



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA**



**SECRETARÍA DE SALUD DEL ESTADO DE MICHOACÁN
LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA**

**“Análisis de *Streptococcus spp.*, Beta-
hemolíticos de muestras procedentes de
Unidades Médicas del Estado de Michoacán”.**

TESIS

Para obtener el título de Químico-farmacobióloga

PRESENTADA POR: ELVIA PÉREZ MARTÍNEZ

ASESOR: Biol. Juan Luis Jaime Sánchez

Morelia, Michoacán Abril del 2018.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, bajo la asesoría del Biol. Juan Luis Jaime Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

**“Mientras el rio corra, los montes hagan sombra y en el cielo haya estrellas,
debe durar la memoria del beneficio recibido en la mente del hombre
agradecido”**

Agradezco principalmente a mis padres Julio Pérez Hernández y María Isabel Martínez Medina por todo el apoyo para culminar mi educación Universitaria, por la paciencia que han tenido todo este tiempo mientras realizaba la tesis, por las palabras de aliento y la educación que me han brindado ya que sin ellos no sería la persona que ahora soy.

A mis hermanos Daniel, Sonia, Sandra y Ángel que han estado ahí para apoyándome incondicionalmente a quienes amo sobre todas las cosas y saben que cuentan conmigo así como yo cuento con ustedes.

Agradezco a toda mi familia mis tíos (maternos y paternos) y abuelos los cuales han estado ahí para dar una palabra de aliento a seguir adelante.

En todo el transcurso de mi camino he conocido a muchas personas, un recuerdo de cada una de ellas desde mi educación pre-escolar hasta estos momentos algunas con una palabra de aliento, algunas más de desánimo pero cada una de ellas me llevo a seguir adelante y llegar hasta donde estoy en estos momentos.

Agradezco a mis amigos María, Monserrat Espinoza, Leticia, Javier, Mario y Monserrat Morales, por su valiosa amistad y apoyo durante y fuera de la universidad, es una muy gratificante poder contar con ustedes en todo momento, espero que eso no valla a cambia en un futuro y que esta amistad perdure mucho.

Agradezco al personal del Laboratorio de Bacteriología la Q.F.B. María Vicenta Luna Oliva, Q.F.B. Guadalupe Viridiana Barbosa Botello, Q.F.B Mariana Palomino Pérez, Q.F.B. Diana Casares Orozco y Q.F.B. María de Jesús Guevara Landeros

Agradezco a la Directora del Laboratorio Estatal de Salud Pública M.S.P. Gloria Alicia Figueroa Aguilar por la motivación a la realización de este trabajo.

Agradezco a M.S.P. Wendy Viene Padilla Cabrera responsable de Vigilancia Epidemiológica por figurar como aval en la realización del presente trabajo.

Agradezco a la Q.F.B Lilia Chávez Castañeda Jefa del Laboratorio de Medios de cultivo por el apoyo en la realización de los medios de cultivos utilizados.

Agradezco a la Q.F.B. Josefina García Madrigal por la custodia de las cepas en el ultracongelador del Cepario a su cargo.

Para la realización de este trabajo se utilizaron los aislados procedentes del Laboratorio de Investigación en Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil “Eva Sámano de López Mateos”, a cargo de la Q.F.B. Cecilia García Ruiz de Chávez, así como a la responsable de los aislamientos Q.F.B. María Elena Vargas Arévalo; también los aislados del Laboratorio de Microbiología del Hospital General “Dr. Miguel Silva”, a cargo de la Q.F.B. Laura Silvia Báez Villegas y la responsable de los aislamientos M.S.P. Carla Rocio Huerta Baltazar del Laboratorio de Bacteriología del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán.

Agradezco al D.C. Luis Manuel Perea Mejía y M. en C. Alma Edna Inzunza Montiel del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM por el apoyo y la colaboración en la tipificación de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.

Agradezco a los sinodales M. en C. Juan Manuel Barajas Magallon, E.D.H.L Judith Esmeralda Prieto Sierra, MSP. Gloria Alicia Figueroa Aguilar, M. en C. Sandra Maria Suarez Moreno y D. en C. Rafael Ortiz Alvarado por tomarse el tiempo de revisar a detalle el trabajo y dar sus recomendaciones pertinentes.

Agradezco al biólogo Juan Luis Jaime Sánchez por el apoyo a la realización de este trabajo y la aportación de todos sus conocimientos.

“Educar a una persona no es hacerle aprender algo que no sabía sino hacer de él alguien que no existía. ¡Muchas gracias por todo!”

INDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco teórico	
3.1 Características de los estreptococos	8
3.1.1. Estreptococos β -hemolíticos de los grupos C y G	8
3.1.2. Estreptococos del grupo D	8
3.1.3. Estreptococos β -hemolíticos del grupo F	8
3.1.4. <i>Streptococcus agalactiae</i>	9
3.1.5. <i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A)	10
3.2 Patogenia	13
3.2.1. Mecanismos de virulencia de los cocos Gram positivos, catalasa negativa.	13
3.2.2. Estreptococos β -hemolíticos de los grupos C y G	15
3.2.3. <i>Streptococcus agalactiae</i>	15
3.2.4. <i>Streptococcus pyogenes</i>	16
3.3 Patologías	
3.3.1. Estreptococos del grupo C y G	18
3.3.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	18
3.3.3. <i>Streptococcus pyogenes</i>	20

3.4. Vacunas contra <i>Streptococcus spp.</i>	23
3.4.1. Vacuna contra <i>Streptococcus agalactiae</i>	23
3.4.2. Vacuna contra <i>Streptococcus pyogenes</i>	24
3.5. Resistencia microbiana	24
3.5.1. <i>Streptococcus agalactiae</i>	25
3.5.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	26
3.6. Epidemiología	27
3.6.1. <i>Streptococcus pyogenes</i>	29
3.7. Métodos de cultivo e identificación.	30
3.7.1. Métodos de detección directa	30
3.7.2. Tinción Gram	31
3.7.3. Cultivos	32
3.7.4. Diagnóstico serológico	32
3.7.5. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos	33
3.7.6. Prueba de bacitracina	33
3.7.7. Prueba de Trimetroprima con sulfametoxazol	34
3.7.8. Prueba CAMP	34
3.7.9. Prueba de pirrolidoni-β-naftilamida (PYR)	35
3.7.10. Detección de <i>Streptococcus spp.</i> por Biología molecular	36
3.7.11. Método de tipificación por RFLP.	40

3.8. Métodos de preservación.	41
3.8.1. Método de conservación a largo plazo	42
3.8.2. Métodos de conservación a corto plazo	43
4. Justificación	45
5. Objetivos	46
6. Materiales y métodos	47
7. Resultados y discusión	51
7.1 Estreptococos por unidad de procedencia	51
7.2 Estreptococos por fuente de aislamiento	52
7.3 Estreptococos por grupo etario	54
7.4 <i>Streptococcus</i> spp., por sexo	55
7.5 Especies de estreptococos recuperados de diferentes infecciones	56
7.6 Estreptococos agrupados según la clasificación de Carl R. Woese	57
7.7 Especies de <i>Streptococcus</i> spp., identificadas	58
7.8 Recuperación de cepas preservadas a -70°C en Amies con carbón activado.	59
7.9 Tipificación de <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i> .	65
7.10 Resultados de antibiogramas	67
8. Conclusión	71
9. Bibliografías	74
10. Anexos	85

INDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
Tabla 1.	Relación entre los grupos de Lancefield y las principales especiales de estreptococos	4
Tabla 2.	Cantidad de colonias recuperadas.	60
Tabla 3.	Relación de la infección en el paciente con el serotipo.	65
Tabla 4.	Resultados de antibiograma realizado.	94
Tabla 5.	Principales antibióticos para <i>Streptococcus spp.</i> β -hemolíticos del grupo A, B y C.	95
Tabla 6.	Comparación de bioquímicas realizadas con el Manual Bergey's	96

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
Figura 1.	Taxonomía basada en la secuenciación del genoma ARNr 16S.	7
Figura 2.	Principales antigénicos conocidos sobre la superficie de los Estreptococos del grupo A encapsulados virulentos.	10
Figura 3.	Las bacterias Gram positivas y gramnegativos inducen septicemia por vías compartidas y separadas.	12
Figura 4.	Enfermedades por <i>Streptococcus pyogenes</i> .	23
Figura 5.	Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.	25
Figura 6.	Estudio de los flujos de información genética de una célula.	37
Figura 7.	Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S.	39
Figura 8.	Diagrama del método de utilización del Phoenix™ 100 BD.	48
Figura 9.	Diagrama del método de aglutinación con Pastorex Strep.	49
Figura 10.	Diagrama de flujo del método para activación de los estreptococos preservados en ultracongelación.	50
Figura 11.	Resultados de las técnicas utilizadas para <i>Streptococcus equi</i> .	62
Figura 12.	Resultados de las técnicas utilizadas para <i>Streptococcus agalactiae</i> .	63
Figura 13.	Resultados de las técnicas utilizadas para <i>Streptococcus pyogenes</i>	64

INDICE DE GRAFICAS

GRÁFICA		PÁGINA
Gráfica 1.	Comparación de las defunciones anuales causados por los principales patógenos.	28
Gráfica 2.	Estreptococos por unidad de procedencia	51
Gráfica 3.	Estreptococos por fuente de aislamiento.	52
Gráfica 4.	Estreptococos por grupo etario.	54
Gráfica 5.	<i>Streptococcus spp.</i> , por sexo.	55
Gráfica 6.	Especies de estreptococos recuperados de diferentes infecciones.	56
Gráfica 7.	Estreptococos agrupados según la clasificación de Carl R. Woese.	57
Gráfica 8.	Especies de <i>Streptococcus spp.</i> , identificadas.	58
Gráfica 9.	Recuperación de cepas preservadas a -70°C en Amies con carbón activado.	59
Gráfica 10.	Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los estreptococos preservados.	61
Gráfica 11.	Serotipos de <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i> .	66
Gráfica 12.	Antibiograma de cepas.	67
Gráfica 13.	Resultados de antibiograma de los diferentes aislados.	68

1. RESUMEN

Los Estreptococos beta-hemolíticos son un grupo de bacterias que se caracterizan por causar la destrucción de eritrocitos con la acción de Beta-lisinas, son cocos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos. Las especies más importantes son *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes*, causan infecciones cutáneas, sistémicas, respiratorias, secuelas e infecciones no supurativas en los pacientes. De lo anterior se desprende realizar un análisis de los aislados en diferentes unidades médicas del estado de Michoacán del año 2011 al 2016. Para desarrollar este trabajo se elaboró una base de datos con la información contenida en las bitácoras del laboratorio de Bacteriología del LESP, se activaron cepas preservadas en medio Amies con carbón activado en ultracongelación a -70 °C y algunas fueron enviadas al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM, para tipificarlas mediante técnicas de biología molecular como PCR y RFLP. Las cepas provenían de procesos invasivos así como, infecciones respiratorias e inclusive de ambientes hospitalarios, aquellas que fue posible preservar, se lograron recuperar satisfactoriamente después de cuatro años por métodos de rutina y se comprobó que dichas bacterias conservaron sus características fenotípicas así como los perfiles de susceptibilidad y resistencia a antibióticos, concluyendo que el método de preservación utilizado es confiable para preservar *Streptococcus spp.* De los aislados enviadas a la UNAM se identificaron los serotipos de las proteínas M, lo que permitió correlacionarlas con las infecciones de los pacientes, aunque algunas como la **M43** todavía no relacionados claramente con un solo tipo de infección. Se recomienda llevar a cabo una vigilancia estrecha sobre bacterias, ya que aunque son susceptibles a penicilina siguen siendo un importante problema de salud pública.

PALABRAS CLAVE:

Infecciones, resistencia, preservación, serotipos y población Michoacana.

ABSTRAC

The beta-hemolytic streptococci are a group of bacteria that are characterized by causing the destruction of erythrocytes with the action of Beta-lysines, Gram positive cocci, catalase and oxidase negative. The most important species are *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus pyogenes*, causing cutaneous, systemic, respiratory infections, sequelae and nonsuppurative infections in patients. From the above it is clear to perform an analysis of the isolates in different medical units of the state of Michoacán from 2011 to 2016. To develop this work, a database with the information contained in the logs of the Bacteriology laboratory of the LESP was prepared. activated strains preserved in Amies medium with activated carbon in ultra-freezing at -70 ° C and some were sent to the Molecular Biology Laboratory of the Department of Public Health, Faculty of Medicine, UNAM, to typify them using molecular biology techniques such as PCR and RFLP. The strains came from invasive processes as well as respiratory infections and even hospital environments, those that were possible to preserve, were recovered satisfactorily after four years by routine methods and it was found that these bacteria retained their phenotypic characteristics as well as the profiles of susceptibility and resistance to antibiotics, concluding that the preservation method used is reliable to preserve *Streptococcus* spp., from the isolates sent to the UNAM the serotypes of the M proteins were identified, which allowed to correlate them with the infections of the patients, although some like the M43 still not clearly related to a single type of infection. It is recommended to carry out a close surveillance on bacteria, because although they are susceptible to penicillin they are still an important public health problem.

KEYWORDS:

Infections, resistance, preservation, serotypes and population Michoacana

2. INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género de *Streptococcus spp.*, se observan como cocos Gram positivos agrupados en cadenas o pares, especialmente en fluidos, algunas especies pueden presentar una cápsula en su pared. La longitud de la cadena varía según la especie, desde 2 hasta más de 30 células. Presentan dimensiones que van de 0.2 a 1.2 micras, son catalasa negativa debido a la ausencia de la enzima citocromo que la diferencia de otros géneros de bacterias, anaerobias facultativas, son inmóviles y no presentan esporas. La composición de la pared celular de los *Streptococcus spp.*, es similar a la de otras bacterias Gram positivas compuestas de péptidoglucano con hidratos de carbono, ácidos teicoicos, lipoproteínas y antígenos proteicos de superficie. La identificación se puede llevar a cabo mediante pruebas serológicas sobre la base del antígeno de superficie constituidos por hidratos de carbono. Algunos de ellos los podemos encontrar en la biota normal de seres humanos y animales.

La clasificación de los *Streptococcus spp.*, se basa en la capacidad de producir hemólisis en agar sangre por la lisis total o parcial, la cual no precisamente es una destrucción de eritrocitos, sino más bien el agotamiento del potasio en los hematíes provocando el efecto verde en las placas con agar sangre, hay 3 tipos de hemólisis, beta donde hay una destrucción total de los eritrocitos por la presencia de hemolisinas en dicho microorganismo, de modo que se observa un halo claro y/o transparente, alfa en la cual observa una deficiencia de potasio en los eritrocitos, con un halo verdoso en la colonia y gamma o sin hemólisis, en esta no hay destrucción de eritrocitos. A partir de pruebas realizadas por Dochez y Avery en 1917 mediante pruebas inmunológicas comprobaron que el 68% pertenecía a cuatro grupos específicos y el 32% restante quedó sin clasificar. Una clasificación posterior se llevó a cabo por Rebecca Craighill Lancefield (1895-1981) mediante la caracterización de sus ácidos teicoicos que pueden ser determinadas mediante anticuerpos (Barón, 1996). Tras diversos estudios de Rebecca Lancefield sobre la Fiebre Reumática asociada con estreptococos, en el año de 1933 publicó una clasificación tanto de diversos estreptococos patógenos, como de comensales,

basada en el antígeno específico de superficie, dicho antígeno es un polisacárido de la cápsula bacteriana.

La clasificación de Lancefield se realizó con 106 cepas de estreptococos hemolíticos aislados de personas enfermas, animales, leche y queso. Las cepas procedentes de infecciones humanas tenían un carbohidrato común, pero encontró carbohidratos diferentes en cepas procedentes de animales, eso significaba que en la naturaleza había varios grupos serológicos de estreptococos hemolíticos. A las cepas humanas en las que encontró el carbohidrato C las denominó grupo A, y a las siguientes fue dándoles las letras del alfabeto a medida que las iba encontrando, como se muestra en la Tabla 1. Así, el grupo B está formado por cepas aisladas de vacas y leche, el grupo C de cerdos y algunos otros animales, el grupo D de varios productos lácteos y queso, etc. (Piqueras *et. al* 2014).

Tabla 1. Relación entre los grupos de Lancefield y las principales especies de estreptococos.

GRUPO DE LANCEFIELD	ESPECIES DE INTERÉS
A	<i>Streptococcus pyogenes</i>
B	<i>Streptococcus agalactiae</i>
C	<i>Streptococcus equi</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
D	<i>Enterococcus spp</i> , <i>Streptococcus bovis</i> (<i>Streptococcus equinus</i> , <i>Streptococcus galloliticus</i> , <i>Streptococcus pasteurianus</i> , <i>Streptococcus infantarius</i>)
E	<i>Streptococcus porcinus</i> *
F	<i>Streptococcus anginosus</i> ** , <i>Streptococcus constellatus</i> **
G	<i>Streptococcus canis</i>
R	<i>Streptococcus suis</i>
No tipables	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (neumococo), estreptococos viridans orales (<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> ...)
(*) Aislamientos de esta especie pertenecen también a los grupos P, U y V	
(**) Aislamientos de esta especie pertenecen también a los grupos C, A y G	

Tomado de Rebecca C. Lancefield (1895-1981) ordenadora de los estreptococos, Piqueras *et. al* 2014.

Con el paso del tiempo se fueron descubriendo otros estreptococos los cuales no correspondían a ningún grupo de la clasificación establecida por Rebecca Lancefield, debido a esto, se tomaron medidas necesarias para poder agruparlos e identificarlos más claramente. Para realizar dicha clasificación se utilizaron técnicas moleculares como la secuenciación del ARNr 16S, mediante catalogación de oligonucleótidos, utilizados en los estudios de Carl R. Woese. Las secuencias de la colección de fragmentos correspondientes a diferentes bacterias se alinean y comparan utilizando programas informáticos para calcular finalmente los coeficientes de asociación (Rodicio *et. al* 2004).

Clasificación de los *Streptococcus spp.*, con base en la secuencia del gen ARNr 16S.

1. Grupo piogénico: formado por especies beta-hemolíticas de colonias grandes, incluye especies patógenas importantes para el ser humano. En este grupo se encuentra *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus equi* subespecie *equi*, *Streptococcus equi* subespecie *zooepidemicus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus hyointestinalis*, *Streptococcus inae*, *Streptococcus didelphis*, *Streptococcus phocae*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus urinalis*.
2. Grupo mitis: incluye especies que producen alfa-hemólisis tales como el patógeno *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus crista*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus peroris* y *Streptococcus sinensis*.
3. Grupo anginosus o milleri: formado por especies que se encuentran en la cavidad oral humana, en el tracto genital y gastrointestinal, presenta colonias de tamaño

pequeño y características olor a caramelo, así como *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*.

4. Grupo salivarius: Los miembros de este grupo son Voges-Proskauer positivo y no fermentan la arginina, el manitol y el sorbitol, entre ellos se encuentra a *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus vestibularis* y *Streptococcus thermophilus*.
5. Grupo bovis: formado por especies que principalmente habitan en el canal intestinal de los animales y que, en ocasiones, infectan a humanos. Pertenecen al grupo D de Lancefield. En este grupo se encuentra *Streptococcus equinus*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *gallolyticus*, *Streptococcus gallolyticus* subespecie *macedonicus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Streptococcus lutetiensis* y *Streptococcus infantarius* (Montes y García *et al.* 2007).
6. Grupo mutans: engloba 8 especies que no se encuentran incluidas en la clasificación mencionada ya que genéticamente son muy diversas, pero fenotípicamente similares en las que incluyen especies causantes de caries dentales, tales como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus ratus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae* y *Streptococcus orisratti*.
7. Grupo viridans: en este grupo se encuentran algunas especies englobadas en los grupos principales así como algunos que no se encuentran agrupados en los anteriores, son poco conocidos por su escasa participación en infecciones. Los estreptococos englobados en este grupo son debido a su similitud por encontrarse en las mucosas de los mamíferos, no ser patógenos o de escasa virulencia, formar colonias pequeñas (<0.05 mm) y ser alfa-hemolíticos de donde viene su nombre viridans, verde.

En la identificación de estos microorganismos se pueden emplear diversas pruebas comerciales como la galería API Strep, Rapid ID 32 o algún método de identificación automático como VITEK 2, Phoenix 100, Sensititre, Walk-Away, etc; estas con la

finalidad de confirmar la especie correspondiente, otras pruebas a utilizar son mediante detección de antígenos o por precipitación de la cápsula.

La taxonomía básica o anterior se basaba principalmente en las características fenotípicas de cada especie y género como se muestra en la figura 1, sin embargo, se hablaba de que no era algo bien establecido si no que era necesaria una clasificación en base a su genoma, para lo cual Carl R. Woese aportó que el ARNr 16s se encuentra en todos los seres vivos y que era una manera adecuada para poder reordenarlos e incluir a aquellos que no entraban en la clasificación descrita por Rebeca Lancefield.

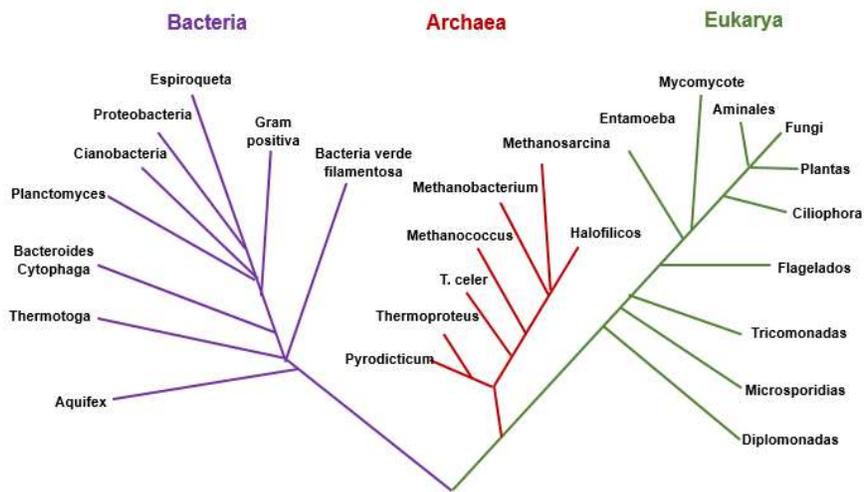


Figura 1. Taxonomía basada en la secuenciación del genoma ARNr 16S por Carl R. Woese. Árbol filogenético. Tomada de Molina *et. al* 2015.

3. MARCO TEORICO

3.1. CARACTERISTICAS DE LOS ESTREPTOCOCOS

3.1.1. Estreptococos β -hemolíticos de los grupos C y G.

Los estreptococos del grupo C representan diversas especies de *Streptococcus spp.*, entre ellas *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus equi* incluyendo la subespecie de las mismas. Crecen como colonias grandes en agar sangre y suelen ser β -hemolíticas, aunque pueden presentar α -hemólisis o no presentar ningún tipo de hemólisis.

