

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS E INVESTIGACIÓN
EN SALUD
Especialidad en “Diagnóstico de Laboratorio en Salud”

EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL
AISLAMIENTO DE *Streptococcus pyogenes* EN
PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLÍNICO DE
FARINGOAMIGDALITIS QUE ACUDEN AL
LABORATORIO DEL SELADIS DURANTE LOS MESES
DE JULIO A DICIEMBRE DEL 2008.

ELABORADO POR:

Lic. Iván Kosky Valencia Cruz

(Tesis de grado presentada para optar al título de Especialista en Diagnóstico de Laboratorio en Salud, mención Microbiología)

La Paz - Bolivia
2009

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS E INVESTIGACIÓN
EN SALUD
Especialidad en “Diagnóstico de Laboratorio en Salud”

EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL
AISLAMIENTO DE *Streptococcus pyogenes* EN
PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLÍNICO DE
FARINGOAMIGDALITIS QUE ACUDEN AL
LABORATORIO DEL SELADIS DURANTE LOS MESES
DE JULIO A DICIEMBRE DEL 2008.

ELABORADO POR: *Lic. Iván Kosky Valencia Cruz*

ASESORES: *Raquel Calderón Morales M.Sc.*
Juan Edgar Callisaya H. M.Sc.

(Tesis de grado presentada para optar al título de Especialista en Diagnóstico de Laboratorio en Salud, mención Microbiología)

La Paz - Bolivia
2009

Dedicatoria:

A mi querido maestro que me enseñó todo en la vida y al que le debo mis logros y aunque se me adelanto aun sigue guiando mis pasos desde el cielo... para mi papi Dámaso.

Agradecimientos

- *A Dios por darme la oportunidad de estar aquí con ustedes y me hizo un ganador desde el principio.*
- *A mi mamita, que con su aliento constante en las buenas y en las malas, me impulso a seguir mi camino para ir alcanzando mis metas.*
- *A mis hermanos, que me soportaron y me ayudaron a su manera.*
- *A la Dra. Raquel Calderón y al Dr. Juan Callisaya, quienes iluminaron mis pasos desde el inicio, compartiendo sus enseñanzas y guiándome acertadamente, y a los cuales les debo mi fascinación por la Bacteriología.*
- *Al personal del instituto SELADIS, a la directora, a los docentes y a los grandes amigos que encontré y con los que compartí momentos inolvidables.*
- *Finalmente a todos los amigos que a su manera colaboraron en la realización del presente trabajo.*

TABLA DE CONTENIDO

	<i>Página</i>
<u>RESUMEN</u>	1
<u>ABSTRACT</u>	2
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
1.1 ANTECEDENTES.....	5
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	9
1.4 MARCO TEÓRICO	11
1.4.1 CONCEPTO.....	11
1.4.2 FARINGITIS ESTREPTOCOCICA	12
1.4.2.1 FACTORES DE VIRULENCIA	13
1.4.2.2 MANIFESTACIONES CLINICAS	17
1.4.2.3 COMPLICACIONES	18
1.4.2.4 DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO.....	21
1.4.2.5 TRATAMIENTO	26
1.4.2.6 PORTACIÓN, FRACASO DE TRATAMIENTO Y REINFECCIÓN.....	28
2. <u>OBJETIVOS</u>	30
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. <u>DISEÑO METODOLÓGICO</u>	31
3.1 DESCRIPCIÓN	31
3.2 TAMAÑO MUESTRAL	31
3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	31
3.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	32
3.5 VARIABLES Y SU MEDICIÓN.....	32
3.5.1 VARIABLE DEPENDIENTE	33
3.5.2 VARIABLE INDEPENDIENTE	33

3.5.3	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	33
3.6	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	34
3.7	TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	36
3.7.1	PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.....	37
3.7.1.1	Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados.....	37
3.7.1.2	Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica.....	37
3.7.1.3	Agar Sangre Humana (glóbulos rojos sin lavado).....	37
3.7.1.4	Agar Sangre de Carnero.....	37
3.7.2	TOMA DE MUESTRA.....	38
3.7.3	SIEMBRA.....	38
3.7.4	IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS AISLADOS.....	39
3.7.4.1	HEMÓLISIS.....	39
3.7.4.2	TINCIÓN GRAM.....	40
3.7.4.3	PRUEBA DE LA CATALASA.....	40
3.7.4.4	BACITRACINA Y TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL.....	41
3.7.4.5	PRUEBA DE PYR (PIRROLIDONIL ARILAMIDASA).....	42
3.7.4.6	PRUEBA VOGUES-PROSKAUER.....	43
3.8	INSTRUMENTOS Y TECNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	44
3.9	PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	44
4.	<u>RESULTADOS</u>	45
5.	<u>DISCUSIÓN</u>	54
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	57
7.	<u>RECOMENDACIONES</u>	58
8.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	59

TABLA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tinción gram de Streptococcus pyogenes.....	12
Figura 2. Streptococcus pyogenes en agar sangre de carnero.....	13
Figura 3. Factores de virulencia de Streptococcus pyogenes.....	15
Figura 4. Sitio de acción de TMS y bacitracina.....	24
Figura 5. Sitio de acción de Penicilinas y Macrolidos.....	27
Figura 6. Hemólisis de Streptococcus pyogenes en agar sangre.....	39
Figura 7. Tinción gram de colonia beta hemolítica de Streptococcus pyogenes.....	40
Figura 8. Prueba de la catalasa.....	41
Figura 9. Prueba de la Bacitracina y Trimetoprim/sulfametoxazol.....	42
Figura 10. Prueba de PYR (Pirrolidonil Arilamidasa).....	42
Figura 11. Prueba Vogues-Proskauer (VP).....	43

