



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

OBTENCION DE SUERO ANTICARBOHIDRATO C
DE Streptococcus pyogenes DEL GRUPO A

FALLA DE CEMENTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA ALEJANDRINA LIZARRAGA PINEDA

DIRECTOR DE TESIS,
Q.F.I. ANDREA BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E G E N E R A L

	PÁG.
RESUMEN	4
I. INTRODUCCION	5
II. GENERALIDADES	9
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
A. Morfología	9
B. Metabolismo	9
C. Estructura Celular	10
D. Toxinas Extracelulares	18
E. Patogenia	21
F. Inmunidad	25
G. Epidemiología	27
H. Diagnóstico de Laboratorio	29
I. Susceptibilidad a las Drogas	37
J. Prevención	37
III. OBJETIVOS	39
IV. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	41
V. MATERIAL Y METODOS	42
A. Extracción del Carbohidrato C	42
B. Determinación de la concentración de Carbohidrato C	45
C. Inmunización	47
D. Título de Anticuerpos	49
E. Evaluación del Suero	54
F. Conservación del Suero	55

VI. RESULTADOS	54
VII. DISCUSION	60
VIII. CONCLUSIONES	60
IX. BIBLIOGRAFIA	64

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Características importantes que ayudan a diferenciar el género <i>Streptococcus</i> de <i>Staphylococcus</i> y <i>Micrococcus</i>	5
Tabla 2	Composición Química de las Paredes Celulares de Estreptococo, y del Carbohidrato Grupo Especifico	17
Tabla 3	Características para diferenciar a los diferentes grupos de Estreptococos	30
Tabla 4	Protocolo de Inmunización	40
Tabla 5	Porcentajes obtenidos de los componentes de Carbohidrato C	57
Tabla 6	Resultados obtenidos con la prueba de Precipitación en Capilar para las 15 cepas clasificadas como Estreptococo β -hemolítico grupo A por prueba de Bacitracina	59
FIGURA 1	Estructura Celular de <i>Streptococcus</i> <i>EXPERIES</i>	10
FIGURA 2	Estructura de Carbohidrato C	14
FIGURA 3	Composición Química de Carbohidrato C	15
FIGURA 4	Diagrama de Trabajo para la extracción de Carbohidrato C	43

G L O S A R I O

- Ac : Anticuerpo
- Ady : Adyuvante
- Ag : Antígeno
- AMP : Monofosfato de adenosina
- BHI : Infusión cerebro corazón
- CAMP : Christie, Atkins, and Munch-Petersen
(nombre de sus descubridores)
- CHO : Carbohidrato
- CIE : Contraimmunoelectroforesis
- DNasa : Desoxirribonucleasa
- ONA : Glomerulonefritis aguda
- LTA : Acido lipoteicoico
- MIC : Mínima concentración inhibitoria
- µg : microgramos
- µm : micrometros
- NACGlc : N-acetil glucosamina
- NADasa : Dinucleotidasa de nicotinamida adenina
- PBS : Solución amortiguadora de fosfatos
- P.M. : Peso molecular
- PMNs : Polimorfonucleares
- PPG : Peptidoglicano
- PPGFS : Peptidoglicano-Polisacárido
- Ram : Ramosa
- Tris : Hidroximetilamino metano
- Vi : Region variable de la cadena ligera Pappa

RESUMEN

Los estreptococos se clasifican en diferentes grupos sobresaliendo por su patogenecidad *Streptococcus pyogenes* del grupo A, el cual es responsable de enfermedades como fiebre reumática, amigdalitis folicular, glomerulonefritis aguda, bronconeumonía, nefritis, erisipela y escarlatina entre otras. Este microorganismo requiere un tratamiento más cuidadoso mientras que las otras especies suelen tener menos importancia (14). Por lo tanto es importante determinar el carbohidrato "C" específico del grupo a que pertenecen por medio de pruebas de serotipificación donde se confronte el antisuero específico grupo A con antígeno extraído de estreptococo B-hemolítico.

En este trabajo, el carbohidrato C fue extraído por el método de Lancefield a partir de la cepsa de *Streptococcus B-hemolítico* grupo A tipo M5. Se serotificó utilizando antisuero control específico para grupo A mediante las técnicas de Coagulación y Precipitación en Capilar, y se purificó por la técnica de Filtración.

El carbohidrato C fue inoculado en 10 conejos nueva zelande para obtener suero anti-carbohidrato C de *Streptococcus pyogenes* del grupo A. Con el objeto de probar su especificidad, se puso en contacto con antígenos extraídos de cepas problema previamente identificadas como *Streptococcus B-hemolítico* grupo A (prueba de Bacitracina). Se utilizaron pruebas de Precipitación en Capilar, demostrándose su utilidad en el Laboratorio de Bacteriología Diagnóstica como herramienta esencial en la identificación de este microorganismo.

I. INTRODUCCION

ESTREPTOCOCCOS.

Historia y Clasificación. Billroth en 1874, describió por primera vez unos microorganismos esféricos que crecían formando cadenas a partir de abscesos purulentos de lesiones erisipelatosas y heridas infectadas. Más tarde demostró la existencia de organismos similares, denominados Estreptococci (del griego Streptos, sinuado, torsionado) en la sangre de una mujer con fiebre purpúrea grave. Poco después fueron aislados a partir de enfermos graves con escarlatina, y en 1882, Fehleisen provocó erisipelas típicas en voluntarios humanos con cultivos puros de estreptococcos obtenidos a partir de lesiones de pacientes afectados con esta enfermedad.

En principio se pensó que cada tipo de enfermedad estreptocócica era producido por una variedad específica de estreptococo, pero actualmente se sabe que una única especie de estreptococo puede ser responsable de varias enfermedades.

En 1903, Schottmüller propuso que las diferentes variedades fueran clasificadas según su capacidad para hemolizar los eritrocitos y, en 1919, Brown introdujo los términos Alfa, Beta y Gamma para describir los tres tipos de reacción hemolítica observados en placas de agar sangre (15).

Características comunes del Grupo de los Estreptococos.

Cocos gram positivos; inmóviles. Anaerobios facultativos. Catalasa negativos; oxidasa negativos. Los carbohidratos son fermentados; no se produce gas. Los nitratos no son reducidos. No producen indol ni ácido sulfhídrico. Una prueba importante para la identificación de estreptococos y para diferenciarlos de *Staphylococcus aureus* que también son beta hemolíticos, es la prueba de la catalasa. La prueba de bacitracina se considera una prueba presuntiva para estreptococos del grupo A (10).

En la Tabla No. 1 se mencionan características importantes que ayudan a diferenciar el género *Streptococcus* de *Staphylococcus* y *Micrococcus* (10).

Tabla No. 1

	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Micrococcus</i>
Morfología	Cadenas largas	Racimos	Pares o cadenas de cuatro
Catalasa	-	+	+
Coagulasa	-	+	-
Crecimiento	Anaerobio facultativo	Anaerobio facultativo	Aerobio
O/F	F	F	O/F
Bacitracina	(+) Gpo. A	(-)	(-)

A partir de los trabajos de Lancefield, en los primeros años de la década de 1930, los estreptococos beta hemolíticos fueron diferenciados en grupos inmunológicos, de nombrados actualmente por las letras A hasta O (6, 15, 23, 34, 39).

Los antígenos grupo específicos fueron identificados como carbohidratos y la mayor parte de las cepas causantes de las infecciones humanas pertenecían al grupo A. A su vez, el grupo A contiene una variedad de tipos antigénicos, como fue demostrado posteriormente por métodos de precipitación (Lancefield) y por reacciones de aglutinación (Griffith). Se demostró que los antígenos específicos de grupo, son carbohidratos mientras que los antígenos tipo específicos, son proteínas (15).

Algunos de los grupos de Estreptococos que causan problemas en el humano.-

Grupo A (*Streptococcus pyogenes*). - Es un organismo beta-hemolítico, involucrado etiológicamente en la patogénesis de fiebre reumática, nefritis, amigdalitis folicular, septicemia, bronconeumonía, osteomielitis, erisipela, escarlatina.

Grupo B (*Streptococcus agalactiae*). - Es usualmente beta-hemolítico, se encuentra frecuentemente en los tractos genital e intestinal de infantes y adultos aparentemente sanos. Algunos estreptococos del grupo B son no-hemolítico. Estreptococo grupo "B" es responsable de casos de sepsis perinatal, endocarditis, y neumonitis en adultos.

Grupo C.- Hay cinco especies en este grupo: *St. equinus*, *St. equisimilis*, *St. zooepidemicus* (beta-hemolítico), y *Streptococcus* (alfa-hemolítico). Se encuentran normalmente en faringe, vagina y sobre la piel, pero han sido aislados de infecciones como sepsis puerperal, celulitis, endocarditis, y faringitis.

Grupo D.- *St. faecalis*, *St. faecium*, *St. durans*, *St. axium* (enterococos) *St. bovis*, *St. equinus* (no enterococos). Pueden ser alfa-, beta-, o no-hemolíticos y son encontrados comúnmente en pacientes con endocarditis, infecciones del tracto urinario, y absesos pélvicos.

Grupo F (*St. agalactiae*) se encuentran normalmente en la orofaringe humana y han sido aislados de pacientes con sinusitis, caries dental, meningitis abscesos, neumonía.

Grupo G (*St. canis*) coloniza la faringe, semejante al grupo C ha sido aislado de pacientes con faringitis.

Estreptococo alfa-hemolítico.- Especies que con frecuencia son referidas a estreptococo viridans. Estos Estreptococos se encuentran normalmente en boca y faringe, y son responsables en un alto porcentaje de casos de endocarditis.

Streptococcus pneumoniae.- Es también alfa-hemolítico y forma parte de la flora normal faríngea de un 50%-70% de la población. Es responsable de casos de neumonía lobar, septicemia, otitis media, meningitis, conjuntivitis, endocarditis (14).

II. GENERALIDADES

Streptococcus pyogenes es la especie patógena más importante para el hombre ya que produce 95% de todas las infecciones estreptocócicas.

A. Morfología. *Streptococcus pyogenes* es un coco gram positivo, comúnmente encapsulado, no esporulado, inmóvil dispuesto en cadenas de longitud variable. Las células se alargan en la dirección del eje de la cadena antes de la división. Como las células no suelen separarse después de la división, la cadena crece en longitud gracias a la persistencia del material de la pared celular que enlaza las células entre sí. La adherencia es más fuerte y firme después de la división (6,46).