3.1.2. Estreptococos del grupo D

En este grupo, hasta el momento se encuentran ocho especies, de las cuales la mayoría no causa infecciones en el ser humano, sin embargo, *Streptococcus bovis* perteneciente a este grupo es de gran importancia en enfermos, se clasifican en biotipos y en cuatro complejos de DNA. Las cepas biotipo I (complejo de DNA I) fermentan manitol y se designan como *Streptococcus gallolyticus* produce endocarditis y en algunos casos se relaciona con carcinoma de colon. El biotipo II se divide en dos: biotipo II. 1 (*Streptococcus infantarius* subespecie *coli*) el cual produce endocarditis y el biotipo II. 2 (*Streptococcus gallolyticus* subespecie *pasteurianus*) produce bacteriemia e infecciones del sistema urinario. El complejo DNA IV tiene una especie, *Streptococcus alactolyticus*. Todos los *Streptococcus spp.*, pertenecientes a este grupo no son hemolíticos y presentan PYR negativo, se desarrollan en presencia de bilis e hidrolizan esculina, no crecen en NaCl al 6.5% y pertenecen a la biota normal de boca e intestino. (Jawetz *et. al* 2011).

3.1.3. Estreptococos β -hemolíticos del grupo F

En el presente grupo se encuentra *Streptococcus milleri* y el grupo anginosus (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*). Pueden presentar cualquier tipo de hemólisis (β -hemólisis, α -

hemólisis o γ -hemólisis) aunque pueden presentar diversos antígenos de superficie como los pertenecientes a los grupos F, C o G y en algunas ocasiones no pueden agruparse. Sus colonias son diminutas en agar sangre, puntiformes después de 24 horas y, si son β -hemolíticas presentan una zona grande de hemólisis que se extiende más allá del margen de la colonia, estas especies con presencia de dicha hemólisis son causantes de infecciones supurativas graves, celulitis, abscesos de tejidos profundos, bacteriemia, osteomielitis y endocarditis.

3.1.4. *Streptococcus agalactiae* (grupo B)

Esta bacteria se presenta como cocos Gram positivos, producen una zona de hemólisis β , se encuentran agrupados en el grupo B de Lancefield produciendo hidrólisis de hipurato de sodio y positivo a la prueba de CAMP. El antígeno de superficie está compuesto de polímero de ramnosa-glucosamina fijada a la capa de péptidoglucano. La especificidad se la confiere el polisacárido capsular y los antígenos proteicos. Los estreptococos pertenecientes al grupo B son encapsulados y pertenecen a uno de los nueve serotipos capsulares reconocidos, los cuales están compuestos por glucosa, galactosa, N-acetilglucosamida y ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) (Koneman *et. al* 2006).

Las cepas de *Streptococcus agalactiae* se puede subdividir en función de la presencia de tres marcadores:

1. El antígeno polisacárido de la pared celular específico de grupo (antígeno B) compuesto por ramosa, N-acetilglucosamina y galactosa.
2. Nueve polisacáridos específicos de la cápsula (**Ia, Ib, II, VIII**) son importantes marcadores epidemiológicos aquellos que dan la variedad a los serotipos.
3. La proteína de superficie (antígeno C).

Los serotipos **Ia, III y V** son los que se asocian con más frecuencia a la colonización y la aparición de enfermedades, así como la virulencia depende principalmente de la capacidad de evitar la fagocitosis.

3.1.5. *Streptococcus pyogenes* (grupo A)

Son cocos dispuestos en cadena o diplococos Gram positivos, presentan beta hemólisis en agar sangre, dependiendo de las condiciones de crecimiento y factores ambientales, en algunas ocasiones se presentan con cápsula que consta de ácido hialurónico la cual impide la fagocitosis. Pueden apreciarse con diferentes colonias en agar sangre, colonias mate o brillante. Las colonias mate son ricas en proteína M y son más virulentas, en cambio las colonias brillantes producen escasa proteína M y suelen presentar menor virulencia (Jawetz *et. al* 2011). En la pared celular de *Streptococcus pyogenes* se encuentran los antígenos de tipo y grupo. El carbohidrato específico de grupo constituye aproximadamente el 10% del peso seco de la célula (antígeno del grupo A de Lancefield), es un dímero de N-acetilglucosamina y ramnosa.

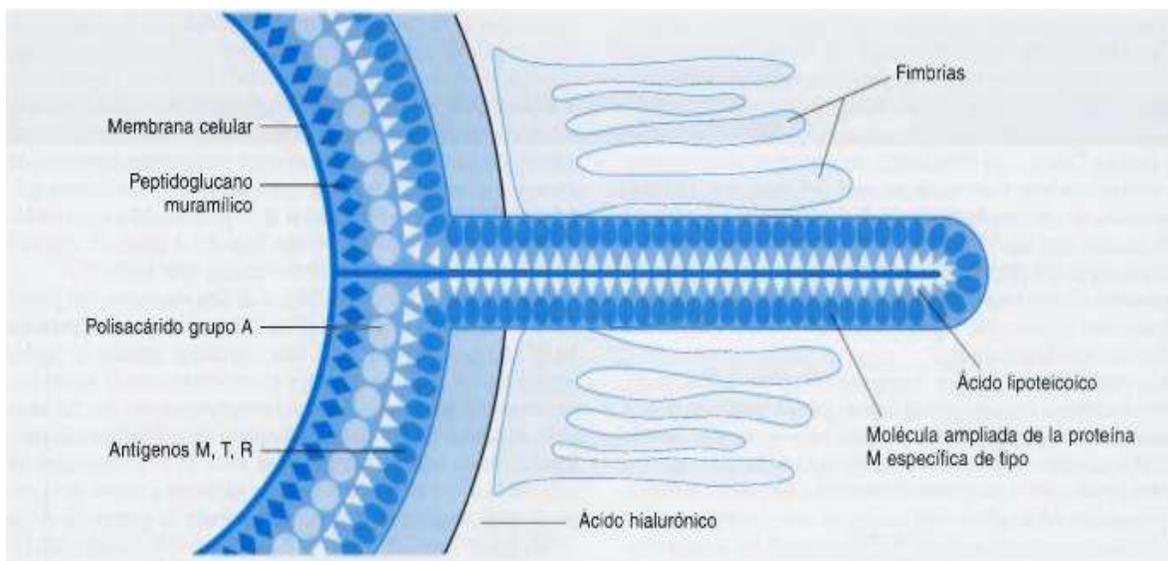


Figura 2. Principales antígenos conocidos sobre la superficie de los estreptococos del grupo A encapsulados virulentos. Tomado de Diagnóstico microbiológico de Koneman *et. al* 2006.

El antígeno de la pared celular es un polisacárido de L-ramnosa y N-acetil-D-glucosamina en relación 2:1 (Koneman *et. al* 2006). Presenta una cápsula de ácido

hialurónico compuesta por unidades de uniones repetidas de β (1-4) de ácido D-glucorónico y (1-3)- β -D-N-acetil glucosamina producto de enzimas codificadas por un grupo de tres genes (hasA, hasB y hasC) como se muestra en la figura 2, se presenta en la fase logarítmica de crecimiento y se elimina en la fase estacionaria debido a la producción de hialuronidasa durante la última etapa de la fase de crecimiento.

El factor de opacidad (**OF**) es una α -lipoproteínasa capaz de opacificar los medios que contienen suero de mamífero. Los estreptococos del grupo A pueden presentar antígenos T y R. Presenta hemolisinas: estreptolisina O y S. La estreptolisina O (SLO) es lábil al oxígeno, es antigénica e inhibida por el colesterol.

Es un prototipo de microorganismo patógeno de humanos, el cual produce invasión local o sistémica aunque puede producir trastornos inmunitarios post-estreptocócicos, en una placa de agar sangre se observa hemólisis beta con un halo de aproximadamente un centímetro de diámetro debido a la producción de hemolisinas tales como estreptolisina O y estreptolisina S, son PYR positivos (l-pirrolidonil-2-naftilamida) y sensibles a bacitracina.

3.2. PATOGENIA

La patogenia de la infección bacteriana comprende el inicio de procesos infecciosos y mecanismos que provocan la aparición de los signos y síntomas. Las bacterias patógenas tienen la capacidad de transmitirse, adherirse a las células e invadir las células y tejidos del hospedero, así como la toxigenicidad y la capacidad para evadir el sistema inmunitario. La enfermedad se produce en el momento en que la bacteria o las reacciones inmunitarias que se desencadenan por su presencia dañan lo suficiente a la persona. Aunque hay una mayor predisposición en una persona con el sistema inmune deficiente. Los principales mecanismos de la inmunidad innata frente a las bacterias son la activación del complemento, la fagocitosis y la respuesta inflamatoria.

Las superficies bacterianas y el lipopolisacárido (LPS) activan el complemento, lo que produce C5a y facilita la inflamación, activa la coagulación y produce el factor inhibidor de la migración del macrófago (MIF) y la proteína del cuadro de alta movilidad 1 (HMGB1), citosinas que potencian la inflamación. El LPS, el ácido lipoteicoico (LTA) y otros patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos interactúan con receptores del tipo toUCTLR y otros receptores, para activar la inflamación y la producción de citosinas pro-inflamatorias. Esto acompaña a la septicemia, coagulación intravascular diseminada, IL (interleucina) SRIS (síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica) y TNF- α (factor de necrosis tumoral α) como se muestra en la figura 3.

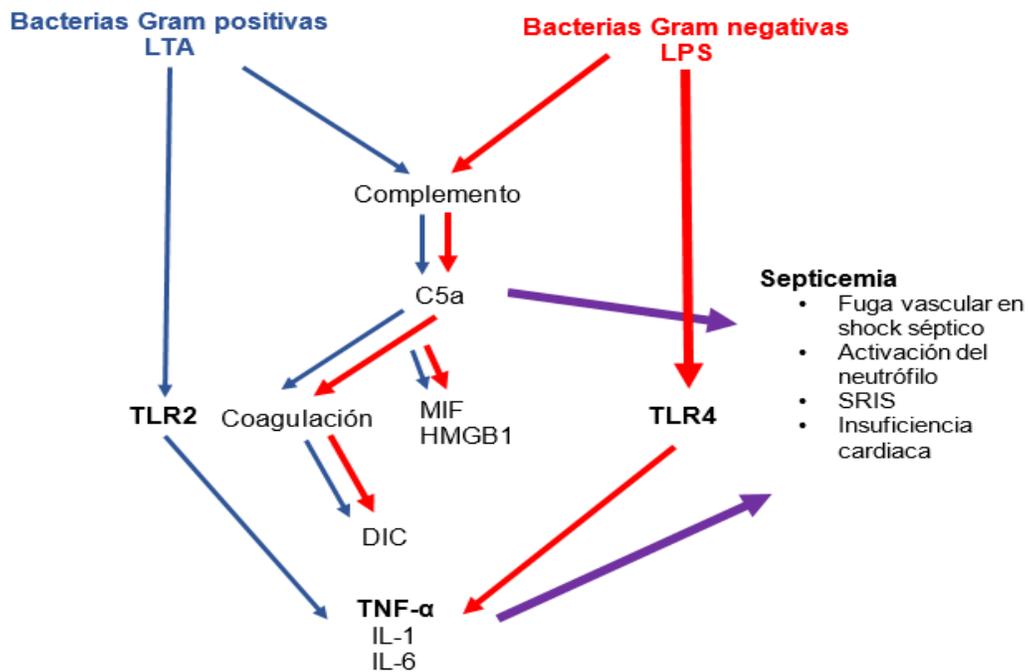


Figura 3. Las bacterias Gram positivas y Gram negativas induciendo septicemia por vías compartidas y separadas. Tomado de Microbiología médica de Murray, 2014.

Cada una de las bacterias tienen diferentes mecanismos para infectar y crear enfermedad, estas involucran destrucción directa de los tejidos, algunas otras liberan toxinas que se diseminan mediante la sangre para producir una patología sistémica.

La estructura de la superficie de dichas bacterias estimula la respuesta del hospedero el cual genera una fase aguda donde se genera la interleucina 1(IL-1), IL-6 y factor de necrosis tumoral los cuales suelen ser protectores, aunque en algunas ocasiones contribuyen con la enfermedad. La enfermedad se produce como consecuencia de la combinación de las lesiones ocasionadas por las bacterias y las secuelas de la respuesta innata e inmunitaria frente a la infección.

3.2.1 Mecanismos de virulencia de los cocos Gram positivos, catalasa negativa.

- Adherencia: Una vez que las bacterias penetran en el organismo, se adhieren a las células de un tejido mediante moléculas de superficie del patógeno denominadas adhesinas o ligandos que se unen a receptores complementarios de ciertos tejidos del hospedero.
- Invasión (internalización): Proceso por el cual un microorganismo penetra el citoplasma de células no fagocíticas (células epiteliales o endoteliales), se replica dentro de estas, se propaga a células adyacentes y destruye las células.
- Toxinas: Moléculas que alteran el metabolismo, la fisiología o la estructura de células de huésped. Pueden ser estructurales (endotoxinas) o secretables (exotoxinas). El modo de acción depende de cada una de ellas. La mayoría de las toxinas actúan en conjunto y con ayuda de enzimas extracelulares.
- Proteínas citotóxicas: Proteínas segregadas de un organismo que forma poros y se extienden por la membrana de las células diana para destruirlas. Este hecho contrasta con las porinas y las proteínas transportadoras de la membrana que funcionan en el interior del organismo sintetizador y las proteínas inmunitarias del complemento.

- Superantígeno: Son proteínas bacterianas y virales con capacidad de estimular gran cantidad de células T, se unen a MHC-II de la célula presentadora de antígeno por lo que desencadena enfermedades sistémicas leves, intoxicaciones alimentarias, enfermedades severas como el síndrome de shock tóxico, enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y la encefalomiелitis (Cortez, 1997).
- Cápsula: Es una estructura de polisacáridos o ácido hialurónico que protege a la bacteria frente a la respuesta inmunitaria y fagocítica, esta se adhiere al tejido conectivo humano para enmascarar a la bacteria y evitar el reconocimiento del sistema inmune (Murray *et. al* 2014).

Las defensas microbianas frente a los mecanismos inmunológicos del hospedero son:

- Producción de proteasa anti-inmunoglobulinas.
- Destrucción de los fagocitos.
- Inhibición de la quimiotaxis.
- Inhibición de la fagocitosis.
- Inhibición de la fusión fagolisosómica.
- Resistencia a las enzimas lisosomales.
- Replicación intracelular

En los *Streptococcus spp.*, principalmente *Streptococcus pyogenes* las exotoxinas se presentan como factor de virulencia.

Las características de las exotoxinas son:

- Excretadas por células vivas; concentración elevada en medio líquido.
- Relativamente inestables; sus efectos nocivos suelen destruirse rápidamente calentándose a más de 60°C.
- Muy antigénicas; estimulan la formación de una concentración abundante de antitoxinas la cual neutraliza a la toxina.

- Existe la posibilidad de convertirse en toxoide antigénico o ser altamente tóxica.
- Se une con receptores específicos en las células y no causa fiebre al hospedero lo que lleva a una reacción asintomática.
- Con frecuencia son reguladas por genes extra cromosómicos.

3.2.2. *Streptococcus* β -hemolíticos de los grupos C y G

Streptococcus dysgalactiae subespecie *equisimilis* se encuentra como comensal en nasofaringe, piel, tracto urinario y digestivo, estos sitios sirven como entrada de las infecciones invasivas. Sus factores de virulencia son similares a otras especies de este mismo género tales como adhesinas, toxinas y factores para difusión en los tejidos humanos y para la interferencia con las respuestas inmunes del huésped (Navarro *et. al* 2014).

Comparte una similitud en su genoma con *Streptococcus pyogenes* (hasta 63%) en relación con su virulencia. Dentro de los cuales se encuentran estreptolisina O y S, superantígenos (SpeA, SpeC, SpeM) e inactivadores de complemento (C5a peptidasa y estreptoquinasa). Recientemente se ha descrito la presencia de una bacteriocina, que estaría dirigida *contra S. pyogenes*, otorgándole una ventaja ecológica a *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis* en el hospedero (Pantoja *et. al* 2014).

3.2.3. *Streptococcus agalactiae*

La infección por GBS (*Streptococcus* del grupo B) necesita la combinación de diversos factores tanto del hospedero como del microorganismo, principalmente la cápsula de polisacáridos donde se pueden observar diversas proteínas en la superficie unidas a la fibronectina, la fracción de ácido siálico se enlaza con el factor H sérico el cual acelera la degradación del compuesto C3b antes de poder actuar en la superficie de la bacteria. Esto hace que la opsonofagocitosis no se lleve a cabo adecuadamente, por lo tanto, será necesaria la activación de la vía clásica mediante

anticuerpos específicos. Los recién nacidos requieren este tipo de anticuerpo de la madre como el IgG transplacentaria. *Streptococcus agalactiae* también produce peptidasa que inactiva a C5a, el principal quimiotrayente para los polimorfonucleares (Sherris *et. al* 2011). La infección de los fetos lactantes se transmite de madre a hijo, intrauterino o durante el parto, dentro del hospital por la mala higiene de las manos del personal intrahospitalario o la madre. La infección en adultos no es clara pero es probable que implique aislamientos endógenos que ingresan a sitios estériles (Bailey y Scott *et. al* 2009).

3.2.4. *Streptococcus pyogenes*

El único reservorio conocido para *Streptococcus pyogenes* es la piel y las mucosas del ser humano el cual lleva una presión selectiva de fuerzas inmunes, el portador de dicho microorganismo tiende a perder su virulencia (**proteína M**), sin embargo, las cepas endémicas transmitida de persona a persona, mantiene su proteína muy elevada y eso los lleva mantener una virulencia muy alta (Quentin, 1988).

Los mecanismos de virulencia de estreptococos del grupo A dependen de diversos factores que confieren su estructura. Los ácidos lipoteicoicos integrales son los primeros en adherirse a las células epiteliales faríngeas junto con otras adhesinas de fibronectina, como la proteína F1 (Sfbl, proteína fijadora de fibronectina) y las proteínas F2 (SbfII). Las proteínas FPB54 y PFBP junto con la proteína M confieren la adherencia a las células cutáneas y faríngeas, aunque a su vez la proteína M se encarga de algunas otras funciones para su virulencia tales como, adherencia a los queratinocitos de la piel a través de la interacción de cofactor CD46 de la membrana de los mismos. Presenta una cápsula de ácido hialurónico la cual al interactuar con la proteína M invade tejidos blandos.

La **proteína M** es el principal factor de virulencia, promueve la destrucción de los leucocitos polimorfonucleares, en la opsonización mediante la vía alternativa del complemento, forma complejos con fibrinógeno el cual se une a integrinas β_2 de los neutrófilos, este fenómeno lleva a la liberación de mediadores inflamatorios que inducen pérdida vascular, la súper familia de genes *emm* en contribución con la

proteína M ayudan en la resistencia a la fagocitosis y puede unirse a varias proteínas del huésped como plasminógenos y fibrinógenos los cuales ejercen efectos antiopsonicos. El factor de opacidad (**OF**) es una α -lipoproteinasa y se asocia a cepas aisladas de infecciones de la piel, así como la tipificación de 29 tipos M.

Los estreptococos del grupo A producen dos hemolisinas: estreptolisina O y estreptolisina S. La estreptolisina O (SLO) es tóxica para distintos tipos celulares entre ellos los leucocitos, monocitos y células en cultivo así como la β -hemólisis en el agar sangre, produce la formación de poros en la membrana de las células sensibles mediante la fijación inicial de los monómeros de SLO al colesterol de la membrana celular, incide en la lisis osmótica de la célula afectada y la degranulación de los leucocitos polimorfonucleares, inhibe la fagocitosis por los macrófagos, deteriora la respuesta de los linfocitos a los mitógenos y estimula la producción de citosinas. La estreptolisina S (SLS) requiere hierro para una producción máxima, interactúa con los fosfolípidos de la membrana para ejercer sus efectos tóxicos, los eritrocitos expuestos sufren edema, seguido de lisis debido a la interrupción de la barrera osmótica y la pérdida de iones de la célula, daña la membrana de los polimorfonucleares, las plaquetas y los órganos subcelulares internos.

Las exotoxinas pirógenas estreptocócicas (SPE) son responsables de la erupción escarlatina; los superantígenos son moléculas capaces de inducir proliferación de los linfocitos T del huésped, los cuales conducen a la liberación de citosinas por los monocitos y los linfocitos humanos, donde incluyen el factor de necrosis tumoral- α , interleucina 1β y mediadores de las células T.

3.3. PATOLOGÍAS

3.3.1. Estreptococos del grupo C y G

Las diversas especies de este grupo son principalmente biota normal o reservorio de animales, aunque es importante en infecciones humanas. *Streptococcus dysgalactiae* es la más frecuente de este grupo causando infecciones en humanos, ha sido aislada de la faringe de portadores y en personas con faringitis y amigdalitis supurativas. También presenta infecciones en adultos y niños en las cuales incluye sepsis en huéspedes neutropénicos, sepsis puerperal, celulitis, fascitis necrosante, neumonía, epiglotitis, empiema, bacteriemia, meningitis, absceso encefálico, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, endoftalmítis, abscesos intraabdominales, sepsis relacionada con catéter y meningitis (no con frecuencia), las personas con este tipo de infección se encuentran subyacentes a una enfermedad previa o sistema inmunosuprimido.

Se han presentado casos de brotes de faringitis causada por *Streptococcus equi* subespecie *zooepidermicus*, una vez rastreado se asume al consumo de leche de vaca no pasteurizada y queso casero en el cual se presenta el microorganismo. *Streptococcus equi* subespecie *equi* se presenta causando infecciones en caballos, principalmente infecciones respiratorias, no es muy común, aunque el humano puede llegar a infectarse por contacto directo de dicho animal infectado, causando meningitis o bacteriemia (Koneman *et. al* 2006).

3.3.2 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae, fue descrito como patógeno en humanos en 1935 por Fry en 3 casos de fiebre puerperal, se encuentra normalmente en el intestino delgado de los humanos, es destruido por la bilis, debido a esto no pasa a otra parte del cuerpo, sin embargo, algunas veces la destrucción no funciona y llega a colonizar el intestino grueso y el recto. En muchas ocasiones por cercanía del recto puede encontrarse en el tracto urinario y/o vaginal en el caso de las mujeres.

Esta bacteria, no causa trastorno si se mantiene en un cierto número, al menos que se presente un desequilibrio en la flora bacteriana, puede causar infección. Es de suma importancia en mujeres embarazadas por el riesgo de contagio a sus hijos a través del canal del parto. Este microorganismo puede quedarse en la piel del recién nacido sin causar daño, pero existe el riesgo de que pase a sus pulmones y pueda causar una grave sepsis neonatal en forma de neumonía. Los factores de riesgo que predisponen la infección a los neonatos son diversos, entre ellas el nacimiento prematuro, fiebre durante el parto ($>38^{\circ}\text{C}$), haber tenido un hijo anterior con infección por *Streptococcus agalactiae*, la presencia de bacteriuria durante el embarazo causada por este microorganismo y con mayor incidencia en los nacidos de gestantes que presentan un bajo título de anticuerpos frente al colonizante de EGB (Fraile y Cueto *et. al* 2000).