LISTA DE TABLAS Y GRAFICOS

	Página
Tabla y grafico 1. Tasas de evaluación del ASH con glóbulos rojos lavados (24 h).....	46
Tabla y grafico 2. Tasas de evaluación del ASH con glóbulos rojos lavados (48 h).....	47
Tabla y grafico 3. Tasas de evaluación del ASH con glóbulos rojos lavados más azida sodica (24 h).....	48
Tabla y grafico 4. Tasas de evaluación del ASH con glóbulos rojos lavados más azida sodica (48 h).....	49
Tabla y grafico 5. Tasas de evaluación del ASH (24 h).....	50
Tabla y grafico 6. Tasas de evaluación del ASH (48 h).....	51
Tabla 7. Distribución de patógenos bacterianos aislados.....	52
Grafico 7. Distribución de patógenos bacterianos aislados.....	53

TABLA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Preparación de ASH con glóbulos rojos lavados.....	63
Anexo 2. Lavado de glóbulos rojos.....	64
Anexo 3. Preparación de ASH con glóbulos rojos lavados más azida sodica.....	65
Anexo 4. Preparación de ASH con glóbulos rojos sin lavado.....	66
Anexo 5. Preparación de agar sangre de carnero.....	67
Anexo 6. Tinción gram.....	68
Anexo 7. Formulario de recolección de datos.....	69
Anexo 8. Fotografías.....	70
Fotografía 1. Cultivo de hisopado faringeo con presencia de flora normal.....	70
Fotografía 2. Cultivo de hisopado faringeo con presencia de flora patógena.....	70

Resumen

El presente estudio evaluó la eficacia de medios de cultivo alternativos: *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados (ASHGL)*, *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica (ASH-GLA)* y *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos sin lavado (ASH)*, para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico en pacientes con diagnóstico clínico de faringoamigdalitis, frente al agar sangre de carnero como prueba de referencia a las 24 y 48 horas de incubación. Debido a que con frecuencia en los laboratorios de Bacteriología Clínica, utilizan sangre humana como alternativa de la sangre de carnero, en la preparación de medios de cultivo. Se realizó un estudio con diseño de test diagnóstico, longitudinal y prospectivo en 100 muestras de hisopado faríngeo de pacientes que acuden al laboratorio del SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008. Los resultados revelaron que los tres medios evaluados alcanzaron 100 % de especificidad y valor predictivo positivo a las 24 y 48 horas de incubación. En cuanto a la sensibilidad y valor predictivo negativo, el medio de cultivo *ASHGL*, presentó los valores más altos alcanzando 100% de sensibilidad y valor predictivo negativo a las 48 horas de incubación. El *ASH*, le sigue con una sensibilidad a las 48 horas de 86% y un valor predictivo negativo a las 48 horas de 98%. Por lo tanto, se concluye que la incubación por 48 horas permite un mayor número de aislamientos y que el medio de cultivo más eficaz es el *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados*, por sus excelentes resultados, que lo hacen tan eficaz como el Agar Sangre de Carnero.

Palabras clave: Faringoamigdalitis, azida sodica, beta hemolítico, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo.

Abstract

The present study evaluated the effectiveness of alternative culture mediums: *Blood Agar whit washed human red blood cells* (ASHGL), *Blood Agar with washed human red blood cells more sodium azide* (ASH-GLA) and *Blood Agar with human red blood cells without washing* (ASH), for the isolation of beta hemolytic *Streptococcus pyogenes* in patients with clinical diagnosis of pharyngitis, against the sheep blood agar like reference test at 24 and 48 hours of incubation. Because frequently in clinical bacteriology laboratories, they use human blood like alternative to the sheep blood, for the preparation of culture medium. The study was realised with design of diagnostic test, longitudinal and prospective in 100 samples of pharyngeal swabs from patients attending the laboratory SELADIS during July to December 2008. The results revealed that the three evaluated mediums reached 100% of specificity and positive predictive value at 24 and 48 hours of incubation. In terms of sensitivity and negative predictive value, the culture medium ASHGL presented the highest values with 100% sensitivity and negative predictive value at 48 hours of incubation. The ASH, follows with a sensitivity of 86% at 48 hours and a negative predictive value of 98% at 48 hours. Therefore, we conclude that the incubation for 48 hours allows a larger number of isolates and the most effective culture medium is *Blood Agar whit washed human red blood cells*, for their excellent results, making it as effective as sheep blood agar.

Keywords: Pharyngitis, sodium azide, beta hemolytic, positive predictive value, negative predictive value.

1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la actualidad, uno de los mayores problemas de Salud Pública en el mundo, es la elevada prevalencia de bacterias causantes de enfermedades humanas y el creciente número de bacterias resistentes a los antimicrobianos. Las infecciones del tracto respiratorio son las más frecuentes y se caracterizan por producir una elevada mortalidad al ser un punto de encuentro entre el ser humano interno y el medio exterior, lo que motivan numerosas consultas médicas y ocasionan una gran parte de las prescripciones de antimicrobianos.

La faringoamigdalitis es la que muestra mayor importancia, es frecuente en la población pediátrica como también en adolescentes y adultos jóvenes, es más prevalente en climas fríos y en los periodos de invierno y primavera por lo que en nuestra ciudad esta situación se hace más preocupante.

Múltiples agentes virales y bacterianos son capaces de producir faringoamigdalitis, la infección se caracteriza por ser generalmente una enfermedad benigna y de curso autolimitado cuando es de etiología viral, pero cuando es de origen bacteriano este suele ser más complejo. *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico del grupo A es el principal agente etiológico de las faringoamigdalitis bacterianas. Motivo por el cual es muy importante un diagnóstico en forma correcta y oportuna, para iniciar un tratamiento adecuado que resuelva el problema, pero principalmente para prevenir las posteriores complicaciones de la infección como lo son las complicaciones supuradas y no supuradas (fiebre reumática, glomerulonefritis).