B. Metabolismo. Anaerobio facultativo, cuyo crecimiento requiere de aminoácidos, purinas y pirimidinas, vitaminas, ciertos metales bivalentes y una fuente de energía como la glucosa.

Cuando se cultiva en agar sangre produce una zona clara de hemólisis alrededor de las colonias, llamada β -hemólisis. Crecce abundante en caldos (Todd-Hewitt, BHI), formando agregados (flóculos) que caen al fondo, dejando un líquido sobrenadante relativamente claro. Un crecimiento excelente se obtiene generalmente en medios de infusión cerebrosploraón o en caldo de tripticasa-soya. Fermenta glucosa y maltosa, da reacción negativa de catalasa porque carece de sistemas de citocromos. El principal producto terminal de la fermentación es el ácido láctico (6).

C. Estructura Celular de Streptococcus pyogenes.

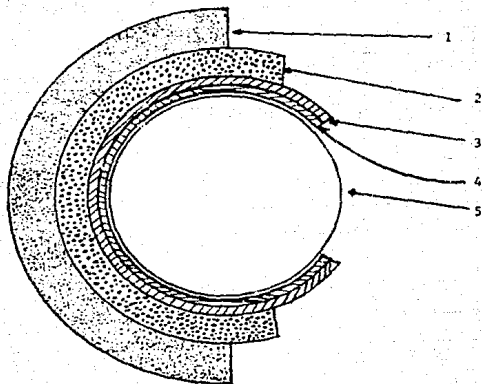


FIGURA No. 1

- 1) Cápsula: Acido Hialurónico
- 2) Pared Celular: Antigenos M, T y R
- 3) Grupo Carbohidrato C: N-acetilglucosamina, Ramnosa
- 4) Mucopeptido: N-acetilglucosamina, ácido N-acetil muránico
- 5) Membrana Citoplasmática: Proteína, lípido, glucosa

C.1. El Acido Hialurónico de la Cápsula. Esta compuesto de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. Markevitz y Dorfman demostraron la producción de ácido hialurónico por membranas protoplasmáticas estreptocócicas (32).

C.2. Pared Celular.- La pared celular de los estreptococos está constituida de componentes proteicos (antígenos M, T y R) y una fracción polisacárido (carbohidrato grupo específico) (32).

Fischetti y cols. revelaron que la pared celular de *Streptococo* grupo A no es rígida como se esperaba de los organismos gram positivos, debido a que es una estructura sorprendentemente flexible que permite elasticidad en la cadena sin que los cocos se separen (19).

C.2.1. Antígeno M.- Las proteínas M de los estreptococos grupo A son un grupo de sustancias inmunológicamente diferentes que forman la base de la clasificación de estos microorganismos en los tipos serológicos de importancia clínica y epidemiológica.

Estas proteínas se encuentran casi exclusivamente en dichos estreptococos. Las proteínas-M son antígenos de superficie que confieren tipoespecificidad a estas bacterias. Estimulan la producción de anticuerpos tipo-específico. Estos anticuerpos confieren una inmunidad duradera a un tipo particular, causando de infección estreptocócica (17,32,61).

Se ha demostrado en estudios físicos y químicos que la proteína M está compuesta por una estructura fibrilar flexible capaz de extenderse más de 600 Å de la superficie de estreptococo. Swanson y cols. revelaron que estas estructuras fibrilares aparecen como proyecciones pilosas en la pared celular (19). Son estructuras de adherencia para la colonización del hospedero susceptible (64).

La proteína-M se ha liberado de estreptococos por extracción con HCl (55), sonicación, digestión por pepsina, lisis por fagos, extracción con guanidina y detergentes no iónicos (6).

Es el principal factor virulento de estreptococo grupo A (6,9,20,72). Sin la proteína M, la bacteria puede ser opsonizada por la vía alterna del complemento y rápidamente ingerida y eliminada por los leucocitos del hospedero. El estreptococo que posee proteína M no es opsonizado, ni ingerido, a menos que el anticuerpo contra dicha proteína este presente (73).

Esta proteína M es responsable de la unión de fibrinógeno a la superficie de estreptococo grupo A es una de las interacciones más importantes entre esta bacteria y las proteínas del plasma. El fibrinógeno unido a la superficie aumenta las propiedades antifagocíticas y la actividad antiofónica de los estreptococos (23,35,60,72).

C.2.2. Antígeno T.- La proteína-T puede aislarse por digestión péptica, triptica o pancreática de estreptococos muertos por calor. Es insoluble en alcohol, antiofónica en la célula y antigénica cuando esta libre de células. No tiene relación con la virulencia, y los anticuerpos no son protectores (6). El sistema T se emplea para tipificar las cepas grupo A en exámenes seroepidemiológicos. Para las células no sintetizan proteína M y no se dispone de suero tipo anti-M. Los anticuerpos son producidos en pacientes sanos infectados con la bacteria (45).

Este antígeno unido covalentemente a proteína M puede tomar parte en la interacción de fibrinógeno con la superficie de estreptococo grupo A (60).

C.2.3. Antígeno R.- Ciertos estreptococos grupo A poseen antígeno R. Es una proteína no protectora y todavía no se conoce su significado biológico (6).

C.3. Carbohidrato C. - La capa media de la pared de la célula contiene el polisacrido "especifico de grupo", antigeno C.

C.3.1. Estructura.

La estructura del carbohidrato de *Streptococo* grupo A ha sido propuesta como un polimero de N-acetilglucosamina (NACGlc) y ramnosa (Ram) (21).

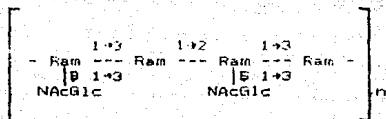


FIGURA. No. 2

Un mol de cada antigeno posee 17 moles de N-acetilglucosamina y 38 moles de ramnosa (33,41). Su P.M. es de 10.000 aproximadamente. Once de 17 moles de N-acetilglucosamina pueden ser selectivamente despojados con β -N-acetilglucosamidasa, dejando un polimero residual, predominantemente ramnosa (33)

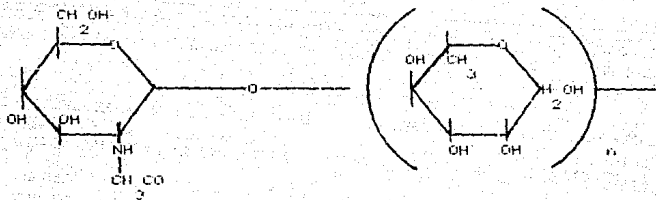


FIGURA. No. 3 Composición química de Carbohidrato C.
 N-acetilglucosamina 30%
 Ramnosa 60% (15,32)

Análisis de aminoácidos: ácido glutámico, alanina, lisina, glicina, ácido murámico (21,23,34). Relativamente alto contenido de polipéptido debida a la presencia de estos aminoácidos (y aminoazúcares) que son los mayores componentes de la pared celular peptidoglicano. El alto contenido de N-acetilglucosamina refleja la presencia de aminoazúcares tanto en el antígeno-CHO como en el peptidoglicano (23).

C.2.2. Métodos de Extracción.

El antígeno carbohidrato de *Streptococcus Erysipae* puede ser extraído por diversos métodos:

- 1) Método de Lancefield (HCl)
- 2) Método de Fuller (Formamida)
- 3) Método de Rantz y Randall (Autoclave)
- 4) Método de El rhelv (Acido nítrico)
- 5) Extracción con enzimas:

Método de Mæsted (extracción con enzima de *Streptomyces albus*)

Método de Ederer (extracción con pronasa B)

En la Tabla No. 2 se muestran los datos obtenidos de la composición química de las paredes celulares de *Streptococo*, y del Carbohidrato Grupo específico utilizando diferentes métodos de extracción.

TABLA No. 2

Composición Química de las Paredes Celulares de *Streptococcus* y del Carbohidrato Grupo Específico (32,34).

	Grupo A Pared celular cepa T12	CHO Grupo A extraído con HCl	CHO Grupo A extraído con Formo- lida	CHO Grupo A extraído con enzimas
Ramnosa	34.0	63.2	60.0	40.0
Glucosamina	18.8	26.0	30.0	32.0
Acido Murámico	6.4	-	++	1.6
Alanina	17.4	-	++	5.9
Acido Glutámico	7.9	-	++	2.4
Lisina	3.0	-	+++	2.4
Glicina	1.0	-	+++	0.2

*Datos obtenidos por Richard M. Krause

** Menos del 1%

La efectividad de las técnicas de extracción depende en gran parte de la calidad del antisuero usado en la prueba de precipitina.

Para elegir la técnica más conveniente se toman en cuenta ciertos factores como: costo, complejidad, tiempo requerido y eficiencia de la extracción (39).

C.4. Mucopéptido. - Polímero lineal compuesto por N-acetilglucosamina - ácido N-acetil murámico (el peptidoglicano PPG) que se mantienen juntos por puentes peptídicos y forman un enrejado tridimensional. El PPG representa aproximadamente 40 a 80% de la pared. Tiene unión covalente con el carbohidrato C (6,34).

C.5. Membrana Citoplásmica. - La membrana celular se compone de lipoproteína y esta unida por interacción hidrofóbica al resto de glucolípido del ácido lipotéicoico (LTA). Este último consiste en cadenas de unidades de poliglicerol fosfato que pueden contener sustituyentes de azúcar o aminoazúcar en unión covalente con un glucolípido. El LTA se extiende por todo el ancho de la pared y aparece sobre su superficie. Aunque su función no está totalmente aclarada, es posible que participe en la adherencia de los estreptococos a las superficies celulares (6,66,69). Es hapténico cuando es extraído de los estreptococos, por fenol, pero es muy inmunogénico cuando está ligado a las células estreptocócicas (6).

D. Toxinas extracelulares

La infección estreptocócica se ve aumentada probablemente por acción de los productos extracelulares, algunos de los cuales poseen propiedades citopáticas (Ginsburg, 1972).

D.1. Estreptolisinas. - La mayoría de los estreptococos grupo A elaboran dos hemolisinas distintas llamadas estreptolisinas O y S. Las zonas hemolíticas alrededor de las colonias

estreptocócicas en agar sangre, en condiciones aerobias, se deben principalmente a estreptolisina S. Ambas hemolisinas son citopáticas para células mamíferas y bloquean la fagocitosis, presumiblemente deteriorando la quimiotaxis y la ingestión por leucocitos, y por ruptura de sus lisosomas (6).