La infección en recién nacido y lactantes se asocia con la ruptura de la membrana materna y la falta de anticuerpos maternos contra estos antígenos. Las infecciones se presentan con problemas multisistémicos en las cuales incluyen sepsis, fiebre, meningitis, dificultad respiratoria, letargo e hipotensión (Bailey *et. al* 2009). Las infecciones por estreptococos del grupo B son causadas por algunos serotipos específicos; los serotipos **Ia**, **Ib**, **II**, **III** y **V** predominan en aislado vaginales relacionados con los aislamientos clínicos de los pacientes. El serotipo **III** con un 60% se ha recuperado de aislados de sepsis neonatal y con un 80% en lactantes con meningitis lo que indica el serotipo con mayor virulencia. La transmisión sexual es controversial, aunque se han documentado casos con relación a gonorrea, así como de aislamientos de cultivos de fauces y genitales masculinos.

La infección por estreptococos del grupo B se puede clasificar en dos grupos:

- 1.- Enfermedad de inicio temprano, ocurre con una incidencia de 0.7 a 3.7 de 1000 nacidos vivos y se asocia con la adquisición intrauterina o perinatal del microorganismo. El inicio de la enfermedad ocurre durante los primeros 5 días de vida y durante las primeras 12 a 20 horas después del nacimiento.
- 2.- Enfermedad de inicio tardío, ocurre con una incidencia de 0.5 a 1.8 de 1000 nacidos vivos y se vuelve evidente 7 días a 3 meses después del nacimiento, estas

infecciones se adquieren a partir del canal del parto o adquisición pos natal (Koneman *et. al* 2006).

3.3.3. *Streptococcus pyogenes*

Los seres humanos son el reservorio natural de los *Streptococcus pyogenes* y es transmitido de persona a persona mediante gotitas de flügge. Es uno de los principales patógenos para el hombre por la generación de una gran variedad de toxinas que producen un espectro extenso de lesiones y secuelas (Quentin, 1988). Los estreptococos del grupo A causan infecciones de diversa magnitud, lo que abarca desde procesos sin complicaciones a enfermedades invasivas graves (Arri *et. al* 2008). El material péptidoglucano tiene la función de inducir la fiebre, necrosis dérmica y cardíaca en animales, lisis de eritrocitos y plaquetas. Las infecciones por *Streptococcus pyogenes* pueden clasificarse en infecciones supurativas (producción de la exotoxina conocida como Spe) y secuelas no supurativas (Nizet *et. al* 2010).

3.3.3.1. Faringitis

La infección más frecuente causada por estreptococo del grupo A, se observa en niños de edad escolar (5 a 15 años). Luego de un periodo de incubación de 2 a 4 días, inicia con fiebre, odinofagia, cefalea, malestar general y dolor abdominal, la pared posterior de la faringe inflamada y tumefacta con exudado blanco en las amígdalas. El lactante es muy susceptible a la infección una vez desaparecido el anticuerpo anti M derivado de la madre. Las complicaciones de esta infección pueden ser supurativas (absceso periamigdalino, absceso retrofaríngeo, adenitis cervical supurada, otitis media, sinusitis, mastoiditis, bacteriemia), no supurativas (fiebre reumática aguda y crónica y glomerulonefritis) o mediadas por toxinas (síndrome similar al shock tóxico).

3.3.3.2. Impétigo

Es una infección cutánea con aparición de lesiones vesiculares que evolucionan a pústulas, las cuales se abren en los 5 a 7 días para formar costras gruesas. Se observan en los miembros inferiores, puede involucrar a *Staphylococcus aureus*, puede llegar a generar una cepa nefritógena originando una glomerulonefritis post-estreptocócica.

3.3.3.3. Erisipela

Infección asociada con la afectación de los tejidos blandos y los linfáticos cutáneos conduciendo a una infección sistémica, que incluye fiebre. Las lesiones se presentan con edema y eritema que se propaga con rapidez, se localiza sobre el rostro y suele estar asociada con una faringitis estreptocócica.

3.3.3.4. Celulitis

Infección resultada de lesiones previas de heridas, quemaduras o incisiones quirúrgicas; se presenta como un proceso inflamatorio que se propaga y afecta grandes áreas de la piel y los tejidos subcutáneos, junto con fiebre, escalofríos, linfagitis y en ocasiones bacteriemia.

3.3.3.5. Sepsis puerperal

Se presenta en mujeres después de un parto o aborto, invaden los genitales internos causando endometriosis, linfagitis, bacteriemia, fascitis necrosante y síndrome de shock tóxico estreptocócico, pueden llegar a complicarse con celulitis pelviana, peritonitis, y formación de abscesos. Existe la posibilidad de una infección intraparto lo que puede generar muerte en el neonato.

3.3.3.6. Fiebre reumática aguda

Asociada con una faringitis previa, es una colagenopatía multisistémica generadora de carditis, poliartritis, nódulos subcutáneos, eritema marginado, y corea, que comienza después de 2 a 5 semanas después de la faringitis. La patología cardíaca afecta el endocardio, el miocardio, el pericardio, cardiomegalia, insuficiencia

cardíaca congestiva y en algunas ocasiones paro cardíaco intratable y muerte. En general la artritis afecta múltiples articulaciones (tobillo, rodilla, codos y muñecas) la cual se resuelve de forma espontánea. La corea es una manifestación neurológica caracterizada por espasmos musculares, falta de coordinación y debilidad muscular que aparecen durante la fiebre reumática o después de varios meses. Se ha demostrado que los tipos M de estreptococos del grupo A, que abarcan los tipos **M1, M3, M5, M16, M18, M19 y M24** son reumatógenos. Los epítomos de estos tipos M comparten determinantes de antigenicidad con el músculo cardíaco, las proteínas de la membrana del sarcoma y las membranas sinoviales. Se han demostrado reacciones inmunitarias similares entre antígeno polisacárido de los estreptococos del grupo A y algunas glicoproteínas de las válvulas cardíacas, entre el ácido hialurónico de los estreptococos (material capsular) y el ácido hialurónico del humano y entre las membranas de las células estreptocócicas y los nucléolos neuronales en el sistema nervioso central humano.

3.3.3.7. Glomerulonefritis aguda

Enfermedad inflamatoria del glomérulo renal que se asocia con lesiones glomerulares difusas, hipertensión, hematuria y proteinuria. Este padecimiento se presenta 10 días después de una faringitis y después de 3 a 6 semanas de infecciones cutáneas; se caracteriza por malestar general, debilidad, anorexia, cefalea, edema y congestión circulatoria. Los hallazgos del laboratorio son anemia, eritrosedimentación elevada, disminución de C3 y del complemento total. Las proteínas **M2, M49, M55, M57, M59, M60 y M61** están asociadas a glomerulonefritis por infección cutánea y los tipos **M1, M4, M12, y M25** están implicadas después de una infección faríngea. Se han presentado reacciones cruzadas entre cepas nefritógenas de estreptococos del grupo A y tejidos renales, esto puede deberse al depósito de inmunocomplejos preformados que contienen antígenos estreptocócicos y anticuerpos del huésped en los tejidos glomerulares.

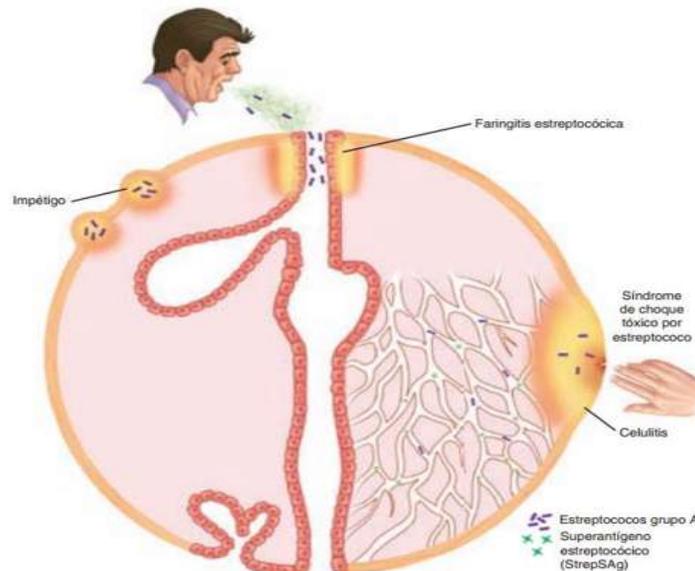


Figura 4. Enfermedades por *Streptococcus pyogenes*. Las infecciones se generan por gotitas respiratorias o contacto directo con la piel. El impétigo es producido por traumatismos menores, como picaduras de insectos, en piel colonizada de manera transitoria. En el choque tóxico por estreptococos, los GAS productores de StrepSAg en una lesión superficial se propagan al torrente sanguíneo. La toxina como la bacteria circula en la sangre. Tomada de Sherris *et. al*/2011.

3.4 Vacunas contra *Streptococcus spp.*

3.4.1. Vacuna contra *Streptococcus agalactiae*

Es una alternativa contra las infecciones antes del parto en mujeres embarazadas la cual protegerá al recién nacido al comienzo precoz y frente a infección tardía, así como a los adultos susceptibles, dicha vacuna debe de tener una adecuada respuesta inmune. Se aplicará la vacuna a las embarazadas en la semana 28 de gestación, vacuna trivalente (serotipos **Ia**, **Ib** y **III**) (Oster 2015). Actualmente no se utiliza en México.

3.4.2. Vacuna contra *Streptococcus pyogenes*

Actualmente no existe una vacuna que permita prevenir las enfermedades causadas por *Streptococcus pyogenes*, hasta estos momentos para combatir dicho patógeno solo se utilizan antibióticos, que, así como benefician puede afectar al ser humano ya que en su defecto existe la posibilidad de crear resistencia y eliminación de microorganismos beneficiosos para para el paciente.

Se pretende realizar una vacuna contra *Streptococcus pyogenes* que entregue una solución eficaz, segura y de bajo costo contra este patógeno. Estará formada por una mezcla de clones de *Lactococcus lactis* que expresa el inmunógeno más potente de esta patógeno, la proteína M, esta vacuna permitirá proteger a los individuos. La vacuna inducirá la actividad de células especializadas del sistema inmune que ayudan a eliminar y prevenir la infección por *Streptococcus pyogenes*. El mecanismo inmunológico en el que se basa esta vacuna intranasal integra los tipos de proteína M de mayor prevalencia, induciendo la actividad del sistema inmune (Wozniak, 2014).

3.5. RESISTENCIA MICROBIANA

La resistencia bacteriana es la capacidad que tienen las bacterias de soportar los efectos de los antibióticos destinados a eliminarlas o controlarla. La base del desarrollo de la resistencia bacteriana está en la selección de cepas que producen ciertas concentraciones de antibióticos. El antibiótico no induce la resistencia, solamente selecciona al microorganismo, produce una interferencia en el proceso natural de dicho antibiótico o resistencia mediante diversos mecanismos a las concentraciones presentes del antibiótico destinado para actuar en el sitio de lesión. La resistencia de una bacteria se diferencia dependiendo de su morfología o sus procesos bioquímicos y metabólicos. La susceptibilidad de un microorganismo está basada en las concentraciones del antibiótico que el agente causal es capaz de resistir mediante diversos mecanismos. Existen dos tipos de resistencia microbiana, natural y adquirida, la adquirida tiene un proceso de mutación genética en la bacteria

donde se lleva a cabo una transferencia de material genético de otra bacteria (Errecalde, 2004).

Los principales mecanismos de la resistencia bacteriana son:

- A. Exclusión de la célula bacteriana como resultado de la impermeabilidad o salida activa.
- B. Alteración de un blanco antimicrobiano que lo vuelven no susceptibles.
- C. Inactivación del fármaco antimicrobiano por enzima producida por el microorganismo como se observa en la figura 5.

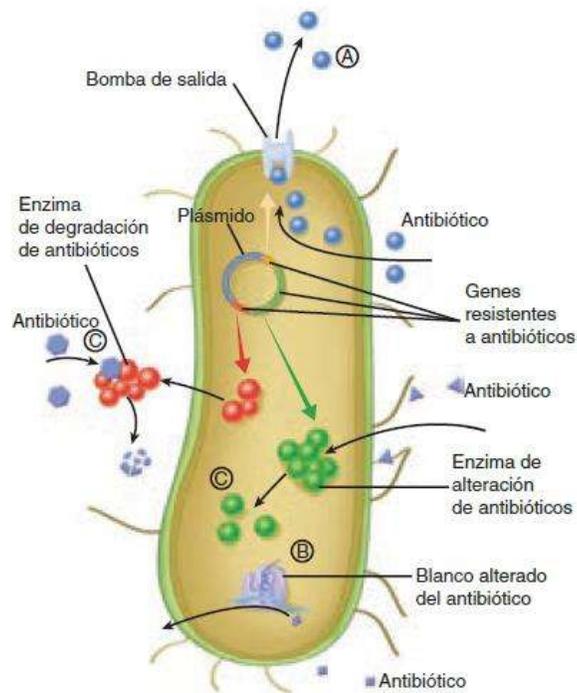


Figura 5. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. **A.** Barrera de exclusión. **B.** Blanco alterado. **C.** desactivación enzimática (Sherris *et. al* 2011).

3.5.1. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae sigue siendo susceptible a penicilina, pero se han presentado cepas resistentes a los macrólidos, el mecanismo de resistencia es mediante una metilasa ribosómica (erm A o erm B), aunque algunas cepas pueden

presentar resistencia a través de un mecanismo de expulsión activa ya sea aislado o combinado con la metilasa (Koneman *et. al* 2006).

3.5.2 *Streptococcus pyogenes*

La identificación de *Streptococcus pyogenes* se realiza para asignar un tratamiento que evite el riesgo de aparición de las secuelas supurativas y las no supurativas. El tratamiento de elección es la penicilina, sin embargo, en una alergia comprobable a las penicilinas se debe elegir otro antibiótico que no pertenezca a la familia de los β -lactámicos. Además, desde 1958, se han publicado numerosos estudios que constatan un cierto porcentaje de fracasos terapéuticos en los tratamientos con penicilina, que oscila entre 8 a 20%. La causa no es la resistencia de *Streptococcus pyogenes*, se atribuye a diversos factores ajenos a dicho microorganismo tales como:

- La presencia de bacterias productoras de β -lactamasas que colonizan la zona afectada así destruyendo el antibiótico e interrumpiendo su acción sobre el estreptococo.
- Teoría de la tolerancia a la penicilina, considerado como tipo de resistencia en la que la acción del antibiótico esta retardada, dando lugar a que se comporte como un antibiótico bacteriostático antes que bactericida.
- Ausencia del cumplimiento terapéutico por parte del paciente, por la desaparición de los síntomas.

Efecto inóculo. Se refiere a la manera en que influye el tamaño del inóculo bacteriano sobre la actividad antimicrobiana (MIC, MBC, velocidad bactericida, duración EPA) este efecto es más prominente con el uso de beta lactámicos que con el uso de aminoglucósidos y fluoroquinolonas.

- Estado de portador de *Streptococcus pyogenes*. La erradicación de este estado es más difícil que la enfermedad ya que dicho pacientes con faringitis asintomáticos tienen evidencia serológica de la infección.
- Teoría de la supervivencia bacteriana (Neeman *et. al* 1998), asume la persistencia de la bacteria dentro de la célula evitando la acción del antibiótico.

Una alternativa a dichos fracasos y principalmente la alergia a las penicilinas son los macrólidos (Eritromicina), sin embargo, *Streptococcus pyogenes* si genera un mecanismo para la resistencia de macrólidos que adquiere a través de plásmidos y trasposones portadores de uno de los genes *erm* (erythromycin ribosomal methylase) que codifica una metilasa induciendo un cambio conformacional que impide llegar al lugar del sitio de acción tanto de los macrólidos como de la lincosamida y estreptograminas B, este fenómeno se le denomina resistencia MLS_B.

La resistencia a macrólidos oscila entre 10 y 20% según su área geográfica. El material péptidoglucano tiene la capacidad de aumentar la resistencia inespecífica. En 1996 se identificó en mecanismo, que consiste en un sistema de expulsión activa codificada por el gen *mef* (macrolide efflux) que expulsa selectivamente a los macrólidos de 14 y 15 átomos, pero no a los de 16 y las lincosamidas (Aracil *et. al* 2012).

3.6. EPIDEMIOLOGÍA

La NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-017-SSA2-2012, PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA, tiene en consideración que toda persona tiene derecho a la protección de salud. Que la vigilancia epidemiológica debe de afrontar los desafíos en salud pública, con un paradigma metodológico moderno. En México algunos de los padecimientos por estreptococos que se encuentran dentro de la vigilancia epidemiológica son: neumonía, faringitis y erisipela.



Gráfica 1. Comparación de las defunciones anuales causadas por los principales patógenos (Tomada de OMS, 2017).

La tuberculosis es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, en el 2015, 10.4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.8 millones murieron por esta enfermedad, entre ellos 0.4 millones de personas con VIH (OMS, 2017).

La neumonía se encuentra en segundo lugar como causante de mortalidad, con un 15% de todas las defunciones de menores de 5 años. Tiene mayor prevalencia en el África subsahariana y Asia meridional. Es causada por diversos agentes infecciosos como virus, bacterias y hongos, siendo los más comunes, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, virus sincitial respiratorio y *Pneumocystis jirovecii* (OMS, 2017).

En tercer lugar, se encuentran 940 000 defunciones por VIH. Cada año el número de caso de infección por VIH ha seguido en aumento con un aproximado de 1.8 millones de nuevas infecciones. El 54% de adultos y 43% de los niños infectados están en tratamiento antirretrovírico de por vida.

3.6.1 *Streptococcus pyogenes*

Forma parte de los principales patógenos para el ser humano, es raro que integre la flora normal por lo que debe considerarse clínicamente importante siempre que se encuentre. Los niños en edades entre 5 y 3 años son los que padecen más de esta infección y suelen ser infectados por portadores asintomáticos que se encuentran en el ambiente, la infección por faringoamigdalitis es la principal infección por este patógeno, pero no es la única que suele presentarse y debe buscarse exhaustivamente el foco de infección y erradicarlo. En estos casos los niños deben ser tratados de manera adecuada para que no pueda generar una infección post-estreptocócica como fiebre reumática. Las infecciones por *Streptococcus pyogenes* son muy variadas.

En Estados Unidos se ha reportado una tasa anual de unos 3.5 casos por 100 000 habitantes, lo que conduce a más de 9600 casos y 1100 a 1300 muertes por año. La cantidad de casos y fallecimientos por este microorganismo depende del padecimiento que se halla presentado. En las últimas 2 décadas, gracias al programa de vigilancia avalado por la unión europea (Euro-STREP) se ha detectado un incremento progresivo de los casos graves producidos por este microorganismo. La importancia radica en que, pese a tratarse de una infección poco común que se presenta con una incidencia más o menos estable entre países del norte de Europa de entre 3 y 4 casos/100 000 habitantes, afecta a pacientes que con frecuencia estaban previamente sanos y en los que se produce un deterioro muy rápido de la condición clínica. Se estima una mortalidad de entre 10 y 20% de los casos (Almazán A. *et. al* 2012).

La carga global de las enfermedades causadas por *Streptococcus pyogenes* no es conocida con exactitud debido a la escasa vigilancia epidemiológica en la mayoría de los países. Con los datos disponibles y basados en la población general, se estimó que hay por lo menos 517,000 muertes cada año debido a enfermedades graves por este microorganismo como enfermedad reumática cardiaca, glomerulonefritis post-estreptocócica e infecciones invasoras. La prevalencia de infecciones por este patógeno es al menos 18.1 millones de casos, con 1.78

millones de casos nuevos cada año. A nivel mundial es una causa importante de morbilidad y mortalidad (Boletín ISP *et. al* 2013).

La mayor carga se debe a la cardiopatía reumática, con una prevalencia de al menos 15.6 millones de casos, con 282,000 nuevos casos y 223,000 muertes cada año. En el área de infecciones invasivas de estreptococos del grupo A es muy alta, con al menos 663,000 nuevos casos y 163,000 muertes por año. Además, hay más de 111 millones de casos de pioderma por este mismo microorganismo y más de 616 millones de casos incidentes por año de faringitis por GAS. Estos datos ponen en evidencia la necesidad de reforzar las estrategias de control y así poder prevenir y mejorar la calidad de los datos de los países en desarrollo (Caratetis *et. al* 2005).

En México en el 2000 se reportó un brote por escarlatina donde se obtuvieron 47 aislados sin resistencia a penicilina y otros antibióticos beta-lactámicos (González *et. al* 2002). En un trabajo de Rodríguez y colaboradores publicado en 2016 con 100 cepas de los años 1992 a 1998, provenientes de exudados faríngeos del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, se determinó la susceptibilidad antimicrobiana, con el fin de estimar la prevalencia de los fenotipos de resistencia a los macrólidos a lo que todas las cepas fueron sensibles a los betalactámicos y clindamicina, 16% fueron resistentes a eritromicina y todas correspondieron al fenotipo M.

3.7. MÉTODOS DE CULTIVO E IDENTIFICACIÓN

El tipo de muestra depende de la infección del cual provenga, exudado faríngeo, secreción de herida, LCR, pústulas, esputo, etc. La muestra debe transportarse en las condiciones adecuadas tales como temperatura y medio de transporte para hacer una mejor recuperación y proceso de cultivo.

3.7.1. Métodos de detección directa

Es posible detectar antígenos de varias especies de estreptococos. La detección de *Streptococcus pyogenes* en muestras de fauces se puede detectar mediante

aglutinación de partículas de látex, coaglutinación o ELISA, aunque su especificidad no es precisa, lo que puede generar falsos negativos.

Una técnica utilizada para la detección del género estreptococos es la galería Pastorex Strep, es una prueba comercial el cual nos ayuda a identificar la especie y/o grupo de Lancefield al que pertenece A, B, C, D, F o G. Pastorex Strep es un prueba de aglutinación rápida donde se involucran antisueros homólogos que requieren una extracción previa, dicha extracción se realiza con una solución liofilizada de tampón TRIS, 0.01% de merthiolate y agua destilada.

Procedimiento

- De una cepa joven de 24 horas, en 0.3mL del extracto de la enzima colocar la cantidad de colonias necesarias para turbidez visible.
- Llevar a incubar dicha dilución de 5 a 45 min a temperatura ambiente (18 a 30°C) o 10 a 30 min a 37°C.
- Homogeneizar el reactivo de látex por agitación suave, el cual contiene partículas de látex de inmunoglobulinas de conejo específicas de cada grupo, en suspensión tampón glicina a pH 8.2, 0.02% de timerosal y 0.1% de ázida de sodio.
- En una tarjeta especifica colocar una gota del látex y una gota del extracto.
- Homogeneizar la mezcla con un aplicador de madera.
- Agitar la tarjeta con movimiento orbital por un minuto como máximo.
- Observar la aglutinación.