El cultivo de hisopado faringeo en agar sangre con 5 % sangre de carnero es el método estándar de referencia para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* por su elevada sensibilidad y especificidad, a pesar del tiempo que demanda su realización de 48 a 72 horas, es recomendada en diferentes normas y opiniones de expertos. Sin embargo deben cumplirse las condiciones adecuadas para el cultivo ya que estas son bacterias de difícil aislamiento y se deben tomar todas las precauciones para evitar reportar resultados erróneos, principalmente resultados falsos negativos, que confunden al médico tratante y pueden llevar a complicaciones de la infección, que en algunos casos son fatales.

Una falencia que se ha visto con frecuencia en los centros de salud de nuestra ciudad y del país, es que en los laboratorios de Bacteriología Clínica se utiliza como alternativa de la sangre de carnero, la sangre humana en la preparación del agar sangre. La sangre de carnero es recomendada por normas nacionales e internacionales, pero por su elevado costo y difícil acceso se busco una alternativa como la sangre humana que es más accesible, pero el uso de sangre humana puede afectar el resultado de la prueba en cierta magnitud, ya que tiene en su composición elementos que pueden interferir con el normal desarrollo de *Streptococcus pyogenes*.

Por lo tanto, en este estudio con el objetivo de encontrar alternativas para el diagnostico de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico, se evaluaron medios de cultivo utilizando sangre humana, pero con algunas modificaciones que permiten aumentar su eficacia y de esta forma conocer el alcance de cada uno en cuanto a su sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

1.1 ANTECEDENTES

La faringoamigdalitis es una de las infecciones del tracto respiratorio más frecuente, su incidencia es mayor en sectores sociales más desfavorecidos como respuesta a una dieta, vivienda y condiciones generales de pobreza, el invierno y el comienzo de la primavera son las épocas del año más propicias.¹ Un diagnóstico preciso es de gran importancia cuando el agente causal es *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico, principalmente por las complicaciones que se pueden presentar (complicaciones supuradas y no supuradas).²

En Chile un estudio de Cofre y colaboradores en el 2005, indica que la mayoría de los casos de faringoamigdalitis son de etiología viral y el resto es de etiología bacteriana, dentro de las causas bacterianas más frecuentes *Streptococcus pyogenes* es la principal, siendo responsable de 15 a 30 % de la faringoamigdalitis agudas en niños y de 5 a 10 % en adultos.³

Un estudio realizado en el Hospital del Niño de La Paz en nuestro país en 1998, muestra que dentro de los agentes etiológicos bacterianos que producen faringoamigdalitis, *Streptococcus pyogenes* es el agente más frecuente con un 56.6 %.²

Bisno y colaboradores indican que en ausencia de complicaciones, la faringoamigdalitis estreptocócica se autolimita, sin embargo casi siempre reciben tratamiento antimicrobiano luego de un cultivo positivo. Alrededor de 15 % de los individuos con faringoamigdalitis estreptocócica puede convertirse en portadores asintomáticos y ser susceptibles a complicaciones estreptocócicas.³

Fica en un estudio realizado en Chile el 2002, muestra que el diagnóstico clínico de faringoamigdalitis presenta una baja especificidad, debido a que solo el 10 a 30 % son casos de faringoamigdalitis estreptocócica, por lo que se debe realizar un prueba de diagnóstico microbiológico el cual es el cultivo de hisopado faríngeo en agar sangre de carnero, que realizado en forma correcta tiene una sensibilidad de 90 a 95 % y es considerado como patrón de referencia diagnóstica.⁵

En el 2006 Chávez y colaboradores en el Perú realizan un estudio donde indican que el cultivo de hisopado faríngeo realizado en agar sangre humana permite el aislamiento de *Streptococcus*

pyogenes al igual que el agar sangre de carnero, mostrando de este modo que el agar sangre humana puede ser usado como una alternativa.⁴

En nuestro país no se tienen estudios relacionados con la evaluación de medios de cultivo para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, por lo que no se tienen antecedentes publicados, siendo por lo tanto este trabajo de los primeros que se realizan.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La faringoamigdalitis representa para todos los países un importante problema de salud que motivan numerosas consultas médicas y ocasionan una gran parte de las prescripciones de antimicrobianos, es frecuente en la población pediátrica como también en adolescentes y adultos jóvenes, más prevalente en climas fríos y en los periodos de invierno y primavera, por lo que en nuestra ciudad esta situación se hace más preocupante.

La faringoamigdalitis es de etiología viral y bacteriana, donde el principal agente causal bacteriano es *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico del grupo A, responsable del 10 a 30% de los casos de faringoamigdalitis. Motivo por el cual se debe realizar un diagnóstico preciso en forma correcta y oportuna, y así iniciar el tratamiento adecuado para aliviar los signos y síntomas del paciente, para reducir la transmisión a los contactos más cercanos, para minimizar los efectos adversos de los antimicrobianos administrados y la posible resistencia que esta puede generar ante un diagnóstico erróneo, pero principalmente para prevenir las posteriores complicaciones de la infección como lo son las complicaciones supuradas y no supuradas (fiebre reumática, glomerulonefritis) que presentan elevadas tasas de mortalidad.

El cultivo en agar con 5 % de sangre de carnero es el método estándar para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* en la faringe, pero cuando no se cumplen las condiciones adecuadas en el cultivo se cometen errores al emitir resultados. Se pueden presentar resultados falsos positivos y falsos negativos que son fatales para el paciente, cuando existen complicaciones de la infección.

Los resultados falsos positivos pueden deberse a el aislamiento de Estreptococos beta hemolíticos de otros grupos, también al aislamiento de *Arcanobacterium haemolyticum* o *Haemophilus haemolyticus* que presentan colonias parecidas a *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico en el cultivo, que se dan cuando no se aplican pruebas complementarias que confirmen una acertada identificación.

También se presentan resultados falsos negativos por las características de *Streptococcus pyogenes*, que es una bacteria nutricionalmente exigente y de difícil aislamiento, igualmente se puede deber a una mala toma de muestra, un mal procesamiento de la muestra, una incubación breve (menos de 48 horas), presencia de cepas no hemolíticas de *Streptococcus pyogenes* o

por el uso de medios de cultivo alternativos, como el uso de sangre humana en vez de sangre de carnero. Este último es el tema donde se centra este estudio.