Hewitt y Todd reportaron en 1929, que el colesterol inhibe la actividad hemolítica y letal de estreptolisina O. Hasta este momento se han hecho diversos experimentos para obtener información sobre el modo de acción de dicha estreptolisina y su inhibición inespecífica (50).

La actividad de estreptolisina S es fuertemente inhibida por lecitina y B-lipoproteínas, pero no por colesterol.

D.2. Toxina eritrogénica (TE).- Entre los productos extracelulares, las toxinas eritrogénicas representan un grupo importante de sustancias inmunomoduladoras.

La infección en conejos con estreptococos viables provee un modelo adecuado para estudiar los efectos sistémicos de toxinas eritrogénicas (26).

Tienen efectos biológicos sobre las células del sistema inmune. Entre otros, causan transformación blastoide de linfocitos en muchas especies animales, incluyendo al hombre. Hibralaová y cols. estudiaron la habilidad de estas toxinas para la producción de otro mediador de la inmunidad celular; factor inhibidor de leucocitos (LIF). Descubrieron que esta envuelto en la patofisiología de la infección estreptocócica (27).

Las toxinas enterocócicas de estreptococo grupo A están caracterizadas por un número de propiedades biológicas, incluyendo pirogenicidad, reactividad en piel, daño al miocardio, causan fiebre y erupción cutánea (rash), aumenta la susceptibilidad al shock por endotoxina letal. Wagner y cols. demostraron la unión de estreptococo grupo A con linfocitos de sangre periférica humana por medio de microscopía electrónica. Hasta la fecha se siguen haciendo investigaciones para esclarecer el papel de estas toxinas en la patogenia de infecciones estreptocócicas (70).

D.3. Estreptoquinasa (SE).- Puede ser un factor de virulencia de los estreptococos por lisis de coágulos sanguíneos y precipitados de fibrina. Junto con la hialuronidasa y las nucleasas pueden funcionar como un factor de difusión, porque promueven la diseminación de estreptococos en los tejidos licuando y reduciendo la viscosidad de exudados inflamatorios (6).

Existen otros productos extracelulares como la dinucleotidasa de nicotinamida adenina (NADasa), la proteínasa, cuya producción va a depender de la cepa que se trate (46).

D.4. Toxinas asociadas con las células.- Complejos peptidoglicano-polisacárido (PPGPE). Estudiando las actividades biológicas e inmunomoduladoras del peptidoglicano, se ha investigado reacciones de esta estructura con elementos sanguíneos. Ryc y cols. demostraron los efectos producidos por esta macromolécula como son: degranulación con cambios en la

forma de plaquetas, así como lisis de las mismas. El PFG unido a leucocitos lleva a alteraciones funcionales sin destrucción morfológica, los eritrocitos no sufren cambio ultraestructural (56).

En algunos animales la inoculación de PFGPS de estreptococo grupo A provoca una inflamación crónica. Como la poliartritis en ratón y la artritis crónica en rata. Dicha inflamación depende de la especie o cepa animal y de la vía de inoculación. Leong y cols. encontraron que el PFGPS interactúa con el sistema de complemento y estimula a los PMNs y a otros fagocitos (40).

* Ácido lipoteicoico (LTA).- Este hapteno asociado con las membranas puede sensibilizar células de mamíferos a lisis en presencia de anticuerpos IgM antiestreptocócicas y complemento. LTA puede causar artritis crónica después de inyección intraarticular en animales previamente inmunizados con estreptococos grupo A. Puede causar reabsorción ósea, por vía de AMP cíclico y prostaglandinas, en cultivo y nefrocalcinosis en animales de laboratorio (6).

E. Patogenia

Streptococcus pyogenes puede ocasionar tanto enfermedades supurativas como secuelas no supurativas. El primer grupo incluye la faringitis estreptocócica aguda (con o sin escarlatina) y todas sus complicaciones supuradas, incluyendo la adenitis cervical, la otitis media, la mastoiditis, los abscesos periamigdalinos, la meningitis, la peritonitis y la neumonía. También incluye las infecciones uterinas estreptocócicas del

Puerperio (sepsis puerperal), la celulitis estreptocócica de la piel, la linfagitis estreptocócica y la erisipela. Las principales enfermedades no supurativas son la glomerulonefritis aguda, la fiebre reumática y el eritema nudoso.

La patogenia de las enfermedades estreptocócicas supurativas es bien conocida. Los principales factores relacionados con ella son los que determinan la invasibilidad del organismo. Como los estreptococos hemolíticos ingeridos por las células fagocitarias son destruidos rápidamente en pocos minutos, sus propiedades antifagocitarias desempeñan un papel decisivo respecto a la invasibilidad. A su vez depende de dos componentes de su superficie, la cápsula de ácido hialurónico y la proteína M (15).

Varias sustancias extracelulares elaboradas por estreptococos grupo A pueden inducir lesiones miocárdicas, endocárdicas, hepáticas, articulares y renales en animales de laboratorio. Otro enfoque sugiere que en la faringitis estreptocócica inicial en algunos pacientes susceptibles presentan lesiones agudas miocárdicas y articulares explicables por "toxinas" difusibles (6).

Reactividad cruzada inmunológica.- Varios antígenos de Streptococcus pyogenes tienen reacción cruzada en tejidos humanos Kaplan y cols. mostraron la presencia de la relación inmunológica de estreptococo y los tejidos y músculos del corazón de mamífero (49, 67).

Dicha reacción cruzada inmunológica es bien conocida pero

su papel patogénico en enfermedad no es claro. Los antígenos se localizan en membranas de estreptococo y sarcolema pero todavía no han sido identificados. Se ha observado la homología entre las proteínas M de estreptococo y α -tropomiosina. Otros estudios han sugerido que anticuerpos tipo específico para proteína M tipo 5 tienen reacción cruzada con un antígeno de alto peso molecular en el corazón. Recientemente anticuerpos monoclonales que reaccionan cruzadamente han hecho posible el estudio de antígenos de reacción cruzada en membranas de estreptococo y en extractos de sarcolema de músculo cardíaco humano (11, 12).

Los estudios de Cunningham y cols. sugieren que la miosina del músculo cardíaco tienen inmunodeterminantes con un componente de estreptococo grupo A (12).

La reactividad cruzada entre hialuronato de estreptococo y el fluido sinovial humano puede explicar la artritis (49).

E.1. Glomerulonefritis aguda (GNA).- Una de las complicaciones más comunes de las infecciones respiratorias superiores y cutáneas por estreptococos grupo A es la GNA, se debe probablemente a cepas nefritógenas especiales (6). Los síntomas característicos de hematuria, edema e hipertensión no aparecen hasta alrededor de una semana después del comienzo de la infección piógena aguda, habitualmente localizada en la faringe (15).

Aunque algunos investigadores indican que el antígeno estreptocócico juega un papel importante como agente causal en la patogénesis de GNA (73).

Se ha encontrado en pacientes con esta enfermedad, una supresión de la inmunidad celular lo que provoca una progresión de GNA hasta convertirla en enfermedad crónica (54).

La nefropatía A es una forma de glomerulonefritis caracterizada por hematuria macroscópica recurrente frecuentemente precedida por infección respiratoria alta, incluyendo amigdalitis. Al contrario de GNA, en esta enfermedad hay un aumento de la inmunidad humoral y celular al polisacárido estreptococal (25).

E.2. Fiebre reumática.- La fiebre reumática se presenta con infecciones en las vías superiores causadas por estreptococos beta hemolíticos del grupo A en las personas susceptibles. Esta enfermedad puede iniciarse de dos a tres semanas después de la infección.

Son varios los requerimientos absolutos para su desarrollo, deben haber estado presentes estreptococos grupo A; segundo, la infección debe estar localizada en el tracto respiratorio superior, tercero, las bacterias deben persistir para que aparezca la complicación, y cuatro, una respuesta de anticuerpo estreptocócico indicativa de una infección reciente debe estar demostrada (6).

La importancia del sitio de infección para el desarrollo de fiebre reumática se ha puesto de relieve; muchas observaciones sugieren que la fiebre reumática no se desarrolla después de infección estreptocócica de la piel. Los factores que localizan

los estreptococos en la garganta no se conocen por completo, pero proteína M y LTA están implicados en la fijación de estreptococos a la superficie de células epiteliales. En estas células existe un receptor para estreptococo: la fibronectina.

La fibronectina es una glicoproteína del plasma que posee sitios de unión para la porción lipida de ácido lipoteicoico (62).

También se han descrito uniones de estreptococo con algunas proteínas del suero como la albúmina y B₂-microglobulina (59).

F. Inmunidad

Las infecciones por estreptococos grupo A que poseen antígeno M están seguidas generalmente de una inmunidad humoral tipospecifica. Si los anticuerpos anti-M desaparecen, pueden recobrase con pequeñas dosis de refuerzo de antígeno M homólogo. Los anticuerpos anti-M son principalmente IgG. Los estreptococos grupo A poseen receptores para la porción Fc de dichos anticuerpos, los cuales están localizados en proyecciones filamentosas y en la superficie más externa de la pared celular (6, 59, 68).

La respuesta inmune al polisacárido C de estreptococo grupo A ha sido estudiada de muchas formas, incluyendo la inherencia de los genes de la región variable, la expresión de los marcadores de inmunoglobulina en cels B y cels T y el todavía, mal entendido fenómeno de la dominancia clonal. Muchos de estos resultados, interesantes de la expresión repartida de los determinantes idiotípicos por anticuerpos anti-Carbohidrato, Nahm y cols. en un

esfuerzo por definir la heterogeneidad de anti-Carbohidrato, hicieron estudios con anticuerpos monoclonales. Puesto que las cadenas ligeras (L) son producidas similarmente en la mitad de los anticuerpos (aproximadamente), encontraron un determinante idiotípico dominante localizado en la región variable V_H (47).

El Carbohidrato de estreptococo grupo A produce anticuerpos primariamente: Igm e isotipos de IgG3. En general, los antígenos que estimulan estos isotipos han sido mostrados como antígenos timo-independiente de un subtipo (TI-2). Briles y cols. indican en sus estudios que Carbohidrato C parece ser un antígeno timo-independiente, pero también un antígeno timo-dependiente. Las propiedades timo-dependientes deben ser características de algunos antígenos carbohidratos que pueden producir anticuerpos IgG predominantemente de la clase IgG3 (8).