3.7.2. Tinción Gram

Debe utilizarse un desarrollo en caldo para determinar su morfología celular en caso de que la tinción a partir de un medio solido no sea tan clara, en este caso para estreptococos es necesario realizar una incubación previa en caldo Todd-Hewitt o BHI.

3.7.3. Cultivos

La elección para el cultivo de los estreptococos son los agares con sangre de oveja al 5% y agar chocolate los cuales son estándar en los laboratorios, aunque pueden utilizarse cultivos selectivos como CNA (colistina, ácido nalidíxico) suprime por completo el crecimiento de enterobacterias y *Pseudomonas* spp., y PEA (alcohol feniletílico, "phenylethanol"), inhibe el desarrollo de bacterias Gram negativas y con adición de 5% de sangre de oveja proporciona nutrientes para *Staphylococcus* spp., y *Streptococcus* spp.

Para aislar estreptococos del grupo A de muestras de fauces, el medio más frecuente es agar sangre de oveja al 5% con trimetoprim/sulfametoxazol para inhibir el desarrollo de flora normal, aunque no es muy recomendable ya que a su vez inhibe estreptococos β -hemolíticos del grupo C, F y G. Para una mejor recuperación de estreptococos de grupo de B de exudados vaginales en mujeres embarazadas es recomendable la utilización de caldo Todd-Hewitt con antimicrobianos (gentamicina y ácido nalidíxico o colistina y ácido nalidíxico) para inhibir el desarrollo de flora vaginal después del subcultivo en agar sangre.

Los cultivos en sangre deben incubarse en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂, estas condiciones llevan a una mejor recuperación, principalmente de *Streptococcus pneumoniae* sin dejar de lado al resto de las especies del mismo género aunque la beta hemólisis se puede apreciar mejor en anaerobiosis. Las placas de agar sangre deben ser sembradas por punción con el asa en varias zonas de la misma, las colonias crecen en la profundidad del agar y producir hemolisinas sensibles al oxígeno (estreptolisina O) lo que hace más evidente la beta-hemólisis de dichas bacterias.

3.7.4. Diagnóstico serológico

Los seres humanos con enfermedades por *Streptococcus pyogenes* producen anticuerpos contra varios antígenos. Los más frecuentes son la antiestreptolisina O (ASO), anti-DNasa B, antiestreptocinasa y antihialuronidasa. La infección de faringe

eleva de una manera considerable los títulos de anticuerpos contra todos los antígenos, las infecciones de la piel solo de anti-DNasa. Las pruebas serológicas son de gran importancia para la detección de secuelas sugestivas de fiebre reumática y glomerulonefritis aguda causadas por estreptococos del grupo A, el suero obtenido hasta 2 meses después de la infección habitualmente muestra un aumento de anticuerpo. Un producto comercial utilizado para la detección de anticuerpos es denominado Streptozyme, aunque solo detecta una mezcla de anticuerpos, no todos los presentes.

3.7.5. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos

Para *Streptococcus pyogenes* y otros estreptococos beta hemolíticos, la penicilina sigue siendo el fármaco de elección, en caso de que el paciente sea alérgico comprobable a la penicilina, es necesario realizar el antibiograma correspondiente ya que, la penicilina se sustituye por otros medicamentos como los macrólidos, aminoglucósidos, entre otros (Bailey & Scott, 2004). En contraste con los estreptococos beta-hemolíticos es necesaria la prueba de susceptibilidad *in vitro*, principalmente en casos de meningitis. La prueba de susceptibilidad se lleva a cabo mediante la técnica de Kirby-Bauer que consiste en utilizar una sola concentración de antibiótico y medir el tamaño de la zona de inhibición a partir de un ensayo de sensibilidad de un cultivo bacteriano.

3.7.6 Prueba de bacitracina

Con esta prueba se puede realizar una diferenciación presuntiva de estreptococos beta-hemolíticos de grupo A y otros beta-hemolíticos. Inhibe la síntesis de pared celular bacteriana en su fase temprana en la biosíntesis del péptidoglucano, inhibe la desfosforilación de un pirofosfato lipídico y el reciclado de cientos metabolitos requeridos para mantener la síntesis del péptidoglucano aunque la forma de interacción con la bacteria depende de la especie y es más fácil la interacción con aquellas que carecen de pared celular. La bacitracina es bactericida durante el

crecimiento, ya que las enzimas lipídicas ubicadas en la pared celular abren las cadenas del péptidoglucano para formar extremos libres. La pared celular se rompe y el citoplasma fluye al exterior, sin embargo, es inactiva contra células en reposo (células en su fase estacionaria).

3.7.7. Prueba de Trimetoprima con sulfametoxazol

Inhibe de manera competitiva la modificación bacteriana del ácido p-aminobenzoico en dihidrofolato lo cual impide la síntesis del DNA bacteriano. La combinación de estos antibióticos en una misma placa puede provocar diversas reacciones que ayudan a conocer el mecanismo de acción de dichas bacterias, estos son, sinergismo (bloqueo metabólico doble), suma y antagonismo.

La prueba se realiza en una placa de agar sangre.

1. De una placa de crecimiento joven (crecimiento de 24 horas) tomar de 3 a 4 colonias del estreptococo beta-hemolítico puro y estriar la placa de agar sangre de manera abundante.
2. Con pinzas estériles colocar el sensidisco de 0.04 U de bacitracina y uno de SXT equidistantes.
3. Incubar de 18 a 24 hr, 36°C y 5 a 10 % CO₂, si la prueba es negativa reincubar por 24 hr.

3.7. 8. Prueba CAMP

La prueba ha sido nombrada en honor a quienes descubrieron el fenómeno Christie R, Atkins NE, Munch-Petersen E., en 1944. Determina la capacidad de un microorganismo para producir el factor CAMP, que actúa de manera sinérgica con la β -hemolisina estafilocócica (β -lisina) sobre eritrocitos ovinos o bovinos para producir un fenómeno lítico en la unión de los dos microorganismos. Dicha prueba tiene la finalidad de diferenciar e identificar de manera presuntiva cepas de *Streptococcus agalactiae* de otras especies. Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* principalmente de animales produce una β -lisina la cual posee actividad de

esfingomielinasa (fosfolipasa C) contra eritrocitos del medio hidrolizando, la esfingomielina producida por los mismos.

El factor CAMP es una proteína difusible, extracelular, termoestable, producida por los estreptococos del grupo B, lisa los eritrocitos de los rumiantes tratados con β -hemolisina estafilococica, manifiesta sinergismo específico con la esfingomielina C sobre la sangre de oveja y buey. Su acción depende de una concentración relativamente alta de factor y de una velocidad mas alta de degradación del sustrato causada por dilución de la esfingomielina.

La prueba se realiza en una placa de agar sangre.

- 1.- Cultivar una cepa conocida de *Staphylococcus aureus* previamente.
- 2.- Con el borde de una asa, estriar la cepa de *Staphylococcus aureus* en una línea recta que atravesase el centro de la placa de agar sangre.
- 3.- En la misma placa de agar sangre y perpendicular a la línea de *Staphylococcus aureus*, hacer una línea recta de 2-3 cm de largo del microorganismo desconocido con una asa sin tocar el inóculo de estafilococo.
- 4.- Incubar en jarra con vela para producción de 5-10% de CO₂ a 36°C por 5-6 horas; una prueba positiva se observa con un punta de flecha entre la nodriza de *Staphylococcus aureus* y el estreptococo a identificar, si es negativa continuar incubacion hasta 18 horas.

3.7.9 Prueba de pirrolidonil- β -naftilamida (PYR)

Es un aprueba presuntiva específica para estreptococos β -hemolíticos del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) ya que cuenta con la enzima pirrolidonil- β -naftilamida, es una prueba altamente sensible; reemplaza a la bacitracina y a la tolerancia a la sal, es una característica preliminar de *Streptococcus spp.*, esta prueba por lo regular se realiza junto con la prueba de leucina aminopeptidasa (LAP). El reactivo PYR/LAP es una solución ácida que contiene detergente con una base de Schiff roja con β -naftilamina libre. El sustrato L-pirrolidonil- β -naftilamida es hidrolizado por

la enzima L-piroglutamilamino-peptidasa a L-pirrolidona y β -naftilamina libre, una sustancia incolora. La β -naftilamina reacciona con p-Dimetilaminocinamaldeído (DMACA), actúa como colorante acoplador diazo y forma un color rojo.

Prueba.

A. Caldo PYR

- En tubo con 0.02 mL de caldo Todd-Hewitt colocar la cantidad de colonias necesarias para una turbidez 2 de Mac Farland.
- Incubar a 36°C por 4 horas.
- Después de la incubación, agregar 1 gota del reactivo PYR/LAP sin mezclar.
- Observar el cambio de color después de 2 min.

B. Agar PYR

- En agar con tripticasa soya con sustrato al 0.01%, estriar la cepa problema.
- Incubar
- Después de la incubación agregar 1 gota de PYR/LAP directamente a la superficie del crecimiento de la placa.

C. Tiras reactivas PYR

- Tiras reactivas saturadas con sustrato PYR/LAP
- Colocar tira reactiva en placa Petri y humedecer con agua destilada.
- Con un aplicador tomar varias colonias y frotar sobre la tira de papel.
- Incubar por 10 min. a 35°C.
- Agregar 1 gota del reactivo DMACA directamente a la tira y observar el cambio de color.

3.7.10. Detección de *Streptococcus spp.*, por Biología Molecular

La Biología Molecular es una disciplina científica que tiene como objetivo el estudio de los procesos que se desarrollan en los seres vivos, principalmente al entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula, la relación del ADN con ARN, la síntesis de proteínas, el metabolismo, y como todas

estas interacciones son reguladas para conseguir un correcto funcionamiento de la célula como se muestra en la figura 6 (Carrasco *et. al* 2014).

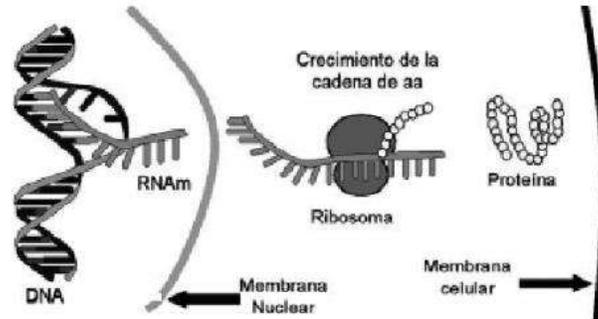


Figura 6. Estudio de los flujos de información genética de una célula. Tomada de Carrasco, 2014.

Las bacterias son microorganismos con capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Su capacidad patógena radica en su base genética que posee información necesaria para colonizar los tejidos del huésped, invalidarlos y/o producir sustancias tóxicas que causaran la enfermedad.

Toda la información genética esencial para la vida de la bacteria está contenida en una molécula de ADN de doble cadena y circular, cerrado por enlace covalente (cromosoma bacteriano) (Betancur *et. al* 2012). Los avances de las ciencias facilitan la caracterización microbiológica de algunas patologías, por ellos se encuentran métodos de identificación como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), hibridación in situ, secuenciación, análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP), entre otros. Dicha identificación permite diseñar mejores estrategias de tratamiento que lleve a la curación de los pacientes y a la implementación de programas de prevención óptimos (Duazary *et. al* 2010).

En método ideal para la identificación de diversos microorganismos, entre ellos *Streptococcus spp.*, es mediante una secuenciación genética del ARNr 16S, permiten establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los microorganismos procariontes. El ARN ribosomal (ARNr) 16S es la macromolécula

más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana propuesta por Carl R. Woese en 1970, pueden caracterizarse en términos de secuencia parcial, mediante el método de catalogación de oligonucleótidos, el ARNr 16S es marcado in vivo, y purificado, los fragmentos generados se separan, posteriormente la secuencia de todos aquellos que incluyan menos seis nucleótidos (nt).

Las características relevantes del ARNr 16S para su utilización como herramienta filogenética y taxonómica son:

1. Ser una molécula muy antigua presente en las bacterias.
2. Su estructura y función ha permanecido constante durante tiempo muy prolongado de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren lento, como para aportar información acerca de todos los procariotas a lo largo de toda la escala evolutiva.
4. El tamaño del ARNr 16S minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S, existen bases de datos amplios, en continuo crecimiento.

Los aspectos morfológicos de la identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S, incluyen tres etapas como se muestra en la figura 7:

- a) Amplificación del gen a partir de una muestra apropiada; se consigue en un termonucleador, PCR. Como sustrato se utiliza ADN purificado a partir de cultivo puro del patógeno, las regiones conservadoras facilitan el diseño de oligonucleótidos iniciadores, se utilizan iniciadores diseñadas en base a secuencias conservadas próximamente a los extremos 5' y 3' del gen, que origina amplicones. Antes de pasar a la siguiente etapa se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa para asegurar la presencia de un único fragmento.
- b) Determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón. Se llevan a cabo las reacciones de secuenciación y el análisis de los productos por electroforesis, se

emplea una secuenciación cíclica similar a la de la amplificación que utiliza un único iniciador por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpirán la síntesis de manera aleatoria, y facilitarán la detección posterior de los fragmentos interrumpidos. La evaluación de los electroferogramas y la alineación de la cadena directa con la reversa, para resolver las posibles discrepancias.

- c) Análisis de la secuencia obtenida con la base de datos de GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), y otras privadas, como MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network System) (Rodicio *et. al* 2004).



Figura 7. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S. Tomado de Rodicio y Mendoza *et. al* 2004.

3.7.11. Método de tipificación por RFLP (Análisis de polimorfismos en los fragmentos de restricción).

Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica son un tipo de polimorfismo que resulta de la variación en la secuencia de ADN reconocida por las enzimas de restricción. Estas son enzimas bacterianas que se utilizan para cortar moléculas de ADN en lugares conocidos. El polimorfismo genético se define como las diferencias genéticas heredadas entre individuos hacia adentro sobre el 1% de población normal, esta técnica ayuda a diferenciar las series de ADN para reconocer y para estudiar la variación intraespecies e interespecies. Las endonucleasas de restricción cortan el ADN en diversos sitios lo cual difiere entre los individuos, por lo tanto, la longitud de los fragmentos del ADN producidos por una endonucleasa de restricción diferirá a través de ambos organismos y especies individuales (Cheriyedath, 2016).

Técnica molecular utilizada para tipificar *Streptococcus pyogenes*, mediante un regulon *vir* que está constituido por genes de proteína M (*emm*), C5a peptidasa (*scpA*), proteínas M-like (*mrp/fcrA*, *enn*) y el gen *vir* R (*mga*). La técnica de tipificación se denomina *Log PCR vir* RFLP, la cual consiste en la amplificación del regulón *vir*, (4 a 7 kb), seguida de la digestión con enzimas de restricción generando patrones de RFLP que son claros y fácilmente evaluables. Los *vir*-RFLP se asocian a un determinado tipo de proteína M.

El método de tipificación de cepas es un método simplificado por Hartas:

- Una asada de *Streptococcus pyogenes* cultivada en agar sangre 5%, suspender en 100µl de NaOH 50mM.
- Incubar a 95°C por 1 min, enseguida enfriar a 4°C.
- Agregar 16 µl de Tris-HCl 1 M, pH 8,0.
- Centrifugar por 2 minutos a 13,000 rpm a 4°C, sobrenadante utilizar para reacción de amplificación.

Para amplificación de *vir* utilizar VUF y SBR que acota una zona comprendida entre 342 pb “rio arriba” del gen *virR* hasta 53 pb dentro del gen *scpA*, generando un

fragmento que fluctúa entre 4 a 7 kb, lo que corresponde al 0.3% del genoma aproximadamente. La mezcla para PCR de 3 µl de ADN templado, 0.5 µl de cada partidor, 1.5 µl de dNTP 10 mM y 1U de Platinum PfxADN polimerasa en buffer 10X Pfx Gibco BRL®. Se utiliza un termociclador Gene Amp PCR System 2400 de Perkin Elmer®; las condiciones de amplificación son: 95°C por 1 min y 30 ciclos de 15 segundos a 95°C, 2 minutos a 58°C y 6 minutos a 68°C. La extensión final a 68°C por 6 minutos y luego 4°C, un volumen de 18 µg del producto de reacción del PCR se recorre por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para verificar la amplificación. Posteriormente 7 µl del amplicón fueron digeridos con 2 U de Hae III Gibco BRL® durante 2 horas a 37°C, los productos de la digestión se separan mediante electroforesis en agarosa al 1.5% a 15 volts durante 20 horas. Se usa como estándar de peso molecular fago lambda cortado con Hind III Promega®. Los fragmentos teñidos con bromuro de etidio se visualizan en un transiluminador Vilber Lourmat y fotografiado con Polaroid 667. Los tamaños de los amplicones y los fragmentos de restricción se calcula mediante un Software (Ulloa *et. al* 2001).

3.8. METODOS DE PRESERVACIÓN

En la actualidad el uso de microorganismos es de suma importancia en el enfrentamiento y solución de diversos problemas en la agricultura y la alimentación, así como en la salud, en busca de nuevas fuentes de energía y la conservación del medio ambiente (Gámez *et. al* 2008). Pues confieren información que es útil al momento de la toma de decisiones, así como una mejor comprensión de su naturaleza y de los procesos infecciosos que causan.

Para considerar una buena conserva de los microorganismos deben cumplir con algunos requerimientos como:

- a) Que sea una cepa pura en el momento de su conservación.
- b) Evitar una contaminación en el momento de preservarla.
- c) Durante el tiempo de conserva deben de sobrevivir al menos 70 al 80% de las células.

d) Las células deben permanecer genéticamente estables.

Los métodos de conservación para microorganismos se agrupan dependiendo del tiempo y características fisiológicas de la cepa en tres grupos:

3.8.1. Método de conservación a largo plazo

Es el mejor método ya que el crecimiento de las células microbianas se paraliza y así se garantiza su estabilidad genética y la aparición de generaciones sucesivas a la cual se le atribuyen dos métodos:

a) Congelación a -70°C

Las células bacterianas se suspenden en un líquido con un agente crioprotector lo que ayuda a que no haya crecimiento, se guarda a temperaturas inferiores a 0°C, sin embargo, presenta algunos inconvenientes, se requieren aparatos especiales y existe el riesgo de un fallo en el equipo al subir la temperatura del equipo.

Hay 4 factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método: edad de las células, velocidad de la congelación y descongelación por lo que el proceso debe ser rápido, para la descongelación debe realizarse a 37°C., la temperatura de almacenamiento debe ser lo más bajo posible y conservarse en tubos cerrados o sellados sumergidos en nitrógeno líquido, que tienen una temperatura de -195°C o congeladores que alcancen una temperatura por debajo de -70°C y deben ser guardados en un material que pueda aguantar la variación de temperaturas, como criotubos que cierren herméticamente, esto evita que las cepas se congelen y descongelen y puedan perderse en ese proceso.

b) Liofilización

No hay crecimiento de las células debido a que se le quita el agua en su totalidad mediante liofilización, la estabilidad genética es alta, pero sin comparación con la congelación ya que la liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células. Es necesario primero congelar en agua libre en las células y enseguida eliminarla mediante vacío sin subir la temperatura, una vez liofilizados pueden

almacenarse o enviar a temperatura ambiente (18 a 20°C) lo que lo hace más cómodo su envío y/o almacenamiento.

Factores que influyen en la eficacia de la liofilización como medio de preservación:

- Tipo de microorganismo, no todos resisten la liofilización y esto debido a la cantidad de agua en su interior.
- Concentración de células, estas deben llegar a 10^3 - 10^9 células/mL en caso de bacterias y en caso de hongos y levaduras una cantidad inferior.
- La temperatura de liofilización no debe subir a -50°C .
- El grado de deshidratación debe ser lo más alto posible.
- Las células liofilizadas deben ser guardadas en tubos cerradas al vacío para evita la rehidratación y el oxígeno que pueda dañar a las células.
- La temperatura debe ser constante y sin bajar de los 0°C .
- Deben ser guardados en la oscuridad.

3.8.2. Métodos de conservación a corto plazo

Se utiliza en el momento de no contar con recursos para realizar una conservación a largo plazo o porque las cepas no resisten a otros métodos de conservación debida a sus características genéticas lo que lleva a que pierdan algunos elementos.

Conservación por transferencia periódica o subcultivo

La cepa se guarda en el medio de cultivo en el que ha crecido, transferir a un medio de cultivo fresco a intervalos que asegure su viabilidad. Los intervalos varían dependiendo de las características de el microorganismo en cuestión, algunas cepas deben ser transferidas en el transcurso de días o semanas y otras de meses o años esto depende de la temperatura del subcultivo, el proceso de subcultivo debe realizarse constante o cuando sea necesario ya que no pueden permanecer en el mismo tubo por mucho tiempo, al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte de las células, por esta razón no es un método garantizado en la estabilidad genética y las

descendencias podrían perder algunas características, así como una contaminación de dicha cepa.

Métodos alternativos

Se engloban métodos en los cuales el microorganismo a conservar no es viable para congelación o liofilización (*Spirillum spp.*, *Rhodospirillum spp.*), los métodos se basan en la paralización del crecimiento de las células.

- **Desecación en papel filtro**, el papel es impregnado con una solución muy densa de las células del microorganismo y se deja secar al aire (en condiciones estériles) o mediante liofilización sin una congelación previa.
- **Desecación en suelo, arena, silicagel, etc.** Se añaden las células a estos sustratos que las protegerán al desecar.
- **Desecación en bolitas de alginato**, las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se realiza por tratamiento con solución hipertónica sucesiva y posterior desecación al aire hasta perder un 70% de agua. Estas bolitas de conserva a temperatura ambiente en tubo hermético.
- **Desecación en sal gorda** para halobacterias, se mezclan las células con sal y se dejan desecar espontáneamente. Debido a la higroscopia de la sal, la desecación no es total, aun así las células dejan de multiplicares.

4. JUSTIFICACIÓN

Los *Streptococcus* spp., son un grupo de cocos Gram positivos que pueden ser Alfa, Beta o Gama hemolíticos y que, debido a la patogenicidad en el ser humano, son causa de padecimientos como faringitis aguda, infecciones cutáneas, sistémicas, sepsis, meningitis en recién nacidos, así como secuelas e infecciones no supurativas siendo estas incapacitantes y también pudiendo complicarse y llegar hasta la defunción del paciente. Los estreptococos beta-hemolíticos, aunque son de notificación inmediata en procesos graves, en muchos de los casos es posible que no se les dé seguimiento o no se soliciten cultivos para el aislamiento de la bacteria. Por lo que es importante la toma de muestras, el aislamiento, la identificación, el estudio, la preservación, así como conocer el comportamiento de las infecciones que causan en las personas, los perfiles de susceptibilidad y los mecanismos que utilizan, por ejemplo, la Proteína M; ya que este tipo de información es nula en el Estado de Michoacán.

5. OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis de los Estreptococos Beta-hemolíticos, aislados en diferentes unidades médicas del estado de Michoacán del año 2011 al 2016.

5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Conocer que especies de *Streptococcus spp.* se han aislado de diferentes procesos infecciosos en pacientes de algunas unidades médicas del estado de Michoacán.
2. Relacionar el tipo de infecciones causadas por las especies de *Streptococcus spp.*, y sus factores de virulencia.
3. Evaluar la efectividad de la preservación a mediano plazo de cepas de *Streptococcus spp.* en Amies con carbón activado ultracongelados a -70°C .
4. Conocer los perfiles de susceptibilidad y resistencia de los aislados y cepas de *Streptococcus spp.*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio que se llevó a cabo es retrospectivo, descriptivo y prospectivo para lo cual se recopilaron los datos de 50 aislados de estreptococos beta-hemolíticos registrados en las bitácoras del Laboratorio de Bacteriología, del Laboratorio Estatal de Salud Pública durante los años 2011 al 2016, también se activaron cepas que fueron enviadas en colaboración al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM a cargo del D.C. Luis Manuel Perea Mejía, para la determinación de los genes de virulencia que codifican para la proteína M durante los años 2012 y 2013, con su debida información; la mayoría aislados en diferentes unidades médicas en muestras de pacientes y algunos de ambiente hospitalario. Los aislados enviados a la UNAM fueron preservados en ultracongelación a menos 70°C inmediatamente después de su aislamiento, y fueron descongelados y activados en el año 2016 para valorar el método de preservación como sigue:

- 1) Se activaron 18 cepas de *Streptococcus spp.*, que estaban en ultra congelación a menos 70°C, se dejaron descongelar a temperatura ambiente por 2 horas, esto con la finalidad de evitar daño a las células.
- 2) Ya descongelado el medio, se suspendió el hisopo en 1mL de solución salina 0.85% y se dejó por un lapso de 10 minutos antes de trabajarlo.
- 3) Se distribuyó el mililitro de solución salina que contenía lo desprendido del hisopo, 0.5 ml se inocularon en una botella de hemocultivo de aerobios, 0.3 ml se pasaron a un caldo Todd-Hewitt para enriquecimiento y favorecer la proliferación y con el resto se sembró una placa de agar sangre.

Cada uno de los medios (hemocultivo, Caldo Todd-Hewitt y el agar sangre) se incubaron en las condiciones necesarias (temperatura de 37°C por 24 horas) para su crecimiento.

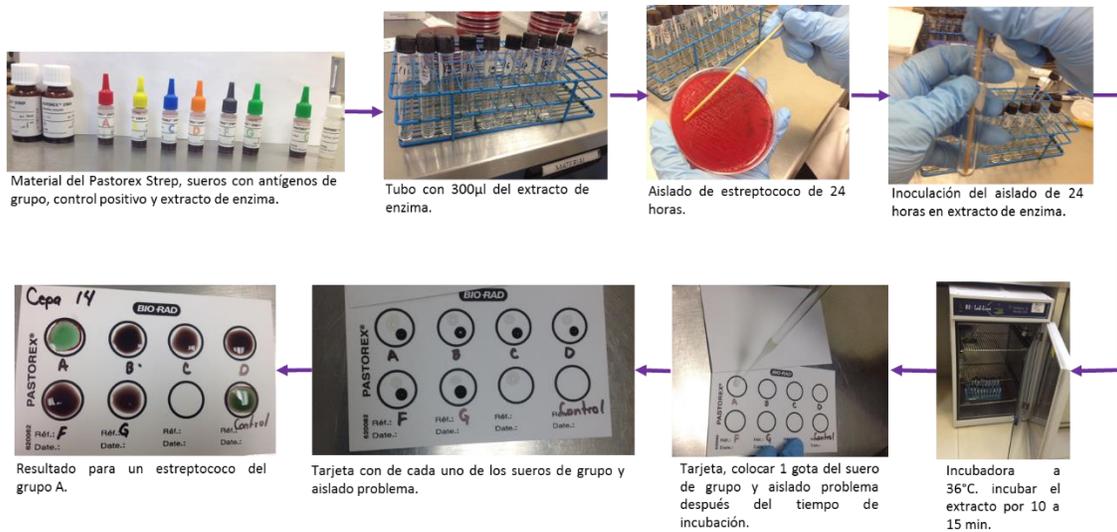
- 4) Pasadas 24 horas de la incubación se observó crecimiento en la totalidad de las placas de agar sangre así como en todas las botellas de hemocultivo y en 8 tubos de caldo Todd-Hewitt.
- 5) Del crecimiento de las placas de agar sangre, a la vez se resembró en otras 3 placas de agar sangre y se llevaron a incubación, en una incubadora Lab-Line IMPERIAL III INCUBATOR a 37°C por 24 horas.
- 6) Una vez que se recuperaron los aislados, las colonias se observaron macroscópicamente para constatar que la morfología correspondía a beta-hemolíticos, también se realizó una tinción Gram para corroborar si se trataba de bacterias Gram positivas, en este caso cocos en cadena, la observación se realizó en un microscopio Karl Zeiss modelo Axiostar
- 7) Ya identificadas como Gram positivas, se realizaron pruebas bioquímicas en un sistema automatizado con el equipo Phoenix™ 100 BD, para ello, de un aislado de 24 horas se tomó la cantidad necesaria para una turbidez de 0.5 McFarland, en un tubo de ID (buffer) y se midió en un turbidímetro, ya que se estandarizó, se pasaron 25µl del contenido del tubo ID a un tubo para antibiograma (ST) del mismo Kit, enseguida cada uno de los tubos se colocaron en un panel del Phoenix 100, enseguida se dio de alta en el equipo como se muestra en la figura 8.

Figura 8. Diagrama del método de utilización del Phoenix™ 100 BD.



- 8) Para realizar una comparación con el equipo, se realizó la prueba de sensibilidad a bacitracina 0.04 UI que es de gran utilidad para diferenciar a *Streptococcus pyogenes* de otros beta-hemolíticos del mismo género por ejemplo *Streptococcus agalactiae*. Cuyos resultados son: cualquier tamaño de un halo de inhibición se lee como una prueba positiva y se interpreta como susceptible, lo que confirma un *Streptococcus pyogenes*, si la prueba no presenta halo de inhibición, la prueba se lee como negativa y se interpreta resistente lo que descarta a *Streptococcus pyogenes*.
- 9) Las cepas se aglutinaron con Pastorex Strep (prueba comercial) para definir el grupo de Lancefield al que pertenecían como se muestra en la figura 9.

Figura 9. Diagrama del método de aglutinación con Pastorex Strep.



En la prueba anterior en un resultado positivo se aprecia aglutinación de la preparación bacteriana con alguno de los sueros, en un resultado negativo no hay aglutinación.

- 10) Se realizó la prueba de CAMP para la identificación presuntiva de estreptococos del grupo B ó *Streptococcus agalactiae*. En una prueba positiva para el factor CAMP aparece como hemólisis en punta de flecha entre la unión de crecimiento de *S. aureus* y el *Streptococcus* del grupo B.

11) Una prueba positiva nos corrobora la identificación de *Streptococcus agalactiae* lo que la diferencia de otros *Streptococcus spp.* beta-hemolíticos como *Streptococcus pyogenes*.

12) Se realizó un antibiograma mediante el método de Kirby-Bauer para conocer la sensibilidad o resistencia a los antibióticos probados (penicilina, eritromicina, clindamicina, levofloxacin, ofloxacin, vancomicina, cefepime, linezolid, tetraciclina y cloranfenicol)

La utilización de estas pruebas de rutina y equipo automatizado nos ayuda a corroborar la viabilidad del método de conservación.

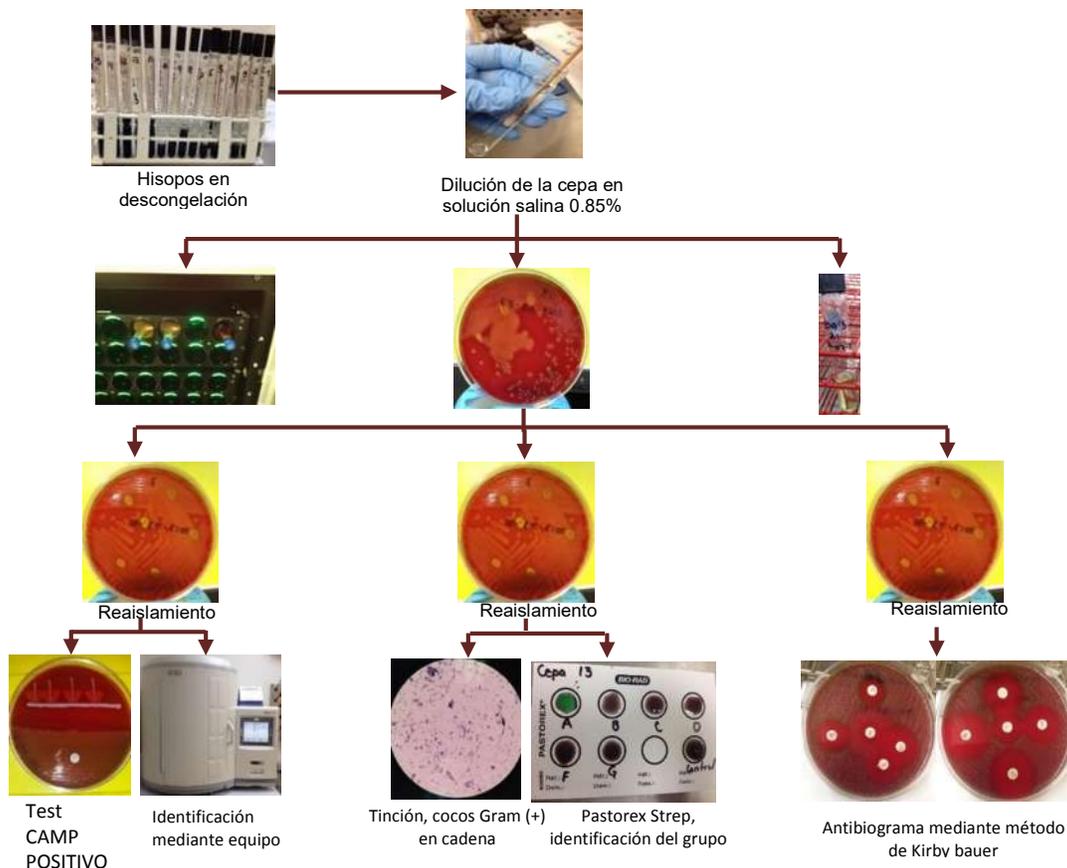
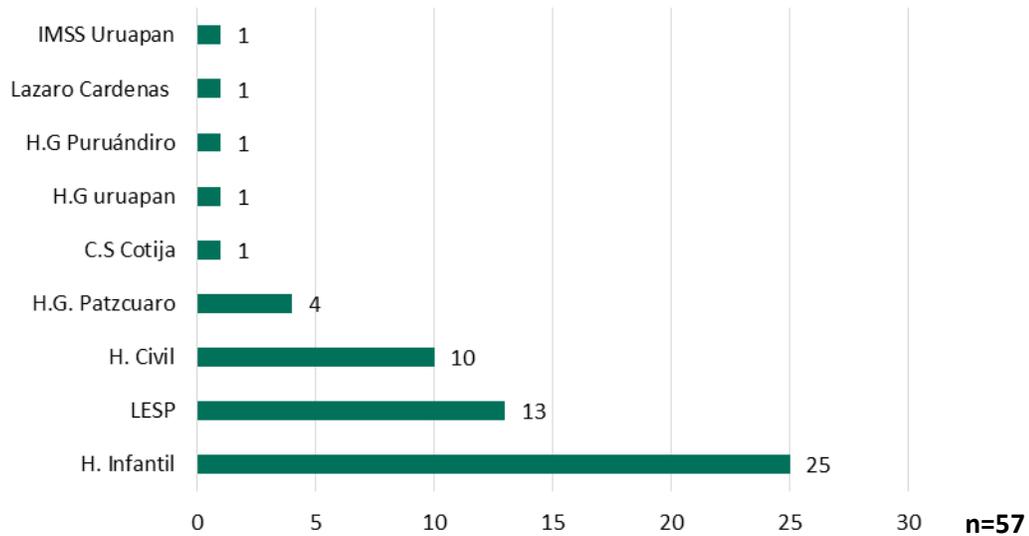


Figura 10. Diagrama de flujo del método para activación de los estreptococos preservados en ultracongelación

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Estreptococos por unidad de procedencia

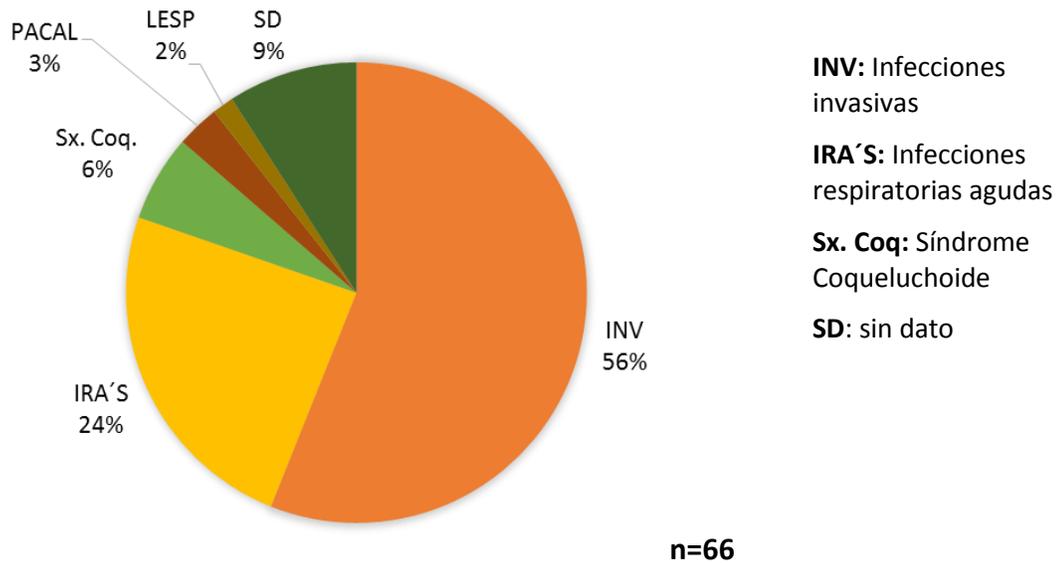
Los datos y cepas utilizados en el presente trabajo se obtuvieron de diferentes procedencias como se puede apreciar en la gráfica 2, la mayoría de ellas de hospitales de concentración en el estado de Michoacán.



Gráfica 2. Del Hospital Infantil de Morelia “Eva Samano de López Mateos” se recuperaron 25 aislados (44.6%), del Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) 13 aislados (23.2%), del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva” 10 aislados (17.8%) y el resto dividido en algunos otros hospitales del estado de Michoacán.

7.2 Estreptococos por fuente de aislamiento

Los aislamientos de *Streptococcus spp.*, son de varios padecimientos principalmente de infecciones invasivas



Gráfica 3. Representación gráfica de la distribución de los *Streptococcus spp.*, por fuente de aislamiento.

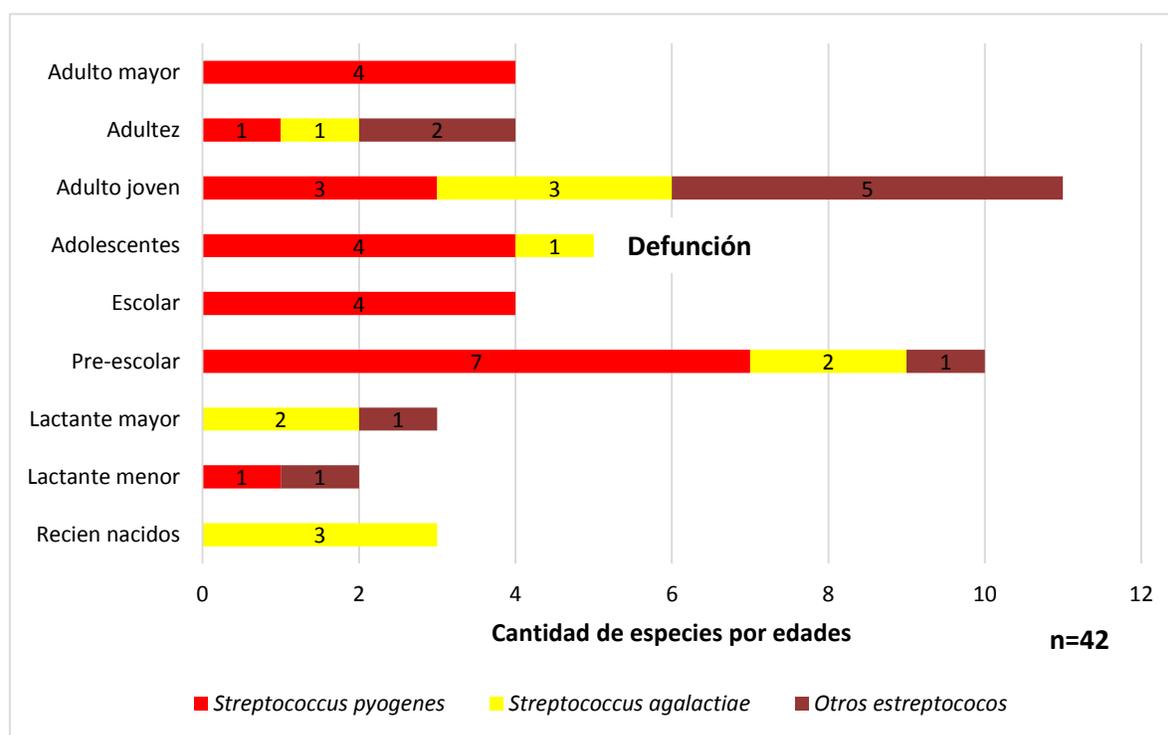
Los *Streptococcus spp.*, se aislaron principalmente de infecciones invasivas 37 (56%) aislados, 16 (24%) aislados de infecciones respiratorias agudas, 4 (6%) de síndrome coqueluchoide y el resto 3 (5%) repartido en aislamientos de muestras ambientales, control de calidad, personal del propio laboratorio y 6 (9%) sin datos de procedencia.

Aunque de acuerdo a la literatura era lo de esperarse, estreptococos beta-hemolíticos como causantes de la infección, sin embargo, llama la atención que algunos de ellos fueron recuperados de niños en edad pediátrica con diagnóstico de síndrome coqueluchoide, lo que habla de la versatilidad de los estreptococos beta-hemolíticos; no solo como causantes de infecciones graves, sino también de signos y síntomas diversos que en un momento dado pueden ser confundidos con los que causan otras bacterias, lo que puede provocar que el médico equivoque el

tratamiento, lo que pone de manifiesto también la necesidad de cultivar las muestras y además no centrar la búsqueda solamente en el agente que puede provocar el diagnóstico, sino ampliar la búsqueda de otros microorganismos como en este caso los estreptococos beta hemolíticos. Los estreptococos beta-hemolíticos no son contemplados como causantes de síndrome coqueluchoide en ocasiones por algunos autores como Dotres y sus colaboradores en el año 2012, que enlistaron en un trabajo realizado en Cuba diferentes patógenos como causantes del síndrome coqueluchoide, pero en esa lista no incluyeron a los estreptococos beta-hemolíticos. En este bien es posible que los estreptococos beta-hemolíticos no hayan ocasionado las infecciones en los pacientitos, el hecho de aislarlos en los cultivos, si habla de una participación que puede complicar los cuadros clínicos de los pacientes si se consideran los factores de virulencia de los estreptococos beta-hemolíticos.

7.3 Estreptococos por grupo etario

Los estreptococos no tienen predilección por un grupo etario en específico, sin embargo, Villafaña *et. al* 2005, tras un estudio detallado de *Streptococcus pyogenes* observó un mayor porcentaje en niños de edad escolar como en los datos del presente trabajo, el grupo predominante es de 2 a 6 años. *Streptococcus agalactiae* se ha recuperado con mayor frecuencia en neonatos y sexo femenino en edad reproductiva (Rivas *et. al* 2006; Barajas *et. al* 2011), lo que concuerda con los datos de este trabajo, ya que se recuperó de muestras procedentes de mujeres en dicha edad y niños menores de 1 año.

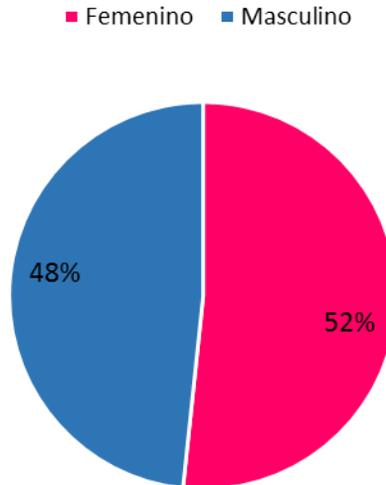


Gráfica 4. *Streptococcus pyogenes* con mayor cantidad de aislados principalmente en niños en edad pre-escolar (2-6 años) con 7 (16.6%), seguido de *Streptococcus agalactiae*.

7.4 *Streptococcus* spp., por sexo.

La distribución de *Streptococcus pyogenes* es similar en ambos sexos (Posse *et. al* 2007) lo que coincide con los datos encontrados en este trabajo, ya que de los 30 aislados 15 (50%) fueron aislados de mujeres y 15 (50%) de hombres.

***Streptococcus* spp. por sexo**

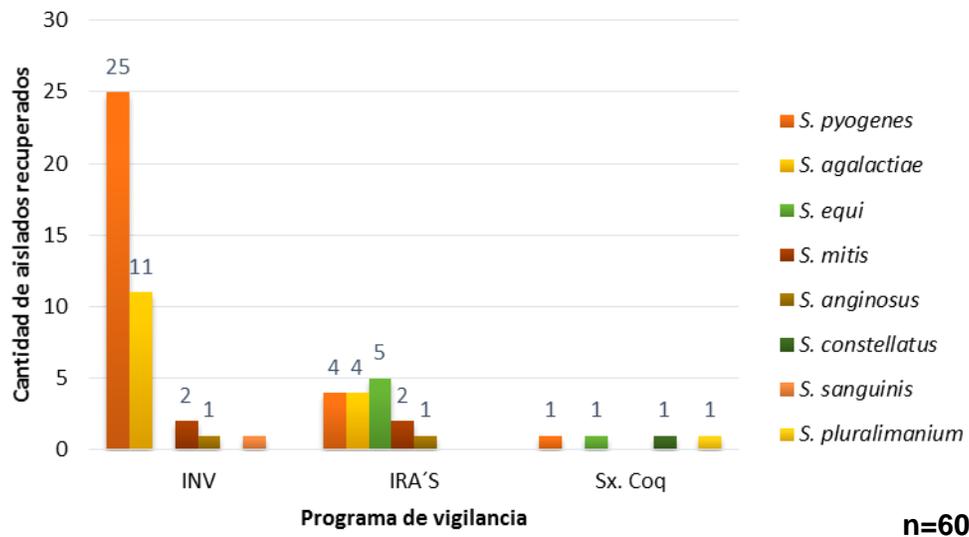


n= 60

Gráfica 5. Los *Streptococcus* spp., se aislaron principalmente en mujeres con 31 aislados (52%) y de hombres 29 (48%).