La sangre de carnero es recomendada por normas nacionales e internacionales en la preparación del agar sangre, pero por su elevado costo y difícil accesibilidad, solo laboratorios de referencia e investigación la utilizan, ya que cuentan con ambientes óptimos y presupuesto necesario. Además, con frecuencia en los laboratorios de Bacteriología Clínica, se ha visto que utilizan sangre humana como alternativa en la preparación del agar sangre. Sin embargo el uso de la sangre humana puede afectar el resultado de la prueba en cierta magnitud, ya que la sangre humana tiene en el plasma elementos (inmunoglobulinas, complemento, etc) que pueden interferir con el normal crecimiento de *Streptococcus pyogenes*, del mismo modo el anticoagulante con el cual fue obtenida la sangre humana puede interferir con la prueba. Motivo por el cual este estudio evalúa medios de cultivo utilizando sangre humana, para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico.

1.3 JUSTIFICACIÓN

La mejor herramienta diagnóstica de la faringoamigdalitis estreptocócica aun permanece en debate, con diferentes opciones, debido a la magnitud de este problema y a las implicaciones de eficacia y costo.

Las opciones incluyen el diagnóstico clínico sin estudio bacteriológico, el cual tiene una baja especificidad y se corre el riesgo de un tratamiento antimicrobiano inadecuado o innecesario. La confirmación bacteriológica por el cultivo de hisopado faríngeo a pesar del tiempo que demanda su realización de 48 a 72 horas, es recomendada en diferentes normas y por opiniones de expertos. También se utilizan pruebas diagnósticas rápidas pero estas tienen una baja sensibilidad y un resultado negativo debe ser confirmado mediante cultivo, y además tienen un mayor costo.

El cultivo de hisopado faríngeo en agar sangre con 5 % sangre de carnero es el método de referencia o patrón de oro (gold standard) para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* por su elevada sensibilidad y especificidad, sin embargo deben cumplirse las condiciones adecuadas para el cultivo ya que estas son bacterias de difícil aislamiento y se deben tomar todas las precauciones para evitar reportar resultados erróneos, principalmente resultados falsos negativos.

Con frecuencia en los centros de salud de nuestra ciudad y del país se ha observado que los laboratorios de Bacteriología Clínica, utilizan como alternativa de la sangre de carnero, la sangre humana en la preparación del medio de cultivo agar sangre, debido a que la sangre humana es más accesible y no tiene costo. Por lo tanto en esta investigación con el objetivo de evaluar estas alternativas, para el diagnóstico de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico se evaluaron medios de cultivo utilizando sangre humana, pero con algunas modificaciones como el uso glóbulos rojos lavados y otras modificaciones, con el fin de establecer las mejores condiciones para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*.

Los medios de cultivo evaluados son agar sangre humana con glóbulos rojos lavados, agar sangre humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica y agar sangre humana con glóbulos rojos sin lavado, utilizando el agar sangre de carnero como prueba de referencia o patrón de oro (gold standard).

En este sentido la evaluación de los medios de cultivo alternativos, permite determinar los alcances de cada uno en cuanto a su sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Conociendo la eficacia de los medios de cultivo, se pretende dar una alternativa confiable que permita introducir estos métodos en el trabajo de rutina del laboratorio de Bacteriología Clínica, cuando no se tiene sangre de carnero y de esta manera evitar dar un diagnóstico erróneo, principalmente evitar reportar resultados falsos negativos.

1.4 MARCO TEÓRICO

1.4.1 CONCEPTO

Las infecciones del tracto respiratorio superior son las más frecuentes y se caracterizan por producir una elevada mortalidad al ser un punto de encuentro entre el ser humano interno y el medio exterior.⁵

Las vías aéreas superiores están constituidos por la nasofaringe y la orofaringe, que se encuentran comunicadas con los senos paranasales y el oído medio y están colonizados por una flora bacteriana constituida por más de 200 especies que producen infecciones a ese nivel, las más frecuentes son faringitis, faringoamigdalitis, sinusitis, otitis, infecciones diftericas, tos ferina y angina de Vincent.⁶

La infección de la orofaringe o nasofaringe constituye una de las principales causas de consulta médica y uso de antibióticos en la atención primaria. Múltiples agentes virales y bacterianos son capaces de producir faringoamigdalitis, la infección se caracteriza por ser generalmente una enfermedad benigna y de curso autolimitado.⁷

La faringitis ó amigdalitis, es un proceso inflamatorio difuso de los folículos linfoides de la faringe, con participación de la mucosa y de las estructuras subyacentes.^{5,6} Dada la continuidad anatómica suelen afectarse zonas contiguas tales como las amígdalas (adenoiditis, tonsilitis o amigdalitis), la mucosa nasal (rinitis), la úvula y el paladar blando. Por efectos prácticos de signos, síntomas y etiología, en la práctica clínica se engloba este proceso como faringoamigdalitis.⁸

El 60 a 80 % de pacientes con faringoamigdalitis obedecen a una etiología viral. Los virus involucrados más frecuentemente son *Rhinovirus*, *Adenovirus*, *Parainfluenza*, *Virus respiratorio sincitial*, *Virus herpes simple*, el *Virus Epstein-Barr* es un agente frecuente de faringitis y generalmente se manifiesta con las características clínicas de una mononucleosis infecciosa. Enfermedades sistémicas como *Citomegalovirus* e *Influenza* entre otras, pueden estar asociadas a faringitis aguda, como también la primoinfección del *Virus de la inmunodeficiencia humana* (VIH).^{5,9}

El 20 a 40 % de las faringoamigdalitis son de origen bacteriano, la causa bacteriana más frecuente y susceptible de ser tratada con antimicrobianos, es *Streptococcus pyogenes* beta-hemolítico del grupo A de Lancefield, en niños alcanza una frecuencia de 15 a 30% y en adultos de 5 a 10%.⁹

Otros microorganismos también pueden producir un cuadro de faringoamigdalitis bacteriana, pero se detectan con menos frecuencia, entre ellos se encuentran estreptococos beta hemolíticos del grupo C y G, *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Arcanobacterium haemolyticum* (adolescentes) y *Staphylococcus aureus*.^{9,10}

Debido a la importancia para este estudio, desde un punto de vista clínico, diagnóstico y terapéutico nos concentraremos fundamentalmente en la faringoamigdalitis por *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico del grupo A.