Ningún anticuerpo regularmente producido contra polisacárido C, antígeno T, ácido teicoico o las numerosas enzimas extracelulares y otros factores pueden prevenir la infección. El anticuerpo tipo específico puede detectarse por opsonización, protección de ratones o elongación de cadenas in vitro (6).

F.1. Producción de anticuerpos contra Carbohidrato C.

La magnitud de la respuesta inmune está influenciada, por diferentes variables: naturaleza química y física del antígeno, método de inmunización, previa sensibilización a un antígeno similar, antecedentes genéticos del animal, selección de especie. Sin embargo, estos factores amplifican o limitan la variación en las características de las globulinas producidas (7).

La selección de especies de animales usados para la inmunización juega un papel importante en la producción de anticuerpos precipitantes anti-Carbohidrato. Lakshmy y cols estudiaron la producción de suero grupo específico en cabras; utilizando polisacárido de estreptococo grupo A con adyuvantes, inoculado por diferentes vías. Obtuvieron un buen título de anti-Carbohidrato aglutinante, el cual fue utilizado como reactivo de coaglutinación (37). Weiss y cols. estudiaron en conejos BASILEA (nueva cepa) la producción de anticuerpos anti-Carbohidrato y encontraron que estos animales responden con niveles de anticuerpos muy altos (71).

A pesar de lo antes mencionado la especie que ha dado mejores resultados es el conejo nueva zelanda, por ser un animal de fácil manejo, no muy costoso (adquisición y manutención del mismo) y produce una buena cantidad de anticuerpos.

La Inmunoglobulina de conejo existe como una molécula de numerosas variantes genéticas, por lo que en una inmunización con estreptococo grupo A se obtienen anticuerpos de heterogeneidad diversa. Dichas variantes pueden ser identificadas con aloantisuero discriminando entre las estructuras antigénicas que distinguen estas variantes de otras, esto permite hacer diferentes estudios genéticos con las inmunoglobulinas lo cual ayuda a la producción de anticuerpos más específicos (58).

G. Epidemiología

Infecciones respiratorias superiores.- El conocimiento de la patogenia de las infecciones estreptocócicas, sus secuelas no

supurativas y su epidemiología depende de la distinción entre el estado de "portador" y la infección respiratoria superior estreptocócica aguda. Los estreptococos grupo A cultivados de gargantas con afecciones dolorosas agudas contienen grandes cantidades de proteína M. La faringitis y la tonsilitis o amigdalitis son más frecuentes en niños de 5 a 15 años. Es poco probable que un niño llegue a la edad de diez años sin haberse encontrado con estreptococos grupo A.

La transmisión se hace por gotitas de la secreción respiratoria de pacientes o por portadores sanos. Alimento y leche pueden ser fuentes de brotes ocasionales. Los microorganismos recobrados de ropas, camas o polvo doméstico no son generalmente infecciosos.

El control de la enfermedad estreptocócica hemolítica es difícil porque muchas infecciones son muy leves o invisibles clínicamente, y las personas con infecciones subclínicas pueden diseminar estreptococos. El hacinamiento favorece la difusión explosiva de serotipos individuales (6).

La incidencia de infecciones estreptocócicas varía ampliamente en cada Área geográfica y parece hallarse en relación con el clima. En zonas frías y secas se producen principalmente en invierno y primavera. En climas cálidos y tropicales en los meses de verano y principios de otoño. Afecta principalmente a niños preescolares y lactantes. La infección se transmite del aparato respiratorio de un individuo al de otro a través de contactos relativamente íntimos y puede estar facilitada por

insectos, pobreza y hacinamiento.

Los estreptococos grupo A más infecciosos son aquellos que se encuentran en las secreciones húmedas procedentes del aparato respiratorio al hablar, toser y estornudar (6,15).

H. Diagnóstico de Laboratorio.

El mejor método para identificar los estreptococos es el cultivo de colonias puras aisladas del organismo infeccioso, extrayendo el hidrato de carbono de grupo y demostrando una reacción serológica entre el antígeno extraído y el antisuero específico de grupo.

Razones importantes para la identificación serológica de Streptococcus pyogenes del grupo A, utilizando suero anticarbohidrato C.

a) Patogenicidad

De los grupos serológicos de Lancefield las cepas del grupo A son las más patógenas para el hombre especialmente Streptococcus pyogenes. Más del 90 % de las infecciones estreptocócicas humanas se deben a cepas de estreptococos grupo A ; alrededor del 15% se deben a cepas de grupos B, C, D, F y G.

b) Susceptibilidad a los antimicrobianos

Dependiendo del grupo a que pertenecen los estreptococos es la susceptibilidad a los antimicrobianos. Los estreptococos grupo A son sensibles a la penicilina y se han encontrado algunos resistentes a clindamicina, tetraciclina y eritromicina. Los

estreptococos grupo B parecen ser un poco más resistentes a los antimicrobianos que otros estreptococos β-hemolíticos y los enterococos grupo D son conocidos por su resistencia a la penicilina y otros antimicrobianos.

c) Prevención de enfermedades como la Fiebre reumática y la Glomerulonefritis aguda.

H.1. Métodos Serológicos

Pruebas de Precipitación.

En las pruebas de precipitación, los propios complejos de Ag-Ac forman un precipitado visible. Se utilizan para ello dos métodos: la prueba de precipitación en tubo capilar (Lancefield) y la de difusión doble en agar (Ouchterlony). En la primera se introduce por separado en un tubo de vidrio capilar el Carbohidrato C (antígeno soluble) y el suero anticarbohidrato C de forma que los líquidos estén en contacto o puedan mezclarse mediante rotación del tubo. En la interfase de ambos líquidos se forma un precipitado el cual se deposita sobre el fondo si el tubo se mantiene derecho.

El método de doble difusión en agar es más sensible. En este método se rellenan dos hendiduras efectuadas sobre una fina capa de agar, una con Carbohidrato C (Ag) y la otra con suero anticarbohidrato C (Ac). Ambas difunden aproximadamente entre sí, y si el suero contiene anticuerpos se acaba formando una línea de precipitación en el punto en que ambas se encuentren sobre el agar (14).

Otras Pruebas Inmunológicas. - Otero y cols. desarrollaron una prueba de DRA (Detección rápida de antígeno) la cual se basa en la digestión enzimática seguida de una Coagulación. Esta prueba da resultados en una hora aproximadamente, es económica y confiable para la detección de antígeno de estreptococo grupo A (53).

En 1983 Berkowitz y cols. evaluaron la identificación de antígeno en exudados faríngeos por aglutinación con latex. Se basa en la extracción del antígeno, el cual se mezcla con las partículas de latex cubiertas con antisuero específico. Esta prueba puede ser completada en menos de dos horas. Predice presencia o ausencia de estreptococo grupo A en exudados faríngeos de pacientes con faringitis aguda (5).

Después del desarrollo de la prueba de antiestreptolisina O, se han desarrollado varios métodos para medir la respuesta de anticuerpos contra el antígeno de estreptococo grupo A.

a) Pruebas de anti-DNasa y anti-NADasa, diseñadas para medir anticuerpos contra productos extracelulares de estreptococo.

b) Halpern y Goldstein describieron un radioinmunoensayo para anticuerpos contra el antígeno de la pared celular, el carbohidrato grupo específico de estreptococo. Esta prueba ha sido utilizada para medir anticuerpos contra el carbohidrato-C grupo A en el suero de pacientes con infecciones causadas por estreptococo grupo A.

c) Barrett y cols. hicieron estudios sobre la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos.

Esta prueba ofrece ventajas respecto a otros métodos. Porque, es más fácil de realizar y utiliza reactivos que son fáciles de preparar y estables en periodos prolongados de tiempo. ELISA evita los bioriesgos y el equipo costoso utilizado en el radioinmunoensayo (3,29).

d) Benslimane y cols. determinaron anticuerpos contra carbohidrato, estreptolisina O, peptidoglicano, estreptoquinasa, estreptohialuronidasa y desoxirribonucleasa B en pacientes con fiebre reumática, utilizando el método de ELISA obteniendo excelentes resultados. La ventaja de ELISA es que, es un método más sensible que la Contrainmunolectroforesis, la inmunodifusión y la precipitación en capilar (4).

e) Otras pruebas utilizadas para medir anticuerpos son: la precipitación radioinmune, fluorescencia y la CIE (3).

H.2. Anticuerpos Monoclonales.

Inicialmente las vacunas de polisacárido de estreptococo estaban compuestas de estreptococos pepsinizados o muertos (22,23).

Al pasar los años se descubrieron anticuerpos de heterogeneidad restringida y se probaron los mecanismos de inmunidad. Recientemente se descubrieron anticuerpos producidos selectivamente en conejos y en algunas cepas naturales de ratón los cuales fueron reemplazados por hibridoma monoclonal derivados de anticuerpos murinos, esencialmente usando el método de Köhler y Milstein. Estos anticuerpos pueden ser usados para analizar con mucho más detalle la especificidad de la interacción Ag-Ac y las características de unión (22). Abersold y cols. produjeron un anticuerpo monoclonal específico para polisacárido C. El Ac 50S10.1 es un hibridoma derivado 3k anticuerpo de cepa de ratón BAB-14, con especificidad para N-acetilglucosamina B1-3 unido a L-ramnosa, NAcGlc es el inmunodeterminante del polisacárido de estreptococo grupo A. Este anticuerpo sirve para determinar la secuencia de aminoácidos en la región variable de la cadena ligera (2).

Los anticuerpos monoclonales también son útiles para analizar la estructura tridimensional del anticuerpo en su forma libre o unida al antígeno y/o al hapteno, las bases genéticas de la diversidad del anticuerpo (22), la reacción cruzada entre estreptococo grupo A y el tejido de corazón humano (11) y para mejorar el diagnóstico clínico de enfermedades provocadas por

estreptococo B-hemolítico grupo A.

Los métodos serológicos pueden ser rápidos, sensitivos y específicos, y por lo tanto herramientas importantes en el Diagnóstico. Sin embargo la mayor limitación de un antisuero convencional es la estandarización. La mayoría de los antisueros son mezclas de anticuerpos que difieren, en especificidad y afinidad para los determinantes antigénicos.

