysis of an outbreak at a college". JAMA. 248(11): 1333-

1336. (1982).
67. Mogabgab W. J. "Beta-hemolytic streptococcal and concurrent infections in adults and children with respiratory disease, 1958 to 1969". *Am. Rev. Respir. Dis.* 102: 23-34. (1970).
  68. Mohan V. K., Tilton R. C., Raye J. R. and DeSilva H. N. "Fatal group G streptococcal sepsis in a preterm neonate". *Am. J. Dis. Child.* 134(9): 894-895. (1980).
  69. Mohr D. N., Feist D. J., Washington J. A. and Hermans P. E. "Meningitis due to group C streptococci in an adult". *Mayo Clin. Proc.* 53(8): 529-532. (1978).
  70. Mohr D. N., Feist D. J., Washington J. A. and Hermans P. E. "Infections due to group C streptococci in man". *Am. J. Med.* 66: 450-456. (1979).
  71. Morales P., Marco V., Nauffal D., Santos M. y Gobernado M. *MEDICINE. Tratado de Medicina Práctica. Neumología II.* México, (1982).
  72. Morello J. A. and Randall E. L. *IDENTIFICATION OF AEROBIC GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE COCCI.* American Society for Microbiology. Washington, D. C. (1981).
  73. Nakata M. M., Silvers J. H. and George W. L. "Group G streptococcal arthritis". *Arch. Intern. Med.* 143(7): 1328-1330. (1983).
  74. Nieburg P. I. "Fatal group G streptococcal sepsis in a neonate". *Scand. J. Infect. Dis.* 11:93-95. (1979).
  75. Noble J. T. and McGowan K. "Group C streptococcal pneumonia in an adolescent". *Am. J. Dis. Child.* 137(10): 1023. (1983).
  76. Noble J. T., Tyburski M. B., Berman M., Greenspan J. and Tenenbaum M. J. "Antimicrobial tolerance in group G streptococci". *Lancet (letter)* 2(8201): 982. (1980).
  77. Nordlander I-M., Thal E. and Tunevall G. "Occurrence and significance of hemolytic streptococci groups B-U in human infectious disease". *Scand. J. Infect. Dis.*

- 7: 35-38. (1975).
78. Pharmacia Diagnostics AB, International. Phadebact<sup>R</sup> Streptococcus Test, Strep A, B, D, F Test. (1984).
  79. Piatkin K. D. y Krivoshein Y. S. MICROBIOLOGIA. 2a. ed., Editorial Mir. Moscú, (1981).
  80. Portnoy D., Wink I., Richards G. K. and Blanc M. Z. "Bacterial endocarditis due to a penicillin-tolerant group C Streptococcus". Can. Med. Assoc. J. 122(1): 69-70, 75. (1980).
  81. Quinn R. J., Hallett A. F., Appelbaum P. C. and Cooper R. C. "Meningitis cause by Streptococcus dysgalactiae in a preterm infant". Am. J. Clin. Pathol. 70(6): 948-950. (1978).
  82. Reller L. B., Murray P. R. and MacLowry J. D. BLOOD CULTURES II. Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D. C. (1982).
  83. Rolston K. V., LeFrock J. L. and Schell R. F. "Activity of nine antimicrobial agents against Lancefield group C and group G streptococci". Antimicrob. Agents Chemother. 22(5): 930-932. (1982).
  84. Rom S. "Beta hemolytic group C streptococcal respiratory infection in infant and horse". J. Pediatr. 91(5): 845. (1977).
  85. Rose H. D., Allen J. R. and Witte G. "Streptococcus zoepidemicus (group C) pneumonia in a human". J. Clin. Microbiol. 11(1): 76-78. (1980).
  86. Rotta J. and Facklam R. R. MANUAL OF MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTIC METHODS FOR STREPTOCOCCAL INFECTIONS AND THEIR SEQUELAE. WHO.
  87. Sanders V. "Bacterial endocarditis due to a group C beta hemolytic Streptococcus". Ann. Intern. Med. 58(5): 858-861. (1963).
  88. Sonnenwirth A. C., Jarett L. GRADWOHL'S CLINICAL LABO-



- RATORY METHODS AND DIAGNOSIS. 8th. ed., volumen 2, C. V. Mosby Co. USA, (1980).
89. Stamm A. M. and Cobbs C. G. "Group C streptococcal pneumonia: Report of a fatal case and review of the literature". Rev. Infect. Dis. 2(6): 889-898. (1980).
90. Stanley R. LYNCH'S MEDICAL LABORATORY TECHNOLOGY. W. B. Saunders Co. USA, (1983).
91. Stewardson-Krieger P. and Gotoff S. P. "Neonatal meningitis due to group C beta hemolytic Streptococcus". J. Pediatr. 90(1): 103-104. (1977).
92. Tietz N. W. QUIMICA CLINICA MODERNA. 1a. ed., Editorial Interamericana. México, (1972).
93. Timoney J. F., Pesante L. and Ernst C. MICROBIOLOGY. Hyaluronidase associated with a temperate bacteriophage of Streptococcus equi. American Society for Microbiology. Washington, D. C. (1982).
94. Topley W., Wilson G. S. PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY, VIROLOGY AND IMMUNITY. 6th. ed., volumen 1, Williams and Wilkins Co. Baltimore, (1975).
95. Tuazon C. U. "Group G Streptococcus". Am. J. Med. Sci. 279(2): 121-124. (1980).
96. Wannamaker L. W. MICROBIOLOGY. Transformation, transduction, and bacteriophage. Phages, transduction, and phage-associated enzymes of group A, C, and G streptococci. American Society for Microbiology. Washington, D. C. (1982).
97. Wasilaukas B. L. "Subacute bacterial endocarditis caused by group G B-hemolytic Streptococcus". Am. J. Dis. Child. 131(12): 1416-1417. (1977).
98. Webb B. J. and Baker C. J. "Commercial latex agglutination test for rapid diagnosis of group B streptococcal infection in infants". J. Clin. Microbiol. 12(3): 442-444. (1980).

99. Webb B. J., Edwards M. S. and Baker C. J. "Comparison of slide coagulation test and countercurrent immunoelectrophoresis for detection of group B streptococcal antigen in cerebrospinal fluid from infants with meningitis". *J. Clin. Microbiol.* 11(3): 263-265. (1980).
100. Wetkowski M. A., Peterson E. M. and De la Maza L. M. "Direct testing of blood cultures for detection of streptococcal antigens". *J. Clin. Microbiol.* 16(1): 86-91. (1982).
101. Youmans G. P., Paterson P. Y., Sommers H. M. *THE BIOLOGIC AND CLINICAL BASIS OF INFECTIOUS DISEASES*. 2nd. ed., W. B. Saunders Co. Philadelphia. (1980).