1.4.2 FARINGITIS ESTREPTOCOCICA

Streptococcus pyogenes beta hemolítico del grupo A se presenta microscópicamente como células esféricas de 0.6 – 1.0 um de diámetro, se agrupan en forma de cocos en cadenas de longitud variable en muestras clínicas o cuando crecen en medios líquidos enriquecidos. Tienen una pared celular gram positiva, son inmóviles, no formadores de esporas, catalasa negativos y anaerobios facultativos.¹¹

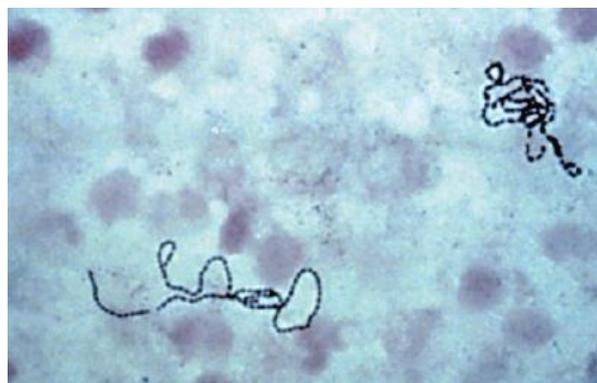


Fig. 1. Tinción gram de *Streptococcus pyogenes* en muestra de hisopado faringeo.

Los estreptococos pueden diferenciarse de forma más precisa en serogrupos en función a las características antigénicas de los hidratos de carbono de la pared celular, esta clasificación realizada por Rebeca Lancefield permite distinguir 18 grupos de la A a H y K a T, los más importantes son los grupos A, B, C, D, F y G donde *Streptococcus pyogenes* pertenece al grupo A.^{12,13}

Nutricionalmente son bacterias exigentes, requieren medios complejos enriquecidos con sangre para su desarrollo óptimo. En agar sangre crecen formando colonias traslucidas o transparentes de superficie lisa, de 0.3 a 0.5 mm de diámetro con un halo beta hemolítico alrededor.¹³

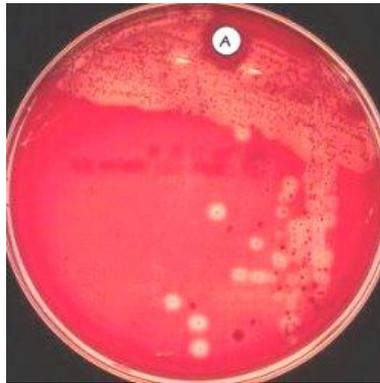


Fig. 2. Desarrollo de colonias beta hemolíticas de *Streptococcus pyogenes* en agar sangre de carnero.

1.4.2.1 FACTORES DE VIRULENCIA

Se han identificado un gran número de componentes estructurales y productos extracelulares en *Streptococcus pyogenes*.

Entre los componentes estructurales tenemos:

a) Capsula de ácido hialurónico, es la capa más superficial del microorganismo, es un polímero lineal de alto peso molecular compuesto por unidades repetidas de disacáridos. Desde el punto de vista químico es indistinguible del material fundamental del tejido conectivo lo que explica la falta de inmunogenicidad de la capsula, dificultando su fagocitosis, la producción de capsula es máxima durante la fase de crecimiento logarítmico.¹⁴

b) La pared celular, esta formado por un peptidoglucano grueso junto con los ácidos lipoteicoicos integrales. Recientes estudios demuestran que los ácidos lipoteicoicos integrales desempeñan un papel importante en la adherencia inicial a las células epiteliales faringeadas.^{13,14}

c) El carbohidrato específico de grupo (carbohidrato C), constituido por un dímero de ramnosa y N-acetil glucosamina.¹⁴

d) La proteína M de la pared celular, constituye el mayor factor de virulencia. Es de estructura fibrilar, se encuentra como un dímero estable formando un complejo entre ellas, en configuración alfa hélice. Se encuentra anclada a la membrana celular y atraviesa la pared celular. Las cepas con abundante proteína M se multiplican rápidamente ya que pueden eludir la fagocitosis interfiriendo en la opsonización a través de la inhibición de la activación de la vía alterna de la cascada del complemento. La proteína M también tiene la habilidad de precipitar fibrinógeno directamente en la superficie bacteriana. Las cepas que no expresan la proteína M son avirulentas. El efecto antifagocítico es anulado en presencia de concentraciones adecuadas de anticuerpos tipo-específicos.^{13, 15}

e) El factor de opacificación del suero (FO), es otro antígeno de la superficie celular asociado a la proteína M. El FO es una alfa-lipoproteínasa capaz de opacificar el suero de mamífero. Pero no todas las cepas tipificables por la proteína M poseen este factor. El FO es antigénico y tipo-específico, por que su habilidad de opacificar el suero puede ser inhibida por anticuerpos homólogos y no heterólogos de la proteína M. Este factor es importante principalmente por dos razones:

- Es un marcador epidemiológico muy útil que ayuda en la clasificación de los estreptococos cuando no es detectable por la proteína M.
- La respuesta tipo-específica y no específica a la proteína M es generalmente más débil después de una infección faríngea con FO positivo que con serotipos negativos.^{13,16}

f) Las proteínas T y R son otro complejo antigénico que no interviene en la patogenicidad bacteriana, pero son útiles para completar la tipificación de estreptococos, en especial en cepas no identificables por la proteína M.¹³

g) La proteína F no fibrilar, juega un rol crítico en el inicio de la colonización, se adhiere a la fibronectina, que es una glucoproteína situada en la superficie de las células epiteliales humanas.