El reciente desarrollo en la tecnología de anticuerpos monoclonales supera ciertas limitaciones que se presentan en un antisuero convencional.

Utilidades clínicas de un anticuerpo monoclonal anticarbohidrato-C grupo A:

a) La primera y la más importante, la tipificación exacta de estreptococo grupo A.

b) La prueba de Precipitina de Lancefield puede proveer resultados serológicos definitivos.

c) El determinante antigénico del anticarbohidrato C grupo A esta bien definido pues involucra la N-acetilglucosamina o la ramnosa.

Es probable que la tecnología de los anticuerpos monoclonales proveerá anticuerpos estandarizados con un menor costo y una técnica que no estará limitada (46).

H.3. Métodos alternativos para la identificación de *Streptococo* B-hemolítico grupo A.

Cultivo de estreptococos grupo A.- Para el diagnóstico de una infección estreptocócica grupo A el estreptococo debe ser aislado e identificado. Las muestras deben transportarse sin demora, porque los hisopos de algodón pueden contener sustancias que inhiban estreptococos grupo A. La viabilidad se mantiene bien en hisopos transportados en sílica-gel (6). El uso de medios de enriquecimiento como el caldo de Pike, caldo de OXINA (derivado de la quinolina) (57) y agar sangre con sulfametoxazol-trimetoprim (35), aumentan el índice de aislamiento de estreptococos grupo A en comparación con el plaqueado directo en agar sangre. El crecimiento en este último se selecciona por la B-hemólisis completa. El crecimiento excesivo de otros microorganismos puede impedirse mediante diversos agentes selectivos en los medios. Los estreptococos grupo A pueden identificarse tentativamente con rapidez y facilidad por discos de bacitracina. Alrededor del 90% de los estreptococos grupo A se inhiben con discos que contienen 0.04 unidades de bacitracina, pero casi todos los estreptococos grupos B, C y G son resistentes (6,44).

En la Tabla No.3 se mencionan características para diferenciar a los diferentes grupos de Estreptococos (39).

Tabla No. 3

Categoría	Hemolisis	Pba. de Bac. **	CAMP	Hidrolisis Hipurato	Crec. en NaCl 6.5%	Optoquina y bilis'
Grupo A	Beta	+	-	-	-	-
Grupo B	Beta*	**	+	+	**	-
Estreptococo B-hemolítico, no de grupo A, B o D.	Beta	**	-	-	-	-
Grupo D, enterococos	Alfa Beta ninguna	-	-	**	+	-
Grupo D, no enterococos	Alfa ninguna	-	-	-	-	-
Grupo Viridans	Alfa ninguna	**	-	**	-	-
Pneumococcus	Alfa	+	-	-	-	+

Simbolos +, reacción positiva o sensible, -, reacción negativa o resistente
 * excepciones, ocasionalmente ocurre
 ** Prueba de Bacitracina
 ' Sensibilidad a la optoquina y Solubilidad en bilis.

Los datos mostrados en la Tabla No. 3 son de gran utilidad para identificar Estreptococo B-hemolítico grupo A al trabajar una muestra clínica.

I. Susceptibilidad a las Drogas.

Ninguna cepa de estreptococos grupo A ha sido resistente a la penicilina. Esto la transforma en la droga de elección para el tratamiento de infecciones estreptocócicas y en la prevención de la fiebre reumática. La MIC para penicilina G es generalmente 0.001 ug/ml. Aunque en algunas ocasiones, el microorganismo se vuelve tolerante a este antimicrobiano (30) o el paciente es sensible a la droga, por lo que hay que sustituirla por eritromicina o lincomicina pero no tetraciclina. Matsen y cols reportaron que todos los estreptococos de piel y garganta que examinaron fueron sensibles a penicilina, eritromicina y a cuatro cefalosporinas (39). Los estreptococos son resistentes a polimixinas, kanamicina y estreptomina.

J. Prevención.

Las infecciones por estreptococos grupo A pueden prevenirse por intervención terapéutica durante las epidemias, o con drogas profilácticas dadas a los pacientes de alto riesgo, como ocurre en las escuelas o colegios con pupilos, orrelinatos y campamentos militares con infecciones endémicas. El impétigo puede prevenirse con mejor higiene de la piel. Las epidemias se detienen mejor con el tratamiento antibiótico de todos los casos. La inmunización con proteína M se ha probado en escala relativamente pequeña y resultó efectiva, pero el uso de vacunas en general o en poblaciones elegidas necesita más investigación.

Vacuna estreptocócica.- Como la inmunidad a los estreptococos grupo A es tipoespecífica, y se conocen unos 80 tipos presentes en diferentes poblaciones, la base lógica para preparar una buena vacuna depende de la distribución de los principales tipos M en una determinada población. La inmunización si se dispone de ella, debe tratar de prevenir las complicaciones supurativas y no supurativas. La preparación de una vacuna debe tomar también en consideración el riesgo de inducir reacciones demoradas de hipersensibilidad, la eliminación de la proteína M de antígenos de reacciones cruzadas con el corazón, y la eliminación de la proteína M de ácido lipoteicoico de uniones covalentes (LTA) (6).

III. OBJETIVOS

1. Obtener suero anti-carbohidrato C con la inoculación del antígeno extraído por el método de Lancefield, a partir de una cepa de *Streptococo B-hemolítico grupo A*.

2. Demostrar que el antisuero servirá como auxiliar en el laboratorio de Bacteriología Diagnóstica, en la identificación de *Streptococo B-hemolítico grupo A*. Lo anterior se hará mediante el contacto del antisuero con una cepa control y algunas cepas problema utilizando pruebas de precipitación en capilar.

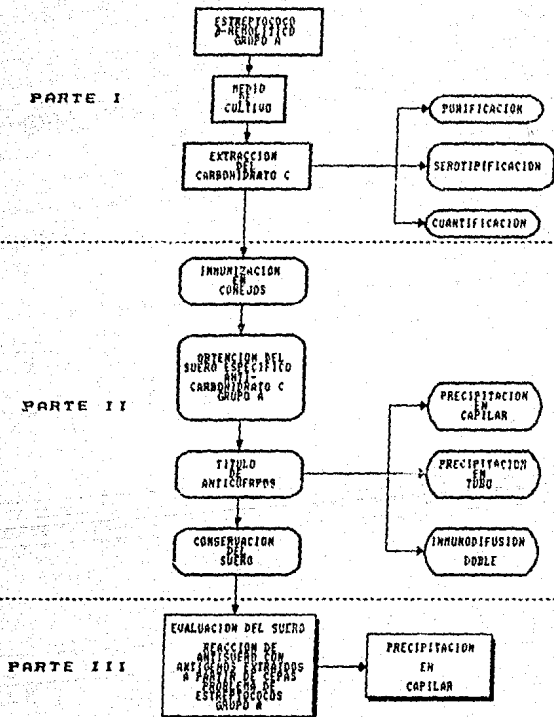
IV. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

Parte I. Extracción de Carbohidrato C por el método de Lancefield a partir de cepa de *Streptococo B-hemolítico grupo A.*

Parte II. Obtención del Suero Anticarbohidrato C.

Parte III. Evaluación del Suero-Anticarbohidrato C.

IV. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



V. MATERIALES Y METODOS

A. Extracción del Carbohidrato C.

Método de Wassilissa.

Procedimiento.- La Cepa de *Streptococo B-hemolítico grupo A* tipo MS (donada por P.GFB Luis Manuel Perea) se siembra en 4 litros de caldo Todd-Hewitt incubándose a 37 C por 18 hrs. Los cultivos se centrifugan a 3,000 rpm/10 min (centrifuga IEC/DPR-6000, DAMON/IEC DIVISION) y el paquete celular se suspende en 4 ml de HCl 0.2N diluido en NaCl al 0.85% a pH =2, sometiéndolo a ebullición en baño de agua por 10 min. Se centrifuga de nuevo a 2,000 rpm/10 min. al separar el sobrenadante, éste se neutraliza con NaOH 0.2N. El pH se ajusta a 7.2-7.5 utilizando el potenciómetro (CORNING) y se adiciona PBS estéril para mantenerlo. Centrifugar a 2,000 rpm/10', se separa el extracto y se le agrega merthiolate en concentración final de 1:10,000. Se conserva a -10 C (38).

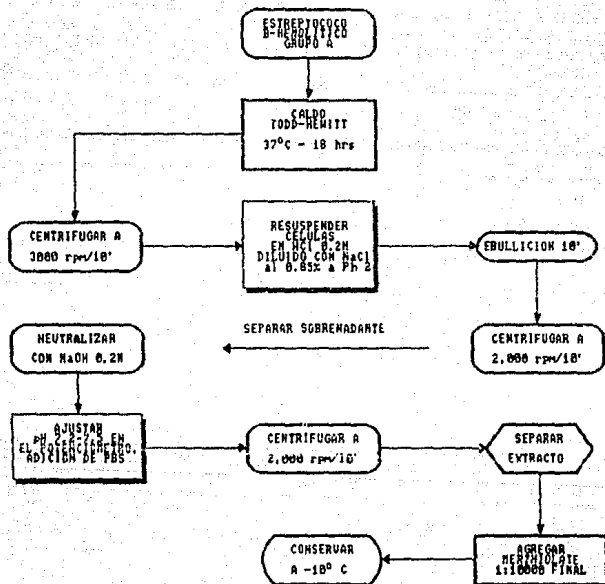
(Ver Diagrama)

A.1. Serotipificación del Carbohidrato

El antígeno extraído se llevó a la E.N.C.B., donde se puso en contacto con un suero control anticarbohidrato-C del grupo A. Se realizaron pruebas de serotipificación: Precipitación en Capilar y Coaglutinación.

FIGURA No 4

DIAGRAMA DE TRABAJO PARA LA EXTRACCION DE CARBOHIDRATO-C. POR EL METODO DE LANCEFIELD (38).



A.2. Purificación del Carbohidrato.

Se utilizó la técnica de Filtración, empleando filtros Millipore con membranas de 0.22 μ m.

La Filtración es un método de esterilización que libera a los líquidos de partículas no deseadas. La mayor parte de la acción del filtro se debe a la adsorción de las partículas sobre la gran superficie que presentan al líquido las paredes de los poros del filtro. La filtración se favorece por una caída de presión a través del filtro, bien sea utilizando presión positiva sobre el líquido no filtrado o conectando el recipiente al vacío (43).