7.5 Especies de estreptococos recuperados de diferentes infecciones

A los estreptococos los podemos encontrar en diferentes padecimientos, en la gráfica 6 se observa *Streptococcus pyogenes* generando infecciones invasivas con mayor aislados. La literatura reporta 100 casos de infecciones por *Streptococcus pyogenes* en 6 años en una población del estado de México, en muestras de exudado faríngeo (Gómez *et. al* 2016), en este trabajo se enlisan 25 infecciones invasivas por *Streptococcus pyogenes* en 6 años, de muestras procedentes de procesos invasivos y 4 de infecciones respiratorias; lo que comparado sugiere una disminución de casos, posiblemente por el uso de antibióticos o un subregistro. Restrepo y colaboradores (2012), Shulman y colaboradores (2012) y Pinheiro (2017) hablan que *Streptococcus pyogenes* es responsable del 30% de los casos de faringitis en niños y un 10% en adultos.

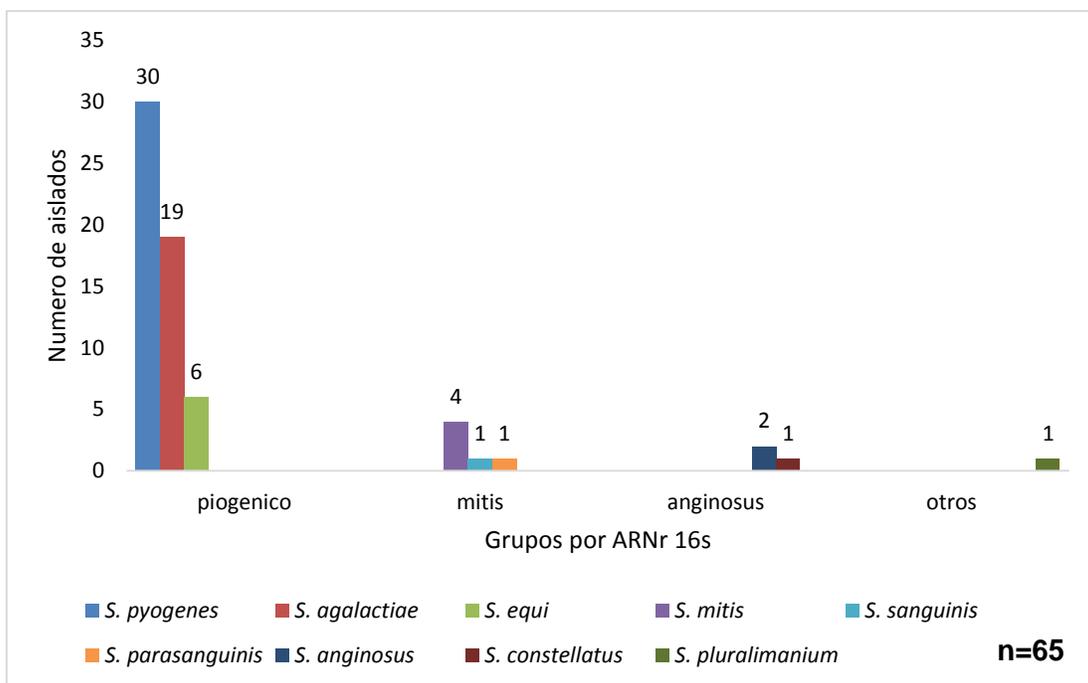


Gráfica 6. Cantidad de estreptococos recuperados por procedencia, *Streptococcus pyogenes* con mayor cantidad de aislados en infecciones invasivas 25 (41.7%), *Streptococcus agalactiae* 11 (18.3%).

7.6 Estreptococos agrupados según la clasificación de Carl R. Woese

Al agrupar los datos recuperados según la clasificación de Carl R. Woese como se observa en la gráfica 7, la mayor cantidad de aislados recuperados son del grupo piogénico en los que se incluye *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus equi*, patógenos importantes para el ser humano. Los estreptococos del resto de los grupos no son muy frecuentes causando infección, aunque aún siguen siendo de importancia para el hombre.

Estreptococos por grupos

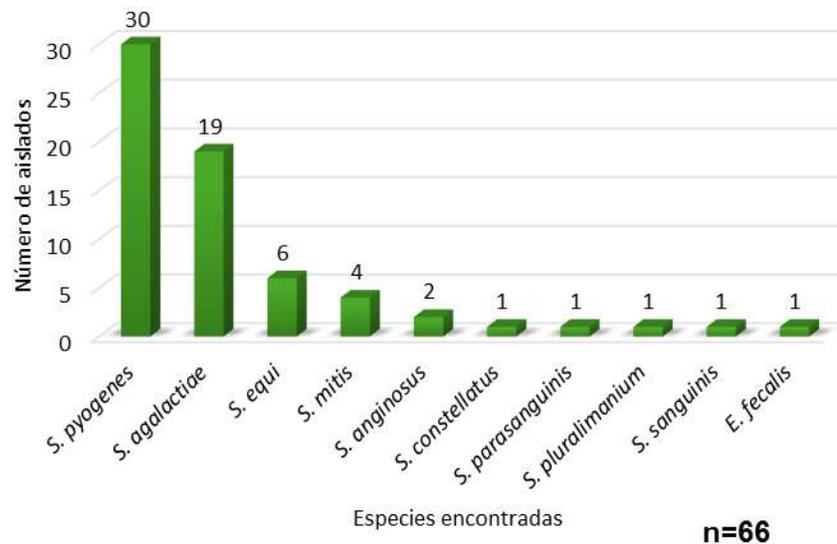


Gráfica 7. Especies de *Streptococcus spp.*, agrupadas según la clasificación propuesta por Carl R. Woese, secuenciación ARNr 16S, con mayor cantidad del grupo piogénico con 55 (84.6%) distribuidos en diferentes especies, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus equi*.

7.7 Especies de *Streptococcus spp.*, identificadas

Los principales aislados son de *Streptococcus pyogenes* seguido de *Streptococcus agalactiae* y en menor cantidad el resto de las especies.

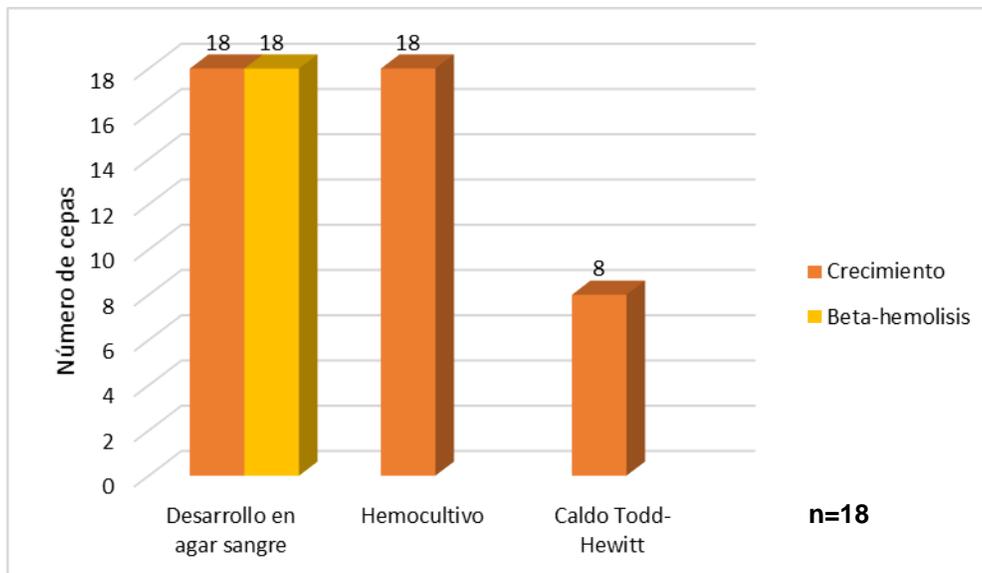
Especies de *Streptococcus spp.*, identificadas



Gráfica 8. De los 66 estreptococos se observa un mayor aislamiento de *Streptococcus pyogenes* 30 (45.5%) y *Streptococcus agalactiae* con 19 aislados (28.8%) y otras especies del mismo género en un porcentaje menor.

7.8 Recuperación de cepas preservadas a -70°C en Amies con carbón activado.

En cuanto a la recuperación después de la preservación, de los aislados ultracongelados por medio de los tres métodos utilizados se logró recuperación, en caldo Todd-Hewitt en un menor porcentaje, sin embargo, se recuperó al 100% (18 aislados) en los hemocultivos y agar sangre, este último más útil pues fue de la siembra directa del hisopo, además de no requerir pases intermedios y representar menos gasto.



Gráfica 9. Comparación de la recuperación mediante los métodos utilizados, con un porcentaje mayor en agar sangre y hemocultivo con 18 (100%) cepas recuperadas y 8 (42.1%) cepas recuperadas en caldo Todd-Hewitt.

Una vez recuperadas las cepas se procedió a realizar un conteo de la cantidad de UFC recuperadas de las cuales hubo una cantidad considerable de la recuperación como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Cantidad de colonias recuperadas.

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DEL AISLADO	CANTIDAD DE CEPAS GUARDADA SEGÚN EL NEFELOMETRO DE MC FARLAND	CANTIDAD DE UFC/ml RECUPERADAS	CELULAS BACTERIANAS RECUPERADAS
1	0.5	134	1.34X10 ⁹
2	0.5	173	1.73X10 ⁹
3	0.5	616	6.16X10 ⁹
4	0.5	816	8.16X10 ⁹
5	0.5	612	6.12X10 ⁹
6	0.5	682	6.82X10 ⁹
7	0.5	324	3.24X10 ⁹
8	0.5	134	1.34X10 ⁹
9	0.5	282	2.82X10 ⁹
10	0.5	300	3.0X10 ⁹
11	0.5	686	6.86X10 ⁹
12	0.5	504	5.04X10 ⁹
13	0.5	208	2.08X10 ⁹
14	0.5	288	2.88X10 ⁹
15	0.5	988	9.88X10 ⁹
16	0.5	518	5.18X10 ⁹
17	0.5	1092	1.092X10 ¹⁰
18	0.5	768	7.68X10 ⁹

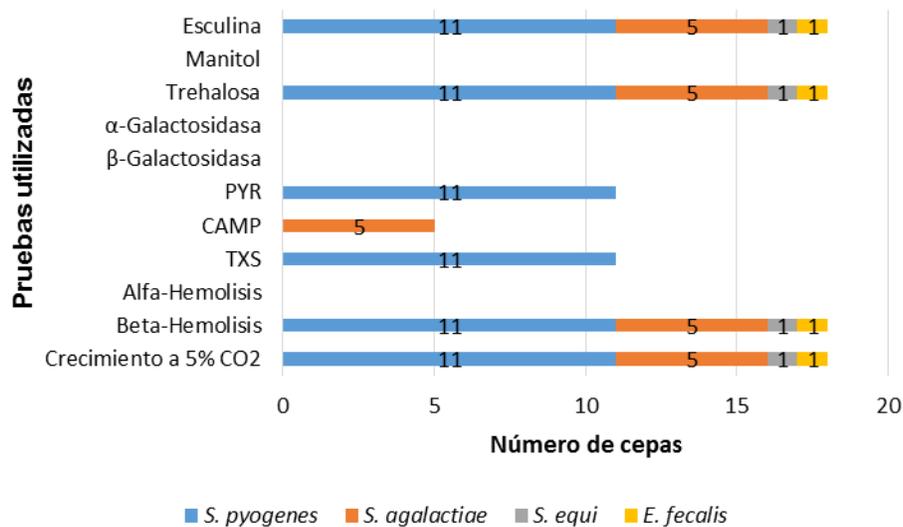
Se guardó la cepa al estándar 0.5 de McFarland lo que corresponde a 1×10^8 células bacterianas y 10 colonias. 1 célula bacteriana de *Streptococo* se divide en un tiempo de 30 min lo que en cada célula genera 48 células hijas, por lo que la cantidad obtenida fue 4.8×10^9 que corresponde al 100% de las colonias que se deben recuperar, por lo que en 24 horas se deberían recuperar 4.7×10^{21} .

1 colonia= 10,000,000 células bacterianas

Después de realizar el conteo se procedió a la identificación de la cepa para ello se utilizaron pruebas manuales y automatizadas lo que se llevó a comparación con el

manual Bergey's, encontrando que las pruebas que se muestran en la gráfica 10 coinciden con lo propuesto en dicho manual.

Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los estreptococos preservados



n=18

Gráfica 10. Pruebas realizadas a las cepas preservadas en ultracongelación a menos -70°C.

Las pruebas que dieron lugar a la identificación de las cepas después de que fueron aisladas de las muestras de los pacientes, mismas pruebas que también se realizaron para la confirmación, después de la preservación en ultracongelación a -70°C se volvieron a realizar, además de los antibiogramas y todas coincidieron; lo que habla de un método eficiente, fácil y económico, además de innovador para la preservación; pues permite conservar estreptococos beta-hemolíticos por hasta cuatro años, conservando sus características fenotípicas. Las pruebas realizadas son las que el manual Bergey's incluye para la identificación de los estreptococos beta-hemolíticos, por ejemplo, *Streptococcus equi* cuyo ejemplo se muestra en la Figura 11, además de la recuperación del resto de los estreptococos beta-hemolíticos, como también se aprecia *Streptococcus agalactiae* en la figura 12, y *Streptococcus pyogenes* en la figura 13. El método de preservación aquí empleado

consistió en solamente suspender la bacteria crecida en placas de agar sangre de carnero, incubadas a 36°C por 24 horas, posteriormente se suspendió hasta conseguir una concentración de 0.5 del nefelómetro de Mcfarland y se impregnaron los hisopos que enseguida se llevaron a medio amies con carbón activado y también enseguida se introdujeron en un ultracongelador Revco a -70°C hasta el día de la recuperación.

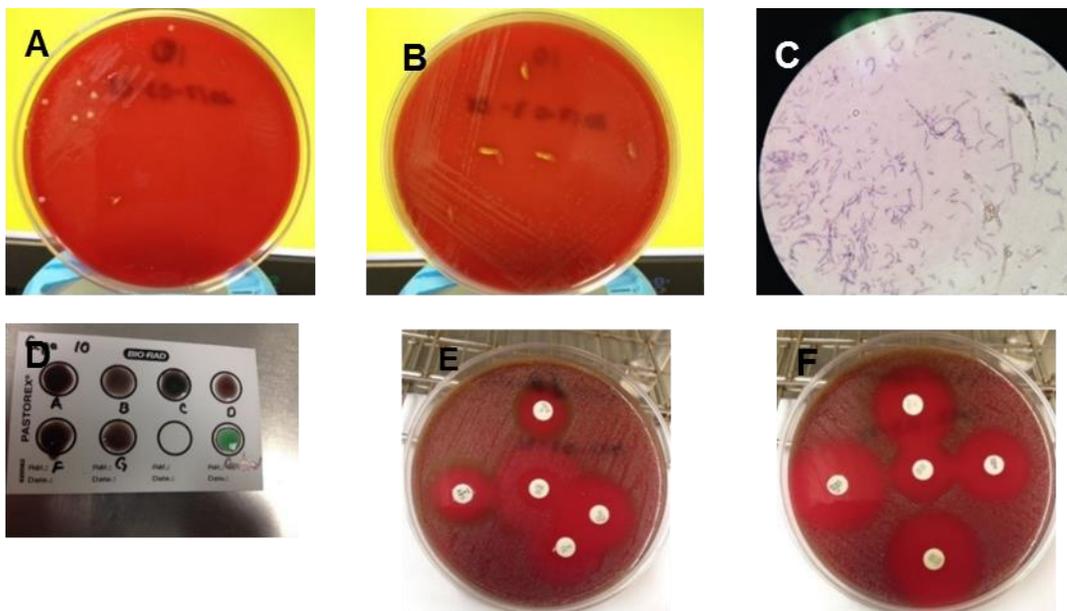


Figura 11. *Streptococcus equi*. A. Placa de agar sangre; recuperación de una cepa preservada en ultracongelador a -70°C., en medio de transporte Amies con carbón activado. B. Placa de agar sangre, reisolamiento de la recuperación de la cepa. C. Tinción, cocos Gram positivos en cadena. D. Aglutinación en látex con Pastorex Strep, aglutinación para el grupo C de Lancefield. E y F. Resultado de antibiograma por el método manual de Kirby-Bauer, sensible a los antibióticos probados.

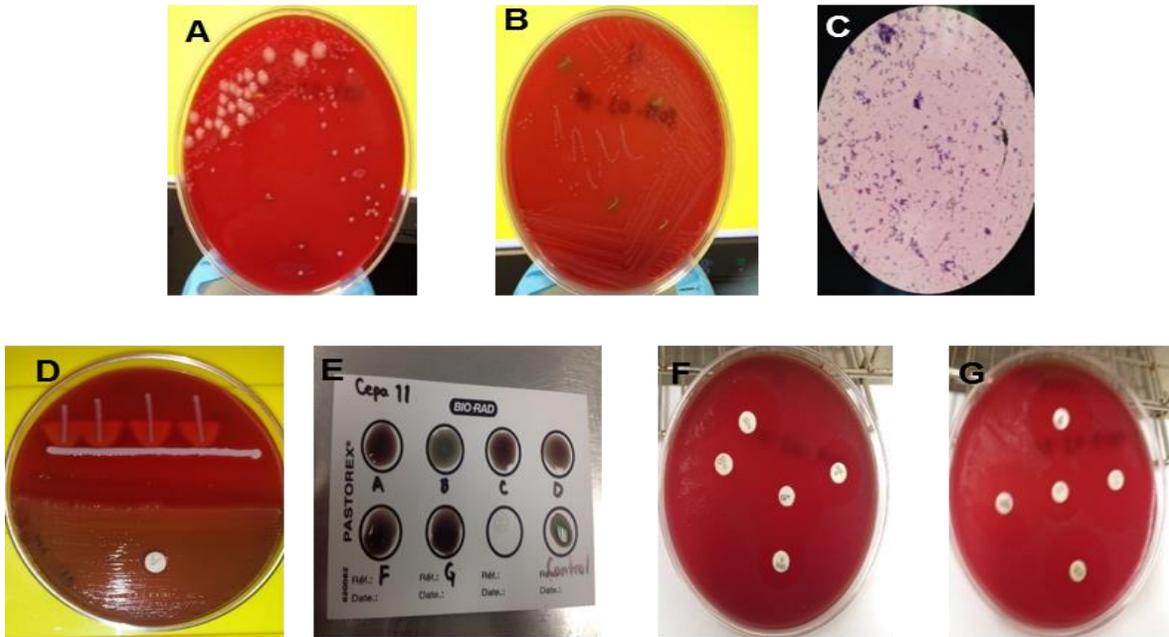


Figura 12. *Streptococcus agalactiae*. **A.** Recuperación de una cepa guardada por 4 años en ultracongelador a -70°C ., en medio de transporte Amies con carbón activado. **B.** Reaislamiento de la recuperación de la cepa con una beta-hemólisis. **C.** Tinción, cocos Gram positivos en cadena. **D.** Test CAMP positivo por la presencia del factor CAMP del *Streptococcus agalactiae* y la esfingomiolina del *Staphylococcus aureus*; resistente a bacitracina de 0.04U. **E.** Aglutinación en látex con Pastorex Strep, aglutinación para el grupo B de Lancefield. **F y G.** Resultado de antibiograma por el método manual de Kirby-Bauer, sensible a todos los antibióticos probados.

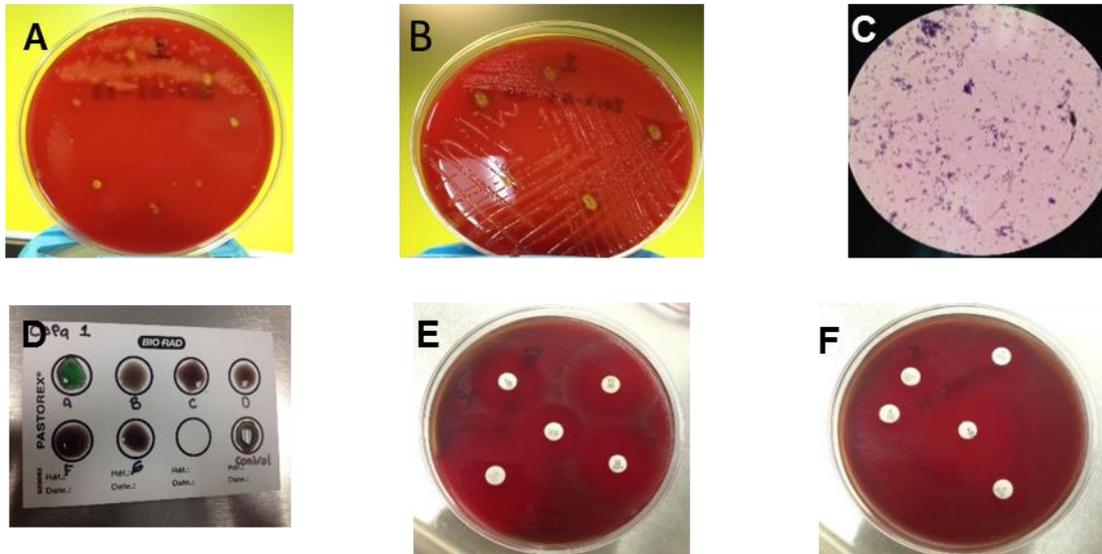


Figura 13. *Streptococcus pyogenes*. **A.** Recuperación de una cepa guardada por 3 años en ultracongelador a -70°C ., en medio de transporte Amies con carbón activado. **B.** Reaislamiento de la recuperación de la cepa. **C.** Tinción cocos Gram positivos en cadena. **D.** Aglutinación en látex con Pastorex Strep, aglutinación para el grupo A de Lancefield. **E y F.** Resultado de antibiograma por el método manual de Kirby Bauer observando sensibilidad para cada uno de los antibióticos.