h) Recientemente se ha descrito una peptidasa unida a la célula que cliva el componente C5 del complemento e inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos *in vitro* e *in vivo*.¹⁰

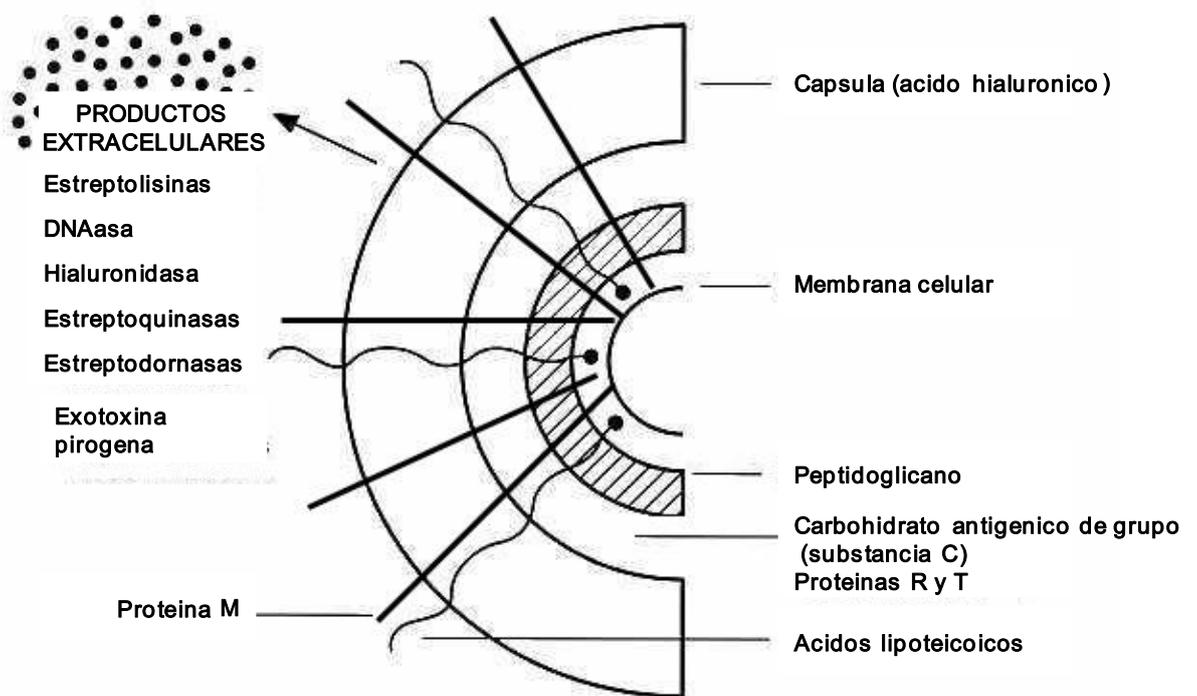


Fig. 3. Factores de virulencia de la estructura de la pared celular de *Streptococcus pyogenes* y productos extracelulares.

Streptococcus pyogenes elabora numerosos productos extracelulares, de los cuales solo un número limitado han sido bien caracterizados.

a) Hemolisinas: Producen dos tipos de hemolisinas, la estreptolisina O y la estreptolisina S.

La estreptolisina O, deriva su nombre por su labilidad al oxígeno, es inhibida por el oxígeno de forma reversible y por el colesterol en forma irreversible; además de su efecto lítico sobre

los eritrocitos es toxica para distintos tipos celulares como leucocitos, monocitos y células en cultivo. Por su labilidad al oxígeno esta hemolisina es responsable de la beta hemólisis por debajo de la colonia y en los sitios de picado en el agar sangre. La estreptolisina O es producida por casi todas las cepas *S. pyogenes* (grupo A) y también por algunos estreptococos de los grupos C y G. Como respuesta del sistema inmune se produce un anticuerpo después de una infección por cualquier estreptococo productor de estreptolisina O (ASTO), dicho anticuerpo bloquea la hemólisis por estreptolisina O y este fenómeno proporciona las bases para la determinación del anticuerpo en el suero de los pacientes. Un título de antiestreptolisina O (ASTO), por arriba de 160 UI/ml, se considera elevado y sugiere una infección reciente por *S. pyogenes*. Los anticuerpos (ASTO), son de tipo IgG.^{13,15}

La estreptolisina S, producida por estreptococos en presencia de suero o de otras sustancias como albúmina, alfa-lipoproteína, RNA. Es estable al oxígeno pero termolábil, no es antigénico y al igual que la estreptolisina O es toxica para distintos tipos celulares. Por sus características es responsable de la hemólisis que se observa en las placas de agar sangre alrededor y por debajo de la colonia.^{13,17}

b) La exotoxina pirógena estreptocócica (SPE), antes conocida como toxina eritrogenica, es responsable de la erupción de la escarlatina. Experimentalmente esta sustancia exhibe una variedad de otras propiedades toxicas incluyendo pirogenicidad y citotoxicidad. Se conocen 10 toxinas serologicamente diferentes (A - J), cuyos efectos pueden ser neutralizados por anticuerpos.¹³

c) Muchos productos extracelulares, pueden favorecer la licuefacción del pus y la diseminación de *S. pyogenes* a través de los diferentes planos titulares, estos incluyen:

- Enzimas antigenicamente distintas que degradan al DNA: DNAsas A, B, C y D.

- Hialuronidasa, que degrada enzimáticamente al ácido hialurónico del tejido conectivo.

- Estreptoquinasa, que promueve la disolución de coágulos al catalizar la conversión de plasminogeno en plasmina.