Procedimiento:

a) Se esterilizaron filtros Millipore, jeringas de 10 ml y botellas de dilución de leche.

b) En área estéril, con una jeringa se tomó el extracto y se pasó a través del filtro a una botella de dilución de leche.

c) El antígeno purificado se guardó en el congelador.

B. Determinación de la concentración de Carbohidrato.

Método de Dubois (16). Los azúcares reductores: simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados producen un color que va de amarillo a naranja cuando reaccionan con fenol y ácido sulfúrico concentrado. La reacción es sensible y el color es estable.

El método de fenol-sulfúrico sirve para determinar microcantidades de azúcares y sustancias relacionadas.

Procedimiento:

De la muestra problema tomar una alícuota de 0.5 ml y llevar a 2 ml con agua destilada, adicionar 0.1 ml de Fenol al 80%, adicionar 5 ml de ácido sulfúrico concentrado Q.P. mezclar enérgicamente y dejar reposar 30 min. Leer a 490 nm. Los resultados se interpolan en una curva tipo de glucosa y de ramnosa usando una solución de 100 ug/ml. Si las lecturas no entran en la curva tipo, hacer diluciones de la muestra problema.

Curva de calibración de glucosa.

a) Reactivos: Sol. de glucosa anhidra de 100 ug/ml, solución de fenol al 80% y ácido sulfúrico concentrado.

b) Procedimiento:

Colocar en un tubo de ensaye la solución de glucosa Q.P. de 100 ug/ml en una concentración de 0-100 ug/ml y llevar a 2 ml con agua destilada.

Adicionar 0.1 ml de fenol al 80% y 5 ml de ácido sulfúrico (con cuidado lentamente) agitar vigorosamente y dejar reposar 30 min. Leer en el espectrofotómetro (CARL ZEISS PM2D) a 490 nm.

Curva de calibración de ramnosa.

a) Reactivos: Sol de ramnosa de 100 ug/ml, solución de fenol al 80% y ácido sulfúrico concentrado.

b) Procedimientos:

Se siguió el mismo que con glucosa.

En Resumen:

Los niveles de masa muscular de los sujetos de la serie de pruebas en progreso, se incrementaron intensamente en 3 veces a la semana durante 4 semanas. En la quinta una disminución de 2.5% en la sexta tercer día en las 7 siguientes 3 en 10%. A la sexta semana se dio un refuerzo utilizando solamente la serie número 1.
Ver Tabla No. 43

Tabla No. 4 PROTOCOLO DE INMUNIZACION

Dia	Dosis	Via
0	0.5 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
2	0.5 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
4	0.5 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
7	1 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
9	1 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
11	1 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
14	1 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
16	1 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
18	1 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
21	1 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
23	1 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
25	1 ml de sol. carbohidrato (0.526 mg/ml)	Intravenosa
30	Sangrado de Prueba	Intravenosa
37	1 ml CHO / 1 ml Ady	Subcutanea
50	Sangrado Total	Intracardiac

D. Título de Anticuerpos

Se realizó por los métodos de Precipitación en Capilar, Precipitación en Tubo e Inmunodifusión doble.

D.1. Precipitación en Capilar. Método de Lancefield (39).

Reacción de Precipitación.- Reacción entre un antígeno soluble y un anticuerpo también soluble, en la cual se forma una malla compleja de formas de conjuntos entrelazados (20).

Principio de la Reacción de Precipitación.- La reacción antígeno-anticuerpo sigue la ley de acción de masas y bajo condiciones correctas, la cantidad de complejos formados es una función de la concentración de antígeno y de anticuerpos.

Procedimiento:

- a) Se hicieron diluciones dobles del suero.
- b) Para cada dilución se llevó a cabo la prueba de precipitación en capilar.
- c) Sumergir un tubo capilar (capilar con diámetro de 1.2 a 1.5 mm, vidrio borosilicato Kimble, ambos extremos abiertos y ligeramente pulido a fuego), en el suero (en el tubo o frasco pequeño con tapón de rosca) hasta una columna de 1 cm de largo, el suero sube por acción capilar. (Mantener la esterilidad del suero, esterilizar los tubos capilares y conservarlos en esterilidad antes y después de introducirlos en el suero)

d) Sujetar el tubo cuidadosamente de modo que el aire no entre, limpiar con papel facial.

e) Sumergir el tubo en el extracto hasta una cantidad igual a la que fue llevada el suero. Si una burbuja de aire separa el suero y el extracto, descartar el tubo y repetir el procedimiento.

f) Sujetar el tubo cuidadosamente. Huellas dactilares, de suero o extracto fuera del tubo puede simular una reacción positiva oscura.

g) Sumergir la parte final del tubo en plastilina hasta rellenar la apertura. No dejar que se mezclen los reactantes. El relleno de plastilina al final del tubo (reactantes) sujetará a los reactantes en su lugar mientras que el tubo es invertido. Alternativamente, sujetar con un dedo la parte superior y final del tubo hasta que se complete el paso h.

h) Invertir el tubo e insertarlo suavemente en la plastilina fijada en una ranura de estante (mesa de trabajo, etc)

i) Examinar en luz clara, en contraste con un fondo oscuro. El tiempo en que aparece el precipitado, varía de acuerdo a la potencia del antisuero. Puede aparecer a los 5 min o hasta las 48 horas.

j) El título de anticuerpos se interpretará como la última dilución de antisuero donde aparezca la precipitación en capilar.

D.2. Precipitación en Tubo. (Prueba de Ascoli) (13)

Si se deposita una cantidad adecuada de una solución de antígeno soluble con el antisuero homólogo, los componentes difunden de una solución a otra. Cuando la relación entre los reactivos alcanza las proporciones óptimas, se forma un precipitado (63).

Principio de la reacción.- El mismo que en Precipitación en Capilar.

Procedimiento:

- a) Se hicieron diluciones dobles del suero
- b) Se adicionaron a cada tubo 0.5 ml de Ag.
- c) Se agitaron los tubos para que se mezclara bien el antígeno con el antisuero, y se llevara a cabo la reacción. Se dejaron a temperatura ambiente en reposo.
- d) El título de anticuerpos se interpretó como la última dilución de antisuero donde apareció el precipitado.

D.3. Inmunodifusión Doble (Método de Ouchterlony)

La doble difusión o método de Ouchterlony es la inmunodifusión en la que el antígeno y el anticuerpo difunden libremente en el gel; este método puede tener diversas aplicaciones, por ejemplo, la determinación de la posible relación inmunológica entre dos antígenos, el número de sistemas antígeno-anticuerpo presentes y la semicuantificación de antígeno o de su anticuerpo (39).

Reactivos:

a) Amortiguador

Tris 0.1 M, pH 8.2

b) Gel de agarosa.

Agarosa 0.75 g

Amortiguador 100 ml

La solución se calienta a 90 °C con agitación constante.

c) Solución de lavado

NaCl 0.1M

d) Solución de tinción

Azul de Coomassie 1g

Etanol 90 ml

Esta solución puede usarse mucho tiempo después de su preparación.

e) Solución decolorante

Es la misma solución de tinción pero sin el azul de Coomassie.

Procedimiento:

Para obtener un gel completamente homogéneo y uniforme las placas de vidrio (LEB 64 x 94 mm) se colocan sobre una base horizontal y nivelada; en el centro de cada placa se vierten doce ml de agarosa en solución que se difunde uniformemente.

Después de la gelificación se hacen cortes circulares con la ayuda de un sacabocados, un pozo central y 6 pozos que le rodeen más pequeños.

En el pozo central se coloca el antígeno carbohidrato C y en los pozos que lo rodean se colocan una serie de diluciones de antisuero de conejo inoculado con el carbohidrato C.

Las placas se mantienen en una cámara húmeda hasta la aparición de las bandas de precipitado; posteriormente se procede a teñir de 5 a 10 min con la solución "d" y finalmente se decolora.

El título de anticuerpos se interpretará como la última dilución de antisuero donde aparezca banda de precipitación.

E. Evaluación del Suero

Se probó la efectividad del antisuero con antígenos extraídos a partir de cepas problema de *Streptococo B-hemolítico*

- a) Los antígenos fueron extraídos por el método de Lancefield. (descrito en A)
- b) Se llevaron a cabo reacciones Ag-Ac por el método de Precipitación en Capilar (descrito en D.1.)
- c) La prueba se corrió por duplicado para cada Ag y se interpretó de la siguiente manera:

Resultado + banda de precipitación visible

Resultado - No hay banda de precipitación

Dudoso No es muy clara la banda de precipitación

F. Conservación del Suero

- a) Se filtró el suero con filtros Millipore, utilizando membranas de 0.22 μ m.
- b) El suero filtrado se recibió en viales, previamente esterilizados.
- c) Los viales se metieron en congelación.
- d) Debe tenerse cuidado al usar el antisuero. Al hacer las pruebas de serotipificación debe tomarse el antisuero necesario y procurar no estar congelando y descongelando los viales, pues se corre el riesgo de que se baje el título de anticuerpos.

VI. RESULTADOS

A. Extracción del Carbohidrato C.

A partir de 4 litros de caldo Todd-Hewitt inoculados con *Streptococcus B*-hemolítico grupo A se obtuvieron aproximadamente 45 ml de extracto crudo.

El método de extracción fue modificado en cuanto al ajuste de pH (7.2-7.5), originalmente se ajustaba utilizando indicador de pH (rojo de fenol). En este trabajo se hizo uso del pHmetro, lo que permitió que se obtuviera un pH más exacto.

B. Serotipificación del Carbohidrato.

En la E.N.C.B. se realizaron pruebas de precipitación en capilar y coagulación para serotipificar el carbohidrato obtenido por el método de extracción antes mencionado. Se obtuvieron resultados positivos en las dos pruebas.

Se observó que el antígeno extraído con la técnica utilizada da un resultado más rápido y exacto que el antígeno extraído por el método original.

C. Determinación de la concentración de Carbohidrato.

En la Tabla 5 se muestran los porcentajes obtenidos de los componentes de carbohidrato C.

Tabla No.5

Fración	Concentración	% obtenido
Ramnosa	0.333 mg/ml	63.29 %
N- acetil glucosamina	0.193 mg/ml	36.70 %
Total	0.526 mg/ml	99.99 %

Los datos de la Tabla 5 fueron obtenidos determinando la concentración de carbohidrato por el método de Dubois (16).