7.9 Tipificación de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*

En un trabajo de Martínez y colaboradores se estudiaron 100 cepas de las cuales 12 fueron aisladas de niños y 88 de adultos, de estos 77 eran de mujeres embarazadas, 7 de ellas de líquido amniótico de ruptura prematura y se identificaron los serotipos **la** y **lb** (Martínez *et. al* 2004), en el presente trabajo (Tabla 3) la mayor cantidad de aislados fueron de recién nacidos, de los cuales se identificó el serotipo **la** y **lb** causando sepsis en los recién nacidos a los que se les aisló la cepa.

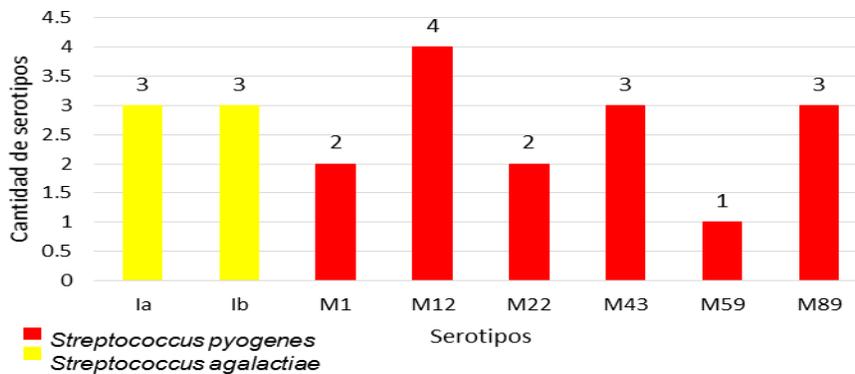
La proteína **M** de *Streptococcus pyogenes* es un factor de virulencia muy importante, cada uno de los serotipos de éste se encuentran asociados a alguna infección en específico, la proteína **M12** puede llegar a generar una glomerulonefritis a partir de infección cutánea, la proteína **M1** es la que más se identifica en aislados de infecciones faríngeas y puede llegar a ser reumatógena.

Tabla 3. Relación de la infección en el paciente con el serotipo.

Serotipo de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Streptococcus pyogenes</i>	Reporte por la literatura	Número de aislados	Diagnóstico del aislado
la	Septicemia neonatal, meningitis, infecciones piógenas	3	Faringoamigdalitis
lb	Septicemia neonatal, meningitis, infecciones piógenas	3	Sepsis, faringoamigdalitis
M1	Infección faríngea, Bacteriemia, infecciones invasivas, reumatógenas	2	Infección respiratoria, Faringoamigdalitis
M12	Infección faríngea, Síndrome de shock tóxico, Varicela.	4	Sepsis, infección de úlcera

M22	Infecciones invasivas y supurativas	2	Celulitis, faringoamigdalitis
M43	Síndrome de shock toxico (no específico)	3	Celulitis, sepsis, artritis séptica
M59	Infección cutánea, glomerulonefritis	1	Purpura trombocitopénica
M89	Infección faríngea, escarlatina	3	Celulitis, neumonía, shock tóxico

Serotipos de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*



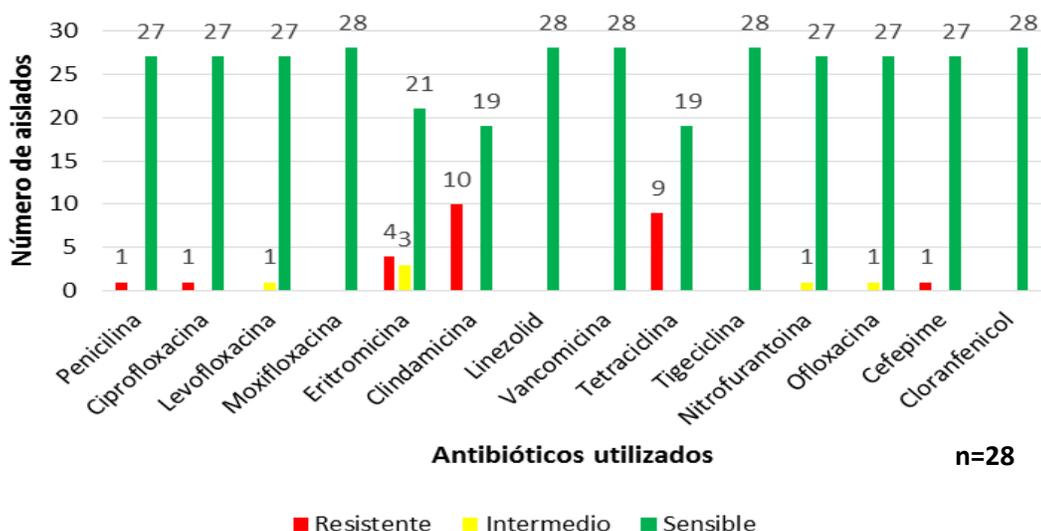
n=21

Gráfica 11. Representación gráfica de los resultados sobre la serotipificación por el método de RFLP de varias cepas de las cuales se obtuvieron los serotipos 1a y 1b para *Streptococcus agalactiae* y los serotipos **M1, M12, M22, M43, M59 y M89** para *Streptococcus pyogenes*. Resultados obtenidos en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Salud Pública en la Facultad de Medicina, UNAM, Cd. De México a cargo del D.C. Luis Manuel Perea Mejía.

7.10 Resultados de antibiogramas

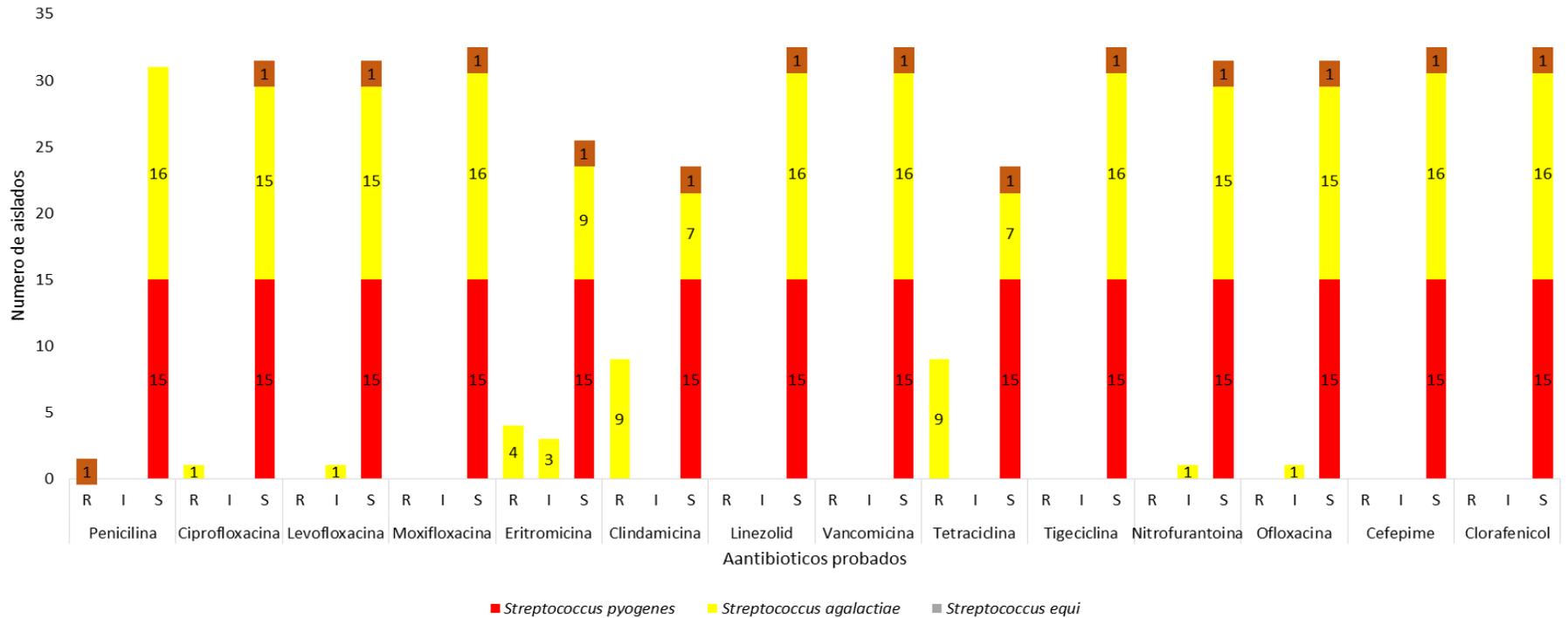
La penicilina sigue siendo activa in vitro contra *Streptococcus pyogenes*, pero en las infecciones invasivas no hay una respuesta favorable y la morbimortalidad puede ser alta, por lo tanto, el tratamiento aconsejado es la combinación de penicilina con clindamicina (Traverso et. al 2010). En el presente trabajo *Streptococcus pyogenes* no presentó resistencia a penicilina lo que concuerda con un estudio previo de sensibilidad a varios antibióticos tales como penicilina, amoxicilina, amoxicilina con ácido clavulánico, cefaclor, cefepime y cefotaxima fueron sensible mientras que eritromicina, claritromicina, roxitromicina y azitromicina fueron resistentes con 16% (Rodríguez et. al 2000).

Resultados de antibiograma por antibiótico a cepas de estreptococos



Gráfica 12. En 28 aislados de *Streptococcus* spp., la susceptibilidad a los antibióticos como: moxifloxacina, linezolid, vancomicina, tigeciclina, y cloranfenicol fue de 100 %, a los antibióticos que los *Streptococcus* spp., fueron intermedios son: ofloxacina (1 aislado) 3.6%, nitrofurantoina (1 aislado) 3.6%, levofloxacina (1 aislado) 3.6%, eritromicina (3 aislados) 10.7%; mientras que a los antibióticos que si presentaron resistencia los aislados fueron: cefepime (1 aislado) 3.6%, penicilina (1 aislado) 3.6%, ciprofloxacina (1 aislado) 3.6%, eritromicina (4 aislados) 14.3%, tetraciclina (9 aislados) 32.2% y clindamicina con (10 aislados) 35.7%.

Resultados de antibiograma por especie de los diferentes aislados



Gráfica 13. Aislados de estreptococos beta-hemolíticos y comportamiento ante los antibióticos ensayados.

De los 32 aislados que se retaron con antibióticos, todos los *Streptococcus pyogenes* (15 aislados) fueron susceptibles a todos los antibióticos, mientras que en España en un trabajo realizado por Amadeu y colaboradores en el año 2000, encontraron que 43 cepas de *Streptococcus pyogenes* (41,3%) fueron resistentes a eritromicina y claritromicina pudiendo todavía decir que en Michoacán de acuerdo a este trabajo, que no hay resistencia a eritromicina y claritromicina no fue ensayada; en cuanto

a otros aislados como *Streptococcus equi* solo fue resistente a penicilina (1 aislado) 100% y susceptible al resto de los antibióticos probados; por otro lado los *Streptococcus agalactiae* fueron intermedios a levofloxacin (1 aislado) 3%, nitrofurantoina (1 aislado) 3%, ofloxacin (1 aislado) 3% y eritromicina (3 aislados) 9%; mientras que *Streptococcus agalactiae* fue resistente a ciprofloxacina (1 aislado) 3%, eritromicina (4 aislados) 13%, clindamicina (9 aislados) 28% y tetraciclina (9 aislados) 28% (Tomado del anexo 4).

Aunque la penicilina es el antibiótico de elección contra las infecciones de garganta por *Streptococcus pyogenes*, suele tener ciertos inconvenientes que se pueden solventar, tal y como lo sostiene Dres en 2001, en donde propone algunas ventajas y desventajas de la penicilina, así como las opciones de uso, aunque en ocasiones se usara y dado que los objetivos de instalar un tratamiento contra *Streptococcus pyogenes* son control de los síntomas y signos, prevención de las complicaciones supurativas y no supurativas, reducción de la transmisión bacteriana a los contactos cercanos, minimizar los efectos adversos de la antibioticoterapia. De acuerdo a la misma autora las alternativas a la penicilina son: la amoxicilina que logra en los niños curaciones similares a la penicilina, aunque los efectos colaterales gastrointestinales y cutáneos parecen ser más frecuentes que con la penicilina, los macrólidos son los fármacos de elección en caso de alergia a la penicilina. El tratamiento con azitromicina durante 3-5 días aparece tan efectivo como con la penicilina.

El tratamiento con cefalosporinas durante 10 días es superior a la penicilina en la erradicación de los estreptococos beta hemolíticos del grupo A. Las cefalosporinas tienen un espectro de acción amplio y son resistentes a la degradación por bacterias productoras de betalactamasa, sin embargo, son preferibles las cefalosporinas de primera generación y no deben utilizarse en los pacientes alérgicos a la penicilina por el riesgo de reacción cruzada, se reservan para pacientes con recaídas o recurrencias de faringitis estreptocócica, así como la amoxicilina con ácido clavulánico.

En caso de faringitis estreptocócica recurrente, se recomienda en primer lugar buscar entre los contactos cercanos la existencia de portadores asintomáticos del germen, los pacientes con fracaso clínico al tratamiento convencional deben recibir tratamiento con antibióticos resistentes a la acción de la beta lactamasa, debe recomendarse al paciente la desinfección del cepillo de dientes y aparatos de ortodoncia para prevenir recurrencias, ya que los patógenos pueden persistir en éstos durante varios días, los pacientes pueden contagiar la enfermedad hasta 24 horas después de comenzada la antibioticoterapia, por lo que se recomienda un aislamiento relativo en el hogar durante ese lapso, no es necesario el control evolutivo con toma de muestra de exudado faríngeo y el tratamiento de portadores asintomáticos solo se justifica en el caso de contactos de un paciente con faringitis estreptocócica recurrente.

8. CONCLUSIONES

- El género de *Streptococcus spp.* abarca muchas especies, sin embargo, durante la recopilación de datos se encontró con mayor cantidad de aislados a *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes* después de haber causado una infección importante en los pacientes.
- La mayor cantidad de aislados recuperados fue de infecciones invasivas lo que pone de manifiesto el potencial de los estreptococos para causar daño en las personas.
- Aunque los aislados en este trabajo son pocos, comparados con la cantidad de cultivos que seguramente se solicitan, tanto en los diferentes hospitales y centros de salud en el estado, así como en el medio particular; son suficientes para tener un panorama del impacto que los estreptococos beta-hemolíticos tienen en la población Michoacana.
- No fue posible establecer las direcciones exactas de los pacientes lo que hubiera permitido ubicarlos geográficamente y poder inferenciar algunos aspectos relacionados con las zonas procedencia, lo que dificulta el trabajo epidemiológico.
- Las cepas se recuperaron de los pacientes tratados en unidades donde es posible realizar un cultivo, lo que sugiere que, aunque muchas otras personas tengan infecciones por estas bacterias no se cultivan perdiendo la oportunidad de los aislados y la información que estos pueden proporcionar.
- Los *Streptococcus agalactiae* recuperados son principalmente de recién nacidos y adultos jóvenes que en relación con la tipificación **Ia** y **Ib**, sugieren en los bebés, que dicha infección tuvo lugar al pasar por canal del parto o ruptura prematura de membranas; mientras que en lo referente a los adultos jóvenes (dos) fueron mujeres en edad reproductiva (20 a 40 años).
- El hecho de contar con una cantidad de *Streptococcus pyogenes* considerable (30 aislados) en este trabajo sugiere que dicho microorganismo sigue presentándose considerablemente en diversas muestras de pacientes cuyos signos y síntomas revelan una infección, en comparación con el resto de las especies; además de que es bien sabido que no es una bacteria de biota normal.

- La mayor cantidad de estreptococos recuperados es en niños de edad Pre-escolar (2 a 6 años), principalmente *Streptococcus pyogenes* con 7 aislados.
- Se obtuvo mediante biología molecular la identificación de serotipos de algunos estreptococos en los que se encontró la proteína **M1, M12, M22 M43, M59, y M89** de *Streptococcus pyogenes*, dichas proteínas tienen relación con el padecimiento que dio lugar al diagnóstico del paciente.
- Los *Streptococcus pyogenes* que poseen la proteína **M43**, no cuentan con cápsula de ácido hialurónico, lo que se asocia a otro factor de virulencia aun no específico y no es muy común causando infecciones, en este trabajo se encontraron tres cepas.
- La proteína **M12** de los *Streptococcus pyogenes*, se encuentra asociada a glomerulonefritis después de una infección faríngea, las cepas que la produjeron se aislaron de procesos de sepsis neonatal.
- La proteína **M22** está asociada a la supresión de la proliferación de las células endoteliales, en este trabajo se encontraron 2 cepas que la produjeron.
- Determinar la prevalencia de los tipos **M**, nos puede permitir conocer el comportamiento de los *Streptococcus pyogenes* en la población, así como establecer una vigilancia epidemiológica.
- Así mismo se aislaron algunas otras especies de *Streptococcus* spp., aunque en un número menor a *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* entre los que figuran especies como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pluralimanium* lo que pudieran estar relacionados con la ocupación del paciente.
- Los aislados preservados en Amies con carbón activado conservaron las mismas propiedades de identificación después de la preservación por más de cuatro años, por lo que el método de preservación en medios de transporte Amies en ultracongelación a -70°C puede ser útil para *Streptococcus* spp., en el Laboratorio Estatal, debido a su bajo costo, facilidad de ejecución y éxito de recuperación.
- De las especies identificadas se encontró que *Streptococcus agalactiae* es en el que se registró resistencia a algunos de los antibióticos probados, siendo

ciprofloxacina con 3%, eritromicina con 13%, tetraciclina con 28% y clindamicina con 28%. Lo que pone de manifiesto la importancia de tomar muestras y realizar cultivos, con el aislamiento se puede comprobar la efectividad de un antibiótico ante una bacteria que está causando una infección. Además de que con un antibiograma el médico puede discernir sobre cual antibiótico es el ideal tomando en cuenta las propiedades del antibiótico, las condicionantes del paciente y desde luego las aptitudes de la bacteria; además de que eritromicina y clindamicina son los antibióticos utilizados en las madres gestantes y después en los niños que nacen como tratamiento profiláctico, aun cuando no se tengan datos de la presencia de los estreptococos beta-hemolíticos, una cuestión que hoy día está en discusión. Además, uno de los antibióticos a los que se encontró resistencia es clindamicina (9 aislados) 28%.

- En cuanto a la *Streptococcus pyogenes*, aunque los 15 aislados fueron susceptibles a penicilinas se debe tomar en cuenta que no siempre el antibiótico se podrá usar, por lo que debe darse seguimiento al comportamiento ante los antibióticos ya que si bien podemos decir que en Michoacán la resistencia a la eritromicina es de 0 % de acuerdo con lo obtenido en este trabajo, sin embargo en países como España la resistencia de *Streptococcus pyogenes* es de hasta 43 % a la eritromicina y claritromicina lo que nos debe alertar no solo en Michoacán sino también en México para reforzar el seguimiento en cuanto al estudio de la resistencia de *Streptococcus pyogenes*. Por otro lado también aumentar en los antibiogramas a claritromicina para poder revisar cómo se comportan los *Streptococcus pyogenes* ante este antibiótico.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Amadeu Gené, Araceli González-Cuevas, Carmen Muñoz, Carles Luaces, Cristina Latorre. An updating of the antibiotic sensitivity of *Streptococcus pyogenes* in pediatrics. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000;18:144-5.
2. Aracil Belén, Alós J. Ignacio. *Streptococcus pyogenes* Resistencia a los macrólidos. Madrid: Servicio de microbiología. Hospital de Móstoles, Móstoles. Control de calidad SEIMC.
3. Arana A. Eunáte, Lekerika A. Natalia, García R. Ana. (2008). Enfermedades invasivas por *Streptococcus pyogenes*. Servicio de Urgencias Generales. Hospital de Cruces. Barakaldo. Bizkaia, España; 20: 435-438.
4. Arencibia A. Daniel F., Rosario F. Luis A., Gámez M. Rafael. (2008). Métodos generales de conservación de los microorganismos. Centro de productos naturales, Centro de Química Farmacéutica. FINLAY. Disponible en: <file:///C:/Users/EPRZ/Downloads/Conservaci%C3%B3n%20de%20M.O%20Finlay%20Ediciones.pdf>.
5. Bartolome S; Gentile M; Priore G. (2005). *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. Prevalencia en el Hospital Nacional Alejandro Posadas. *Revista Argentina Microbiología* v.37 n.3. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
6. Barón Samuel. (1996). *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas. ISBN-10: 0-9631172-1-1.
7. Canese Arquímedes, Canese Andrés. (2012). Cocos de interés médico. En *Manual de Microbiología y Parasitología Médica*. (181-188). Paraguay: Andrés Canese.

8. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*. 2005 Nov; 5 (11):685-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16253886>
9. Carbone C. Fernando, Llanos Z. Luis F. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas técnicas No. 30. Instituto Nacional de Salud, Lima.
10. Cárdenas P. María E; López Rafael, Gándara R. José L. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la inteligencia de las bacterias. *Elementos* 94, pp. 35-43. Disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num94/pdf/35.pdf>
11. Cavalieri Stephen J., Rankin Ivonne D., Harbeck Ronald J. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
12. Chatwal Singh G. (2014). *Host-Pathogen Interactions in Streptococcal Diseases*. Springer, Heidelberg, New York, London.
13. Cortez Florencio. (1997). Superantígenos. *Dermatología Peruana*. Vol. 7 No. 1. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v07_n1/Supera ntigenos.htm
14. Crespo O. María, Vélez Juan D. (1996). Importancia clínica del *Streptococcus agalactiae* como causante de infección. *Colombia médica*. Vol. 27, No. 2.
15. Del Rio A. Carlos, Rivera S. Gerardo, López L. María E., Moreno María G., Bolaños J. Rodrigo, Arizmendi V. Jorge. (2012, Enero – Febrero). Varicela en infección por estreptococo beta hemolítico del grupo A. importancia de un diagnóstico oportuno. *México: Acta pediátrica México*, volumen 33, Núm. 1.