- Otros productos extracelulares son: NADAsas, proteinasas, amilasa y esterasa.¹⁸

1.4.2.2 MANIFESTACIONES CLINICAS

La transmisión de la faringoamigdalitis estreptocócica se da por contacto estrecho persona - persona por vía aérea, a través de las secreciones, generándose brotes pequeños en grupos cerrados o semicerrados y puede alcanzar una frecuencia de hasta el 30% en los meses fríos.¹⁸

Las manifestaciones clínicas se presentan luego de un periodo de incubación inicial de 2 a 4 días, el inicio suele ser súbito con fiebre, odinofagia, cefalea, malestar general y dolor abdominal.¹³

En el examen físico se puede encontrar congestión de la faringe y amígdalas con o sin exudado blanco grisáceo, los ganglios linfáticos cervicales anteriores habitualmente son dolorosas a la palpación y están tumefactos. La infección por cepas que elaboran las exotoxinas pirógenas A, B o C pueden producir una erupción escarlatiniforme en pacientes que no poseen anticuerpos anti-toxina, característicamente la erupción aparece a las 24 a 48 horas después del inicio de los síntomas y luego de 3 a 4 días comienza a desaparecer seguido por descamación de la piel. La presencia de rinorrea, disfonía, tos o diarrea no son manifestaciones producidas por *Streptococcus pyogenes* y sugieren una etiología viral o por micoplasmas. No existen elementos de la historia del paciente o examen físico capaces por sí solos de hacer el diagnóstico seguro. En ausencia de complicaciones la faringitis estreptocócica es autolimitada, pero casi siempre se realiza tratamiento antimicrobiano al paciente. Sin embargo alrededor del 15% de los individuos con faringitis estreptocócica pueden convertirse en portadores asintomático luego del tratamiento.^{13,19}

1.4.2.3 COMPLICACIONES

La faringitis estreptocócica puede originar complicaciones, clásicamente se describen 2 tipos de complicaciones: supuradas y no supuradas.

1.4.2.3.1 COMPLICACIONES SUPURADAS

Las complicaciones supuradas son el resultado de la invasión del microorganismo a estructuras adyacentes e incluye el absceso periamigdalino, absceso retrofaríngeo, adenitis cervical supurada, sinusitis, otitis media, mastoiditis y bacteriemia.¹³

1.4.2.3.1.1 Infecciones cutáneas

Impetigo. Ocurre en niños de 5 a 15 años y se caracteriza por la aparición de vesículas que evolucionan a pústulas que se abren en los 5 a 7 días siguientes para formar costras gruesas, en general estas lesiones se presentan sobre los miembros inferiores y también puede involucrarse con *Staphylococcus aureus*.¹⁹

Erisipela. Es una infección asociada con tejidos blandos y linfáticos cutáneos, se produce una inflamación aguda de la piel. Puede afectar cara, extremidades o tronco; cursa con fiebre alta, escalofríos y signos de toxicidad. Los pacientes suelen tener faringitis estreptocócica asociada, el tratamiento con penicilina es curativo.^{18,19}

Celulitis. Es una inflamación aguda extendida de la piel y el tejido subcutáneo, que puede seguir a quemaduras, heridas o incisiones quirúrgicas. Se diferencia de la erisipela por que la lesión no esta delimitada y no existe una demarcación entre las zonas afectadas. Se acompaña de fiebre, escalofríos, linfangitis y en ocasiones con bacteriemia. Suele observarse en los consumidores de drogas intravenosas.²⁰

Fascitis necrotizante. Es una infección de las fascias y tejidos subcutáneos profundos, caracterizada por una necrosis rápida y extensa. Típicamente se inicia con una lesión traumática, la inflamación se extiende y se intensifica, la piel se oscurece y se torna púrpura. Se acompaña frecuentemente de bacteriemia. Las tasas de mortalidad son altas incluso con un tratamiento adecuado.²⁰

Sepsis puerperal. Se presenta en mujeres luego del parto o un aborto, los microorganismos invaden los genitales internos y causan endometritis, linfangitis, bacteriemia, fascitis necrotizante y síndrome de shock toxico estreptocócico, también se observo la transmisión intraparto lo que conduce a una enfermedad grave y a menudo mortal en el neonato.²¹

1.4.2.3.2 COMPLICACIONES NO SUPURADAS

Las complicaciones no supuradas corresponden a la fiebre reumática y glomerulonefritis post estreptocócica.

1.4.2.3.2.1 Fiebre reumática (FR)

Se presenta 2 a 5 semanas después de una faringitis estreptocócica y se manifiesta como una enfermedad febril aguda. La FR es una colagenopatía multisistémica tardía, clínicamente se puede ver artritis migratoria de las grandes articulaciones, carditis y valvulitis, eritema marginado, nódulos subcutáneos y corea de Sydenham, los que se pueden presentar en diferentes grados de intensidad y múltiples combinaciones. Las infecciones cutáneas por *Streptococcus pyogenes* desencadenan FR. Se asocia con cepas con determinados serotipos M llamados comúnmente “cepas reumatogénicas”, estas cepas tienen la característica de no poseer el factor de opacidad y de poseer una gruesa capsula.^{18,19}

La patología cardíaca afecta el endocardio, miocardio, pericardio y más a menudo la válvula mitral, que se manifiestan clínicamente como soplos cardíacos, cardiomegalia, insuficiencia cardíaca congestiva, pocas veces se presenta paro cardíaco y muerte.