D. Determinación del Título de Anticuerpos.

El título de anticuerpos obtenido de la inmunización de los conejos con el carbohidrato C fue de 1:256 en promedio.

Las pruebas utilizadas para la determinación de anticuerpos fueron: precipitación en capilar, precipitación en tubo e inmunodifusión doble.

E. Evaluación del Suero

La efectividad del antisuero se probó con antígenos extraídos a partir de 15 cepas de estreptococo B-hemolítico grupo A, previamente identificadas con la prueba de Bacitracina.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos con la Prueba de Precipitación en Capilar para las 15 cepas clasificadas como Estreptococo B-hemolítico grupo A por prueba de Bacitracina.

TABLA No. 6

Cepa No.	Prueba de Bacitracina	Prueba de Precipitación en Capilar
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	-
8	+	-
9	+	+
10	+	-
11	+	-
12	+	-
13	+	+
14	+	+
15	+	+

Del total de cepas probadas el 66.6% fue + y el 33.3% -.

Se observó que en las pruebas realizadas con antisuero con título alto, el resultado se obtiene en menos tiempo que en las realizadas con el antisuero con título bajo.

VII. D I S C U S I O N

En este trabajo el carbohidrato D fué extraído a partir de la cepa de Estreptococo B-hemolítico grupo A tipo MS, por el método de Lancefield obteniendo porcentajes de n-acetilglucosamina y ramnosa muy similares a los reportados en la literatura.

El método de extracción fué modificado en cuanto al ajuste de pH (tal como se indica en los resultados). El tener un pH exacto, es importante porque el carbohidrato es inestable en medio ácido o básico y además tomando en cuenta que el suero anti-carbohidrato tiene un pH neutro, el antígeno debe tener un pH similar, para que se lleve a cabo la serotipificación (reacción de precipitación).

Debido a que los títulos de anticuerpos obtenidos en los conejos inmunizados fué diferente en algunos. Se tomó un promedio general. Esta variación puede explicarse por lo siguiente:

a) Estudios hechos por diversos investigadores demostraron la influencia de los factores genéticos en la respuesta inmune. Los conejos pertenecían a la misma raza (rueva zelandá), pero descendían de padres diferentes, no se tuvo un estándar en el peso y la edad, por lo tanto la capacidad para responder al antígeno (carbohidrato) varía en cada animal (58).

b) Siendo el carbohidrato C un antígeno pequeño (P.M. aprox. 10,000) y de estructura no muy compleja, en algunos animales el

sistema inmune tarda en reconocerlo por lo que se monta una respuesta baja, pero en otros este reconocimiento es más rápido y la respuesta es más alta.

c) Respecto a la vía de inmunización se considera, que en un principio la vía intravenosa no funciono como se esperaba pues se obtuvieron títulos muy bajos, debido probablemente a que la concentración de antígeno inoculada fue baja por lo que el carbohidrato se catabolizó rápidamente y no quedaron cantidades suficientes para montar una respuesta considerable.

Posteriormente se dió un refuerzo con adyuvante, lo que permitió que el antígeno se liberará más lentamente y se elevarán los anticuerpos hasta los títulos reportados.

Después de determinar los títulos del antisuero obtenido, se probó con antígenos extraídos de cepas problema, que previamente fueron identificadas como *Streptococo B-hemolítico grupo "A"* con la prueba de Bacitracina. Se llevaron a cabo reacciones serológicas mediante pruebas de precipitación en capilar, demostrándose la efectividad del antisuero en la serotipificación de *Streptococo B-hemolítico*.

No así la efectividad de la prueba de Bacitracina, la cual podemos considerar como una prueba presuntiva y no confirmativa en la identificación de este microorganismo.

El tiempo en que se lleva a cabo la prueba de precipitación en capilar depende de la potencia del suero, entre más alto es el

El título de anticuerpos más rápida es la prueba. Esto se debe al principio de reacción de precipitación. Dicha reacción antígeno-anticuerpo sigue la ley de acción de masas y la rapidez con que se formen los complejos depende de la concentración de antígeno y de anticuerpos y de ciertas condiciones como lo es el pH.

Comparada con otros métodos serológicos utilizados para la serotipificación de *Streptococo B-hemolítico grupo A*, como son la Inmunodifusión doble, CIE, Inmunofluorescencia, etc. La precipitación en capilar ofrece muchas ventajas: no requiere mucho tiempo, es barata, sensible y da resultados confiables.

El diagnóstico exacto y confiable de *Streptococo B-hemolítico grupo A*, utilizando suero anticarbohidrato C permite dar el tratamiento adecuado a una infección estreptocócica y ayuda a prevenir enfermedades como la fiebre reumática.

VIII. CONCLUSIONES

1. El método de Lancefield es una técnica de extracción eficiente, no muy compleja y con resultados satisfactorios, pues se obtiene una buena concentración de carbohidrato C.
2. Se obtuvo suero anticarbohidrato C del grupo A, con la inoculación del antígeno extraído a partir de la cepa tipo M5 y se demostró su efectividad en la identificación de *Streptococo* β -hemolítico grupo A mediante pruebas de precipitins en capilar. Por lo anterior el suero específico constituye una herramienta importante en el diagnóstico clínico de dicha bacteria.
3. La precipitación en capilar es un método de serotipificación sencillo, de fácil manejo que da un resultado confiable, y el tiempo en que se obtiene dicho resultado depende de la potencia del suero.
4. El suero anticarbohidrato C es de gran utilidad en las pruebas de diagnóstico para *Streptococo* β -hemolítico grupo A. Sirvió como apoyo en otro trabajo de Tesis titulado "La técnica de Coagulación empleando proteína A de *Staphylococcus aureus* + para *Streptococo* β -hemolítico grupo A".

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABE Y., Abouf J.E., Fujikura T., and Kawashima H. (1980). Species-dependent response to streptococcal lymphocyte mitogens in rabbits, guinea pigs, and mice. *Inf. Imm.* 29 (2) 814-818.
- 2.- AEBERHOLD R., Herbst H., Chang J.Y., and Dietmar G.B. (1984). Murine M₁ 210 isotype resonant monoclonal antibody S0510,1 specific for the group A streptococcal polysaccharide. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 355: 1385-1391.
- 3.- BARETTI D.J., Briggant M., and Ayoub E.M. (1983). Assay of antibody to group A streptococcal carbohydrate by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 12 (3): 622-627.
- 4.- BENSLIMANE A., Carrac M., Veyssiere C., Verney R., Bellion A.M., and Rotta J. (1987). Enzyme linked immunosay (ELISA) for detection of group A streptococcal antibodies. *Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases*, Ed. Reedbooks: 243-244.
- 5.- BERKOWITZ C.D., Anthony B.F., Levitt G., Kaplan E.L., Welniky E., James D., Feldman S., and Brano A.L. (1987). Direct demonstration of group A streptococcal antigen by latex agglutination in throat swabs of patients with pharyngitis. *Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases*. Ed. Reedbooks: 59-60.
- 6.- BRAUDE A.I. (1984). *Microbiologia Clinica*. Ed. Mad. Panamericana: 320-330.
- 7.- BRAUN D.G., Eichmann K., and Frause R.M. (1969). Rabbit antibodies to streptococcal carbohydrates. *J. Exp. Med.* 122: 809-830.
- 8.- BRILES D.E., Nahn M., Marion T.N., Perlmutter R.M., and Ravie S.M. (1983). Streptococcal group A carbohydrate has properties of both a thymus independent (11-3) and a thymus dependent antigen. *J. Immunol.* 128 (5): 2032-2035.
- 9.- CLEARY P., Chenoweth E., and Wexler E. (1987). A streptococcal inactivator of chemotaxis: A new virulence factor specific to group A streptococci. *Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases*. Ed. Reedbooks: 179-180.

10.- COWAN S.T., and Steel K.J. (1981). Manual for the identification of medical bacteria. 2th. ed. Cambridge Univ. Press. : 45-55.

11.- CUNNINGHAM M.W., Krisher K., and Graves D.C. (1984). Murine monoclonal antibodies reactive with human heart and group A streptococcal membrane antigens. Inf. Imm. 52 (1) : 34-41.

12.- CUNNINGHAM M.W., Krisher K., and Graves D.C. (1987). Immunological similarities: human heart and group A streptococci. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 275-276.

13.- DALE J.D., and Reachey E.H. (1987). Protective epitopes of group A streptococcal M proteins shared with sarcolemmal membrane proteins of human heart. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 108-109.

14.- DAVIDSON I., and Henry J.R. (1981). Diagnostico Clinico por el Laboratorio Todd-Sanford. 6ta. ed. Salvat editores : 986-989.

15.- DAVID B.D., and Dulbecco R. (1978). Tratado de Microbiologia. 2da. ed. Salvat editores: 730-749.

16.- DUBOIS M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., and Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28 (3) : 350-356.

17.- EL KIRLY A.M., Hafez K., Guirguis N., Facklam R.R., Johnson D.R., and Wannamaker L. (1980). Heterogeneity of group A type-specific antibodies. Inf. Imm. 27 (5) : 953-959.

18.- ESSER R.E., Stimpson S.A., Anderle S.K., Eisenberg R.A., Brown R.R., Cromartie W.J., and Schwab J.H. (1987). Mechanisms of recurrence in bacterial cell wall-induced arthritis. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 351-352.

19.- FIGCHETTI V.A., and Fazio-Zanakis M. (1987). Electron microscopy of the group A streptococcal cell surface. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 180-183.

20.- FUDENBERG H.H., and Stites P.D. (1980). Manual de Immunologia Clínica. 2da. ed. El Manual Moderno: 766.

21.- FUNG J.C., Nicher K., and McCarty M. (1982). Immunochemical analysis of streptococcal group A, B, and C carbohydrates, with emphasis on group A. Inf. Imm. 32 (1): 209-215.

22.- GRUTTER T., Herbst H., Aebersold R., Chang J.Y., and Braun D.G. (1987). The first complete primary structure of the variable domain of a murine antistreptococcal group A carbohydrate antibody. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 246-247.

23.- HAMADA S., Okahashi N., Yamamoto T., Morisaki I., Michalek S.M., and McGhee J.R. (1983). Isolation and immunochemical characterization of carbohydrate antigens prepared from group A *Streptococcus pyogenes*. Zbl. Bakt. Hyg. 256 : 37-48.