16. Díaz A. Manuel, Claver A. Daniel. (2008). Meningitis neonatal por *Streptococcus pyogenes* y revisión de la literatura de los últimos 50 años. Hospital Pediátrico Universitario Juan M. Márquez. La Habana, Cuba. v.80 n.2.
17. Díaz Álvarez, Manuel, Claver Isás, Daniel, & Pérez Amarillo, Julián. (2008). Infecciones por *Streptococcus agalactiae* en un servicio de neonatología abierto. *Revista Cubana de Pediatría*, 80(4) Recuperado en 15 de abril de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312008000400002&lng=es&tlng=es
18. Dotres Martínez, Carlos, Vega Mendoza, Dania, Toraño Peraza, Gilda, Álvarez Carmenate, Marlene, & Broche Morera, Antonio. (2012). Síndrome coqueluchoide y tos ferina. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 28(4), 725-734. Recuperado en 15 de abril de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252012000400015&lng=es&tlng=es
19. Dres Hayes C, Williamson H and col. Management of Group A Beta-Hemolytic Streptococcal Pharyngitis *University of Missouri Columbia School of Medicine, Columbia, Missouri Am Fam Physician* 2001; 63: 1557-1565
20. Engleberg N.C; Dirita V; Dermody S.T. (2013). Shaencher Mecanismos de las enfermedades microbianas. España: Winters.
21. Errecalde Jorge. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Universidad nacional de la plata, Argentina. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5468s/y5468s00.pdf>
22. Ferretti Joseph J; Stevens Dennis L; Fischetti Vicente A. (2016). *Streptococcus pyogenes*: Basic Biology to Clinical Manifestations. Oklahoma: University of

Oklahoma Health Center; National Center for Bacteriology Information. Pediatría Autoimmune Neuropsychiatric Disorder Associated With Streptococcal Infection (PANDAS)

23. Forbes, Sahm, Weissfeld. (2007). *Streptococcus, Enterococcus* y Microorganismos similares. En Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico. (pp. 265-279). Argentina: Panamericana.
24. Fraile Manuel, Cueto L. Marina. (2000). *Streptococcus agalactiae*. Servicio de Microbiología. Hospital Virgen de las Nieves, Granada. Control de calidad SEIMC.
25. García L. María D., Uruburu F. Federico. (1999). La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia. Disponible en: https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM30_12.pdf
26. Género *Streptococcus spp.* FAVET-UFRGS Prof. Marcos JP Gomes 2013.
27. González P. A; Ortiz Zaragoza M. C. (2000). *Streptococcus pyogenes*: susceptibilidad in vitro y papel de las bacterias productoras de betalactamasa en la persistencia de la faringoamigdalitis estreptocócica. Centro de Salud Dr. José Castro Villagrana. Facultad de Medicina. UNAM. México. Atención Primaria. Vol. 25. Núm. 8. <http://www.elsevier.es>
28. Guillermo Restrepo Ch. Juan Carlos Gonzales. (2010). Biometría Comunitaria. Bogotá, Colombia: Fundación Universitaria, JUAN N. CORPAS. Disponible en: https://www.juanncorpas.edu.co/uploads/media/Libro_de_Biometria_Comunitaria.pdf
29. Grebo. (2010). Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20 2010. Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá. Alcaldía mayor de Bogotá D.C.

30. Holt G. J., Krieg R. Noel, Sneath A. Peter H. (2000). Gram-Positive cocci. En Bergey's Manual of. Determinative Bacterology. (pp. 527, 552-559). Baltimor: Lipruncott Williams & Wilkins.
31. Jasir A., Schalen C. First pan-European epidemiological and microbiological surveillance programme for severe *Streptococcus pyogenes* disease (Strep-EURO). European Society of Clinical Microbiology and Infectious diseases. 15th CEuropean Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) Abril 2005. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15796719>)
32. Jawetz, Melnck, Adlberg. (2011). Microbiología Médica. China: McGraw-Hill Interamericana.
33. Jimeno A. Amaya, Viqueira G. Monserrat, Mar A. María. (2013). Epidemiología y características clínicas de los episodios de bacteriemia por *Streptococcus pyogenes* en Cartagena (Murcia). Servicio de microbiología, Hospital Universitario Santa Lucia, Cartagena, Murcia, España. Disponible en: file:///C:/Users/E-PRZ/Downloads/S0213005X13000153_S300_es%20(2).pdf
34. Kenneth J. Ryan, Ray C. George. (2011). Sherris Microbiología Médica. New Yorck: McGRAW-HILL Interamericana.
35. Laczeski Margarita, Pegels Eduardo, Oviedo Patricia. *Streptococcus agalactiae*, primer estudio en Misiones de genes de resistencia asociados a serotipos capsulares. Rev. Cienc. Tecnol. Año 15 / N° 20 / 2013 / 68–74.
36. Lopardo A. Horacio, Borgnia Daniela, Mastroianni Alejandra. (2012). Estudio de los dos sistemas de transporte de interés clínico. Buenos Aires, Argentina: Acta Bioquim Clin Latinoam; 46(2): 229 – 31.

37. Llor C; Hernández Silvia, Gómez Frederick. (2008). Validación de una técnica antigénica rápida en el diagnóstico de la faringitis por estreptococo beta hemolítico del grupo A. servicio de microbiología, Hospital Joan XXIII. Tarragona España. Aten Primaria. 40(10):489-96. Disponible en: www.doyma.es/270.210.
38. Mac Faddin, Jean. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Argentina: Médica Panamericana
39. Maclyn MC Carty, M.D. (Noviembre 1973). Presentation of the Academy Meda To Rebecca C. Lancefield. New York: Rockefeller University. Vol. 49, No. 11.
40. Martín B. Ángel. (2016). CRSPR-Cas y... ¿bebes a la carta? Facultad de ciencias experimentales, Universidad Pablo de Olavide.
41. Mendell, Douglas, Bennet. (2016). Enfermedades infecciosas Principios y Practicas. Barcelona, España: Elseiver.
42. Minodier P¹, Laporte R², Miramont S². [Epidemiology of *Streptococcus pyogenes* infections in developing countries]. Suppl 2:S69-72. doi: 10.1016/S0929-693X(14)72263-8. Epub 2014 Nov 13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25456683>
43. Molina L. José. (2015). Factores de patogenicidad bacteriana. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM
44. Montes Milagros, García A. José M. (2007). Género *Streptococcus*: una revisión practica para el laboratorio de microbiología. San Sebastián Guipúzcoa, España. Enferm Infecc Microbiol Clin; 24 Supl. 3:14 – 20.

45. Morales G. Yolanda, Duque Estrella, Rodríguez A. Osvaldo. (2010). Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Biotecnología*, Vol. 14 No. 2.
46. Murray R. Patrick, Rosenthal S. Ken, Pfaller A. Michael. (2013). *Microbiología Médica*. Barcelona, España: Elseiver.
47. Myrvik Quentin N. (1988). Estreptococos. En *Bacteriología y Micología Medicas* (pp. 127-) panamericana.
48. Navarro P. José, Sandoval R. Ana S., Armendáriz B. Juan. (2008). *Biología molecular en medicina*. Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica. Disponible en:
http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq08v32p163_174_Armendariz.pdf.
49. Nizet Víctor, Arnold John C. *Streptococcus pyogenes* (Grupo A *Streptococcus*). Etiologi Agents of Infectious Disases. All references are available online at www.expertconsult.com.
50. Pantoja Miguel A., Delpiano Luis, Haquin Gia. (2014). Caso y revisión Eritrodermia con bacteriemia por *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis* en un paciente pediátrico: reporte de un de un caso y revisión de la literatura. Hospital clínico San Borja Arriarán. Programa de Especialidades en Pediatría Universidad de Chile (MAP, GH) Servicio de Pediatría (LD). *Rev. Chilena Infectol*; 31 (5): 615-618. Disponible en: www.sochinf.cl.
51. Parra H. Sandra L., Pérez C. María M., Bernal M. Mauricio. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del instituto de biotecnología de la Universidad Nacional

de Colombia (IBUN). NOVA - Publicación Científica ISSN: 1794-2470 Vol.4 No. 5
Enero - Junio de 2006:1-116.

- 52.** Perea Mejía. Luis M. resultados de la tipificación de las cepas de Estreptococos beta-hemolíticos, Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina, UNAM, 2011.
- 53.** Piqueras M. (2014). Rebeca C. Lancefield (1895-1981) ordenadora de los estreptococos. International Microbiology, Associate Editor. SEM@foro.
- 54.** Portillo A; Lantero M; Zarazaga M. (2000). Resistencia a antibióticos Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas y mecanismos implicados en cepas clínicas de *Streptococcus spp.* en la Rioja. Área de Bioquímica y Biología molecular, Universidad de la Rioja. Laboratorio de Microbiología, complejo Hospitalario San Millán-San Pedro. ISSN 1131-5423. Núm. 12, pp. 11-26.
- 55.** Pumarola A., Rodríguez T. A., García T.A, (2da. Edición). *Streptococcus y Streptococcus pneumoniae* (Neumococo). En Microbiología y Parasitología Médica (pp. 243-356). Barcelona: SALVAT.
- 56.** Rivera Maribel. (Abril, Mayo, Junio, 1998). Estreptococo Beta Hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*). Honduras: Departamento de Pediatría. Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Vol. XIX – No.2
- 57.** Rodicio Ma. del Rosario, Mendoza Ma. del Carmen. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo, España. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.; 22(4): 238 – 45.
- 58.** Romero C. Raúl. (2007). Estreptococos y Neumococo. En Microbiología y Parasitología Humana. (697-720). España: Panamericana.

59. Ronconi María, Merino Luis, Miranda Olga. Colonización faucial por *Streptococcus pyogenes* en pacientes con impétigo. Instituto de medicina regional. Universidad nacional del noreste de Argentina. Rev. Cubana Med Trop. 1999;51(3):149-51
60. Sánchez L. Ligia. C. Corrales R. Lucia C., (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA ISSN: 1794-2470 VOL.3 No. 4. :1-116.
61. Stevens Dennis L; Bryant Amy E. (2016). *Streptococcus pyogenes: Basic Biología to Clinical Manifestations*.
62. Stevens Dennis L; Kaplan Edward L. (2000). *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*. Oxford University Press. New York.
63. Torres Carme, Cercenado Emilia. Lectura interpretada del antibiograma de cocos Gram positivos. Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja. Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Enfer Infecc Microbiol Clic, 2010; 28(8): 541-553. Madrid, España.
64. Torres R. Miguel F. (1996). Manual práctico de bacteriología médica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Editorial Serviprensa C.A. Guatemala.
65. Ulloa M. Teresa, Silva Viviana, Piñones Elizabeth. (2001). Caracterización de cepas de *Streptococcus pyogenes* aisladas de cuadros invasores basadas en polimorfismo del regulón vir. Rev. Chil. Infectol. Vol.18, n.3, Santiago. Disponible en:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182001000300006#fig1

66. Universidad Nacional de Colombia. (2016). Fundamentos y técnicas para la preservación de bacterias, hongos y levaduras. Instituto de Biotecnología. Bogotá.
67. Vandepitte J., Engbaeker K., Rohner P. (2003). Basic Laboratory procedures in clinical bacterology. Ginebra: World Health Organization.
68. Villar Hugo E; Longo Liliana M; Laurino Gustavo J. (2005). Hospital General de Agudos Dr. Enrique Tornú; Laboratorio Hidalgo. Buenos Aires. Argentina. Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39 (2): 151-5.
69. Vignoli R; Seija V. principales mecanismos de resistencia antibiótica. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>
70. Vinagre Claudia, Cifuentes D. Marcela, Valdivieso R. Francisca, Ojeda S. Alicia, Prado J. Valeria. (1999). Emergencia de resistencia a macrólidos en *Streptococcus pyogenes*. Santiago Chile: Rev. Méd. Chile v. 127, n.12
71. Wachsman Mónica, Degrossi Claudia. (2012). Microbiología 1. Facultad de ciencias de la salud. Universidad de Belgrano, Buenos Aires Argentina. Disponible en: <http://repositorio.ub.edu.ar/bitstream/handle/123456789/3303/3943%20-%20microbiolog%C3%ADa1%20-%20waschman2012.pdf?sequence=1>.
72. Wegner Adriana, Claveiar Cristian, Donoso Alejandro. (2000). Meningitis bacteriana aguda por *Streptococcus pyogenes*: Caso clínico y revisión de literatura. Rev. Chile Infect; 17 (2): 135-138.

- 73.** Winnin, Allen, Janda, Koneman, Procop. . (2006). Koneman Diagnostico Microbiológico Texto y Atlas en color. Argentina: panamericana.
- 74.** W. Jonh Spicer. (2009). Microbiología clínica y enfermedades infecciosas Texto y Atlas en color. Barcelona, España: Elseiver.
- 75.** Zarate M.S; Jordá V. L; Pacheco M. V._Modified Spot CAMP Test: A rapid, inexpensive and accurate method for identification of group B streptococci. Laboratorio de Microbiología, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno. Laboratorio de Bacteriología, Hospital Infantil Municipal de Córdoba. Revista Argentina de Microbiología (2005) 37: 126-128.

10. ANEXO 1. Medios de cultivo

11.1. Agar sangre

En un medio de cultivo ideal para el aislamiento y cultivo de diversos microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes esto por la adición de sangre al medio, así como la infusión de musculo de corazón y la peptona otorgan un valor nutritivo significativo. El cloruro de sodio proporciona un balance osmótico.

Formula (g/L)	
Infusión de musculo de corazón	375.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH final: 7.3 ± 0.2	

Suspender 40g de agar en 1litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea. Calentar con agitación frecuente, hervir por 1 minuto. Esterilizar 20 minutos a 121°C; enfriar a 45-50°C agregar 5% de sangre desfibrinada. Homogeneizar y distribuir en placas.

11.2. Caldo Todd-Hewitt

Medio de cultivo que permite el desarrollo de bacterias de rápido crecimiento y nutricionalmente exigentes a partir de diversas muestras, especialmente para el cultivo de estreptococos beta-hemolíticos antes de su tipificación serológica. Con un agregado de un antimicrobiana para el enriquecimiento selectivo del Estreptococo del grupo B a partir de muestras del tracto genital femenino.

La fuente nutritiva está constituida por la infusión cerebro corazón y peptona la cuales son fuente de nitrógeno, vitaminas y aminoácidos. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

Formula (g/L)	
Infusión cerebro-corazón	3.10
Peptona	20.0
Glucosa	2.0
Cloruro de sodio	2.0
Fosfato disodico	0.4
Carbonato de sodio	2.5
pH final 7.8 ±0.2	

11.3. Nefelómetro de Macfarlánd

Es una escala de turbidez con la cual se pueden realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón de manera visual.

La finalidad es establecer una relación entre precipitado químico y suspensión bacteriana. Se crearon 10 estándares por espectrofotometría, una recta patrón, de forma que se detecta una concentración de la dilución bacteriana. La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfhídrico.



TUBO	Cl ₂ Ba 1%	SO ₄ H ₂ 1%	u.f.c/ml
0.5	0.05	9.95	1.0x10 ⁸
1	0.1	9.9	3.0x10 ⁸
2	0.2	9.8	6.0x10 ⁸
3	0.3	9.7	9.0x10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2x10 ⁹
5	0.5	9.5	1.5x10 ⁹
6	0.6	9.4	1.8x10 ⁹
7	0.7	9.3	2.1x10 ⁹
8	0.8	9.2	2.4x10 ⁹
9	0.9	9.1	2.7x10 ⁹
10	0.10	9.0	3.0x10 ⁹

Mezclar solución acuosa de cloruro de bario en solución acuosa de ácido sulfhídrico la cantidad necesaria dependiendo el tubo necesario, colocar mezcla en tubo y cerrarlo adecuadamente.

11.4. Tinción Gram

Formula

Cristal violeta

Solución A:	
Cristal violeta (pureza del colorante de por lo menos, el 90%)	2g
Etanol (95%)	20mL
Solución B:	
Oxalato de amonio	0.8g
Agua destilada	80mL

- Mezclar cada uno de los solutos en su disolvente respectivo
- Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta solubilizar.
- Mezclar ambas soluciones y filtrar

Solución de yodo yoduro. (Lugol)

Yodo (químicamente puro)	1g
Yoduro de potasio	2g
Agua destilada	300mL

- Combinar el yodo con el yoduro de potasio con ayuda de un mortero
- Lavar el contenido de este con pequeñas alícuotas de agua destilada.
- Aforar a 300mL
- Agitar fuertemente.
- Almacenar el frasco ámbar y tapón de vidrio.

Alcohol cetona

Alcohol etílico (95%)	500mL
Acetona	300mL

Safranina

Safranina (pureza del colorante, 90%)	0.25g
Alcohol etílico (95%)	10mL
Agua destilada	100mL

- Disolver el colorante en el alcohol.
- Agregar el agua destilada.
- Filtrar.
- Almacenar en frasco con tapón de vidrio.

11.5. Medio BAB (Base de agar sangre)

Medio de aislamiento rutinario con propiedades nutricionales excepcionales.

Mezclar los ingredientes respectivamente

Formula (g/L)	
Mezcla de peptona seleccionada	21.0g
Extracto de levadura	2.0g
D-glucosa	0.5g
NaCl	5.0g
Sulfato de magnesio	0.045g
Agar	10.5g
pH final 7.3 ± 0.2	

- Mezclar en mortero todas las sustancias requeridas
- Suspender todo el polvo en 1 litro de agua destilada desionizada.
- Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 p.s.i., 15 minutos.
- Enfriar a 50°C y mantener a esta temperatura.
- Añadir 5-7% de sangre desfibrinada y estéril de caballo u oveja.

ANEXO 2. LISTA DE MATERIALES Y EQUIPO UTILIZADO

Material biológico

- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus equi*.
- *Enterococcus faecalis*
- *Staphylococcus aureus*

Medios de cultivo

- Agar gelosa sangre BD Difco™
- Caldo Todd-Hewitt BBL Becton Dickson (DB)
- Botellas de hemocultivo para anaerobios BD BACTEC™ Peds plus™/F
- Solución salina
- BAB

Material extra

- Jeringas BD Plastipak™
- Portaobjetos madesa®
- Pastorex Strep BIO-RAD™
- Colorantes para Gram HYCEL Reactivos Químicos
- Tarjetas para Phoenix 100 BD
- Medios de transporte Amies con carbón activado CE COPAN
- Medios de transporte Cary Blair COPAN
- Hisopos COPAN

Antibióticos (sensidiscos)

- Bacitracina 0.04 Oxoid™
- Trimetoprim con sulfametoxazol
- Penicilina o Ampicilina BD BBL
- Eritromicina Oxoid™
- Clindamicina
- Levofloxacina
- Ofloxacina
- Vancomicina
- Cefepime
- Clorafenicol
- Linezolid
- Tetraciclina

Equipos

- Bactec™ FX40 BD
- Centrifugadora, Thermo ELECTRON CORPORATION, ICE CL30 Centrifuge
- Campana de seguridad; Thermo ELECTRON CORPORATION, Forma Class II, A2; Biological Safety Cabinet
- Micropipeta HALMINTON 25 µL
- Vórtex DAIGER Vórtex Genie®2, Cat. No. 3030^a
- Phoenix™ 100 BD
- Refrigerador SANYO Lab Cool
- Incinerador BACTEC CINERATOR ESTERILIZER
- Microscopio Zeiss AxioStar Plus
- Incubadora Lab-Line IMPERIAL III INCUBATOR
- Mechero

ANEXO 3.

ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
p.s.i	Libras por pulgada cuadrada
UFC	Unidad formadora de colonias
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
LCR	Líquido cefalorraquídeo
OMS	Organización Mundial de la Salud
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
VPH	Virus del Papiloma Humano
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
CONAVE	Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas)
Sx. Coq.	Síndrome Coqueluchoide
INV	Invasivas
IRA´S	Infecciones respiratorias agudas
AMB	Ambiental
TXS	Trimetroprima con sulfametoxazol
UI	Unidades Internacionales
MI	Mililitros
Pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniones
PYR	L-pirrolidolarimidasa
ARN	Ácido ribonucleico

DNA	Ácido desoxirribonucleico
LTA	Lipoteicoico
LPS	Lipopolisacárido
EGB	Estreptococo del grupo B
GSA	Estreptococo del grupo A
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
Sep	Exotoxina pirógena estreptocócica
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

Tabla 4. Resultados de antibiograma realizado

No. DE CEP A	NOMBRE DEL AISLADO	PROGRAMA	Ampicilina	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Moxifloxacina	Eritromicina	Clindamicina	Linezolid	Vancomicina	Tetraciclina	Tigeciclina	Nitrofurantoina	Ofloxacina	Cefepime	Cloranfenicol
33	<i>Streptococcus pyogenes</i>	IRA'S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
149	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Sx. Coq	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
65	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
116	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
152	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
157	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
88	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	<i>Streptococcus pyogenes</i>	IRA'S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
49	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
78	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
145	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
88	<i>Streptococcus pyogenes</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113-A	<i>Streptococcus equi</i>	Sx. Coq	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
103	<i>Streptococcus agalactiae</i>	INV	S	S	S	S	I	*R	S	S	S	S	S	S	S	S
27	<i>Streptococcus agalactiae</i>	IRA'S	S	S	S	S	*I	R	S	S	R	S	S	S	S	S
	<i>Streptococcus agalactiae</i>		S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	I	S	S	S
6	<i>Streptococcus agalactiae</i>	PACAL	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S
48-1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	INV	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
48	<i>Streptococcus agalactiae</i>	INV	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S

1502	<i>Streptococcus agalactiae</i>	LESP	S	S	S	S	I	*R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
102- A	<i>Streptococcus agalactiae</i>	AMB	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	<i>Streptococcus agalactiae</i>	IRA S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
5	<i>Streptococcus agalactiae</i>	PACAL	S	S	S	S	S	*R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
150	<i>Streptococcus agalactiae</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
79	<i>Streptococcus agalactiae</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
48	<i>Streptococcus agalactiae</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S
3	<i>Streptococcus agalactiae</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
79	<i>Streptococcus agalactiae</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
49	<i>Streptococcus agalactiae</i>	INV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	<i>Enterococcus faecalis</i>		S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S

Tabla 5. Principales antibióticos para *Streptococcus* spp. β-hemolíticos del grupo A, B y C.

Antibiótico	Disco	Criterios de interpretación		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Penicilina o Ampicilina	10U / 10µg	-	-	≥24
Cefepime	30µg	-	-	≥24
Vancomicina	30µg	-	-	≥17
Eritromicina	15µg	≤15	16-20	≥21
Clindamicina	2µg	≤15	16-18	≥19
Levofloxacin	5µg	≤13	14-16	≥17
Ofloxacin	5µg	≤12	13-15	≥16
Cloranfenicol	30µg	≤17	18-20	≥21
Tetraciclina	30µg	≤18	19-22	≥23
Linezolid	30µg	-	-	≥21

Anexo 5.

Tabla 6. Comparación de bioquímicas realizadas con el Manual Bergey's

	MANUAL			Cepas recuperadas							
	BERGEY'S			<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus equi</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
CANTIDAD				11	5	1	1	1	1	1	1
Crecimiento a 5% CO2	1	1	1	11	5	1	1	1	1	1	1
Beta-Hemólisis	1	1	0	11	5	0	1	1	1	1	1
Alfa-Hemólisis	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Grupo serológico de Lancefield	A	B		A	B		C			D	
Bacitracina	S	R		S	R						
TXS	1	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0
CAMP	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PYR	1	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0
β-Galactosidasa	0	0	d	0	0	0	0	0	0	0	0
α-Galactosidasa	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Trehalosa	1	1	1	11	5	0	1	1	1	1	1
Manitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escualina	1	1	1	11	5	1	1	1	1	1	1

R: resistente

S: sensible

1: positivo

0: negativo

A, B, C y D: grupos del Lancefield

d: 11-89% de las cepas son positivas