24.- HAVLICEK J., Ryc M., Pokorny J., Havlicková H., and Köhnemund O. (1987). Electron microscopic visualization of fibrinogen binding to group A *streptococcus* and its M protein linked nature: competition with other plasma proteins. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 79-81.

25.- HIRAMATSU M., Suzuki T., Takahashi K., and Ota Z. (1987). Antibody response and cellular immunity to streptococcal polysaccharide in Iga nephropathy. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases Ed. Reedbooks : 249-250.

26.- HOLM S.E., Knöll H., Gerlach D., Ozegowski J.H., and Köhler W. (1987). The influence of immunization with ET type A on the infection of rabbits with viable *streptococci*. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 141-143.

27.- HRIBALACVA V., Gerlach D., Ozegowski J.H., and Knöll H. (1987). Leukocyte inhibition factor induced by erythrogenic toxin in vitro. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 143-145.

28.- HUANG J.C., and Diene B.B. (1987). Extracellular products of group A streptococci as a possible virulent marker in human infections. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 153-155.

29.- HUANG J.C., Lessard R., and Diene B.B. (1987). Serogrouping of streptococci by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 61-62.

30.- KIM K.S., and Kaplan E.L. (1987). Demonstration of penicillin tolerance in group A streptococci. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 304-305.

31.- KOGA T., Kakimoto K., Hirofuji T., Ohkuni H., Watanabe K., Saisho K., Sumiyoshi A., and Kotani S. (1987). Polyarthrits in mice following the systemic injection of the cell wall or its peptidoglycan fraction from group A streptococci and other bacteria. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 350-351.

32.- KRAUSE R.M. (1963). Symposium on relationship of structure of microorganisms to their immunological properties. Bacteriol. Rev. 27 : 369-381.

33.- KRAUSE R.M. (1970). Search for antibodies with molecular uniformity. Adv. Immunol. 12 (1): 12-28.

34.- KRAUSE R.M., and McCarty M. (1961). Studies on the chemical structure of the streptococcal cell wall. J. Exp. Med. 114: 127-140.

35.- KUNNEKUND O., Havlicek J., and Köhler W. (1987). Covalent linkage of fibrinogen receptor to streptococcal M protein. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 86-87.

36.- KURZYNSKI T.A., and Van Holten M.C. (1981). Evaluation of techniques for isolation of group A streptococci from throat cultures. J. Clin. Microbiol. 13 (5): 891-894.

37.- LAKSHMI A. and Prakash K. (1967). Dynamics of group A streptococcal Polysaccharide antibody production in goat. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal Diseases. Ed. Reedbooks : 248-249.

38.- LANCEFIELD R.C. (1928). The Antigenic complex of *S. haemolyticus*. J. Exp. Med. 47 (91).

39.- LENNETTE E.H. (1980). Manual of Clinical Microbiology. 3th. ed. American Society for Microbiology. : 88-110.

40.- LEONG P.A., Schwab J.H., and Lohen M.S. (1984). Interaction of group A streptococcal peptidoglycan polysaccharide with human polymorphonuclear leukocytes ; implications for pathogenesis of chronic inflammation. Inf. Imm. 45 (1): 160-165.

41.- MATSUSHI T., Hashimoto M., and Yamaguchi A. (1987). Sensitization of blood cells with group A C-polysaccharide for diagnosis of infection with *β-hemolytic streptococci*. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks : 245-246.

42.- MCCARTY M. (1958). Further Studies on the chemical basis for serological specificity of group A streptococcal carbohydrates. J. Exp. Med. 108: 311-322.

43.- MEYNELL C.G., and Meynell E. (1969). Bacteriologia Experimental Teoria y Práctica. 1a. ed. Ediciones Omega: 140-144.

44.- MILLER J.M. (1984). Techniques Manual. Isolation and Identification of *Streptococci*. U.S. Department of Health and Human Services. : 1-27.

45.- MORITA M., Shoji K., Yamawaki T., Saito S., and Ishida N. (1987). A seroepidemiological study on group A *Streptococci* in Japan and Ecuador. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks. : 23-24.

46.- MYRVIK G.N. (1977). Bacteriologia y Micologia Médicas. 2da. ed. Ed. Interamericana.

- 47.- NAHM M.H., Clevinger D.L., and Davie J.M. (1982). Monoclonal antibodies to streptococcal group A carbohydrate. J. Immunol. 129 (4): 1513-1518.
- 48.- NAHM M.H., Murray F.R., Clevinger D.L., and Davie J.M. (1980). Improved diagnostic accuracy using monoclonal antibody to group A streptococcal carbohydrate. J. Clin. Microbiol. 12 (4): 506-508.
- 49.- NASR E.M.M., and El Tayeb, S.H.M. (1987). Cross reaction between skin and skin Streptococcus pyogenes antigens. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks. : 273-275.
- 50.- OKUYAMA Y. (1987). Hemolytic inhibition of streptolysin G. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks. : 147-149.
- 51.- ONICA D., Mihaleu F., Lenkei R., Gherman M., and Tudor M. (1977). Autoantibodies detected in rabbits hiperimmunized with group A, C, and G streptococcal vaccines. Inf. Imm. 10 (3): 624-628.
- 52.- OSTERLAND C.K., Miller E.J., Karakawa W.W., and Krause R.M. (1966). Characteristics of streptococcal group-specific antibody isolated from hyperimmune rabbits. J. Exp. Med. 123: 599-614.
- 53.- OTERO J.R., Reyes S., and Noriega A.R. (1983). Rapid diagnosis of group A streptococcal antigen extracted directly from swabs by an enzymatic procedure and used to detect pharyngitis. J. Clin. Microbiol. 10 (2): 318-320.
- 54.- REID H.F.M., Read S.E., Zabriskie J.B., Ramkisson R., and Poon-King T. (1984). Suppression of cellular reactivity to group A streptococcal antigens in patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis. J. Inf. Dis. 149 (6): 841-849.
- 55.- ROTTA J., Krause R.M., Lancefield R.C., Everly W., and Lackland H. (1971). New approaches for the laboratory recognition of M types of group A streptococci. J. Exp. Med. 124: 1298-1315.

56.- RYC M., Rotta J., Straka E., Pokorny J., Hribalova V., and Zaoral M. (1987). Effect of *Streptococcus* peptidoglycan and its synthetic analogues on rabbit blood elements. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks. : 196-199.

57.- SATNIK V., Kapoor H., and Prakash K. (1987). Rapid serological identification of beta hemolytic *Streptococcus* from throat swabs with selective enrichment broth using coagglutination techniques. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks. : 58-59.

58.- SCOTT R.L., and Braun P.G. (1979). Rabbit allotype a locus subspecificities of homogeneous anti-streptococcal antibodies. Eur. J. Immunol. 9 (3) : 379-384.

59.- SCHALEN C., Christensen P., Kurl D.N., Sramek J., and Svensson M.L. (1987). Interactions of nephritis-associated group A *Streptococcus* with aggregated human IgG. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks. : 61-63.

60.- SCHMIDT K.H., and Köhler W. (1987). Specific binding of fibrinogen fragment D by M+ and M- group A *Streptococcus* and isolation of a receptor different from M protein. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks. : 63-65.

61.- SRAMEK J., Havlicková H., and Rotta J. (1987). M-Typability of group A *Streptococcus*. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks. : 37-38.

62.- STANISLAWSKI L., Simpson W.A., Hasty D., Sharon N., Beachey E.H., and Ofek I. (1985). Role of fibronectin in attachment of *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli* to human cell lines and isolated oral epithelial cells. Inf. Imm. 48 (1) : 257-259.

63.- TIZARD R.I. (1979). Immunologia Veterinaria. 1a. ed. Nva. ed. Interamericana. : 25-33.

64.- **TYLEWSKA S.**, and **Hryniewicz W.** (1987). Group A Streptococcal cell wall protein is bound to human pharyngeal epithelial cells. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. *Readbooks.* : 85-86.

65.- **USAMI H.**, **Sugawara Y.**, **Tajimoto M.**, and **Kotani S.** (1987). Attempt to prepare M-typing sera for *S. pyogenes* by immunization of guinea pigs with "native" M proteins enzymatically obtained. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. *Readbooks.* : 183-184.

66.- **USAMI H.**, **Yamamoto A.**, **Nagayama M.**, **Sugawara Y.**, **Hamada S.**, **Yamamoto T.**, **Kato K.**, **Kokoguchi S.**, and **Kotani S.** (1987). Induction of serum factor causing tumour necrosis by lipoteichoic acids (LTA) of *Streptococcus pyogenes*. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. *Readbooks.* : 195-196.

67.- **VAN DE RIJN I.**, and **Triscott M.K.** (1987). Analysis of group A and C streptococcal membrane proteins. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. *Readbooks.* : 199-200.

68.- **WAGNER B.**, **Wagner M.**, and **Ryc M.** (1987). Morphological evidence for different types of IgG-Fc receptors in group A streptococci. *Zbl. Bakt. Hyg.* 256 : 61-71.

69.- **WAGNER B.**, **Wagner M.**, **Ryc M.**, and **Dicová R.** (1987). Ultrastructural localization of lipoteichoic acid on group A streptococci. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. *Readbooks.* : 192-194.

70.- **WAGNER M.**, **Wagner B.**, **Scriba S.**, **Gerlach D.**, **Knöll H.**, **Köhler W.**, and **Holm S.E.** (1987). Light and electron microscopic demonstration of the binding of erythrogenic toxin A on human lymphocytes using colloidal gold as marker. Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. *Readbooks.* : 145-147.

71.- **WEISS S.**, **Kelus S.A.**, and **Braun G.D.** (1977). Antibody response to the streptococcal group A-variant polysaccharide in *BASILEA* rabbits lacking k-polypeptide chains. *J. Exp. Med.* 146: 1195-1205.

72. - WHITNACK E., Dale B.J., and Beachey H.E. (1984). Common protective antigens of group A streptococcal M proteins masked by fibrinogen. J. Exp. Med. 159 : 1201-1212.

73. - YOSHIZAWA N., Oshima A., Takeuchi A. Takahashi K. Sagai I., and Treser G. (1987). Serological studies in poststreptococcal glomerulonephritis using streptococcal antigen (preabsorbing antigen, PA-Ag). Proc. IXth. Lanc. Int. Symp. on Strept. and Streptococcal diseases. Ed. Reedbooks. : 251-252.