En general la artritis es migratoria, afecta múltiples articulaciones, principalmente en codos, rodillas, tobillos y muñecas.¹⁹

Las manifestaciones agudas de la FR duran de 3 a 6 meses, el diagnóstico diferencial es amplio, los hallazgos de laboratorio muestran una eritrosedimentación elevada, proteína C reactiva elevada y la detección de una infección estreptocócica previa (*S. pyogenes*) demostrada por cultivo de hisopado faríngeo y por títulos elevados o crecientes de anticuerpos antiestreptocócicos.¹³

El tratamiento consiste en la administración de penicilina G benzatínica cada 4 semanas, en paciente alérgicos se utiliza eritromicina. La duración del tratamiento está en controversia, algunos grupos opinan que no debe ser descontinuada hasta que el paciente cumpla 20 años y otros que se mantenga de manera indefinida.²⁰

El tratamiento adecuado de la faringoamigdalitis estreptocócica hasta 9 días después de iniciados los síntomas es capaz de prevenir esta complicación postestreptocócica.^{13,21}

1.4.2.3.2 Glomerulonefritis post estreptocócica

Se presenta 10 días después de una faringoamigdalitis estreptocócica y 3 a 6 semanas después de una infección cutánea por cepas de *S. pyogenes* llamadas “nefritogenas”. Es una enfermedad inflamatoria del glomérulo renal que se asocia con lesiones glomerulares difusas, hipertensión, hematuria y proteinuria.^{19,20}

Clínicamente la enfermedad se caracteriza por malestar general, anorexia, cefalea, edema y congestión circulatoria.

En general se puede demostrar el antecedente de una infección por *S. pyogenes* por el aislamiento de este en un cultivo de hisopado faringeo o lesiones de piel o por la elevación de anticuerpos antiestreptocócicos.

La han propuestos varias teorías para explicar el mecanismo por el cual se produce este cuadro, la más sostenible explica que los estreptococos inducen la formación de anticuerpos antiestreptocócicos contra los antígenos de la capsula, de la pared celular y la membrana celular que dan reacciones cruzadas con distintas porciones antigénicas en tejido cardíaco, el sarcolema miocárdico, el músculo esquelético, articulaciones y tejido renal (a nivel del glomérulo)^{13,22}

Para el tratamiento el paciente debe recibir penicilina G benzatinica para erradicar las cepas nefritogenas, el tratamiento antimicrobiano adecuado y oportuno no parece proteger completamente de esta complicación. A diferencia de la fiebre reumática no se recomienda una profilaxis continua ya que son raros los episodios de glomerulonefritis post estreptocócica recurrentes.^{13,18}

1.4.2.4 DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

Frente a la sospecha clínica, debe realizarse la confirmación etiológica. Los objetivos de un diagnóstico rápido y adecuado son:^{23,24}

- Prevenir las complicaciones supuradas y no supuradas con tratamiento antibiótico oportuno.
- Mejorar los signos y síntomas clínicos del paciente.
- Reducir la transmisión de la infección a las personas cercanas.
- Minimizar los potenciales efectos adversos derivados del uso inadecuado de antimicrobianos.

1.4.2.4.1 CULTIVO FARÍNGEO

El hisopado faríngeo cultivado en agar sangre de carnero es hasta hoy el método de referencia (gold standard) para el diagnóstico de faringoamigdalitis estreptocócica y realizado en forma correcta, tiene una sensibilidad de 90 a 95%.⁷

1.4.2.4.1.1 Obtención de la muestra

Se debe enfocar una luz brillante dentro de la cavidad bucal por encima del hombro de la persona que toma la muestra, luego se utiliza un bajalenguas para deprimir la lengua con el fin de tener una buena visualización de la faringe y amígdalas.

Se pide al paciente que respire profundamente y con un hisopo se frota con firmeza ambas amígdalas y la faringe posterior, también se debe tomar una muestra de todo el exudado purulento si existe.

Al introducir y retirar el hisopo se debe tener cuidado de no tocar las paredes laterales de la cavidad bucal o lengua para reducir al mínimo la contaminación con bacterias de la flora comensal.

Luego de la recolección de la muestra se introduce el hisopo en un tubo estéril con solución fisiológica u otro medio de transporte (conservar menos de 2 horas a temperatura ambiente).^{13,25}

1.4.2.4.1.2 Siembra

Una vez tomada la muestra se siembra en 1/3 de una placa de agar sangre de carnero y se agota en la superficie con un asa bacteriológica, haciendo cortes en profundidad de tal manera que se exprese la hemolisina O de *Streptococcus pyogenes*.

El cultivo se incuba de 35 a 37 °C y la primera lectura se hace a las 18 a 24 horas buscando colonias beta hemolíticas. Si no se han desarrollado estas colonias, se vuelve a incubar hasta las 48 horas. La incubación anaerobia y el uso de medios selectivos pueden aumentar la proporción de cultivos positivos. La incubación en CO₂ favorece el desarrollo de otros patógenos faríngeos como *Arcanobacterium haemolyticum*.^{13,26}

1.4.2.4.1.3 Interpretación del cultivo

Los estreptococos en agar sangre pueden producir tres tipos de hemólisis:

Alfa hemólisis, es la lisis parcial de los eritrocitos que rodea a una colonia, producen un cambio de color gris verdoso o parduzco en el agar sangre.

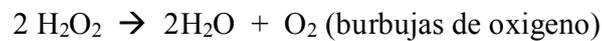
Beta hemólisis, es la lisis completa de eritrocitos, que produce una eliminación de la sangre del medio debajo de la colonia y a su alrededor.

Gama hemólisis, son colonias que no muestran hemólisis, no producen cambio en el medio debajo de las colonias y a su alrededor.

Las colonias de *S. pyogenes* son circulares, beta hemolíticas, de borde entero, de diámetro variable (0.3 a 0.5 mm). Pueden presentar tres formas: mate, brillante y mucosa. El tamaño de la zona de hemólisis es de dos a cuatro veces el diámetro de la colonia, en alguna cepas es menor; microscópicamente son cocos gram (+) en cadena.²⁶

Para diferenciar *S. pyogenes* de otros estreptococos beta hemolíticos se pueden usar distintos métodos.

Prueba de la Catalasa: La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua. Desde el punto de vista químico es una hemoproteína similar en estructura a la hemoglobina, excepto en que los 4 átomos de hierro en la molécula están en la forma oxidada en lugar de reducida. La catalasa actúa según la siguiente reacción.



Salvo los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa. En éste caso el resultado debe ser negativo, ya que ésta prueba permite diferenciar a *S. pyogenes* de *S. aureus* (posee la enzima catalasa) principalmente.¹³

Bacitracina: Esta prueba se basa en la susceptibilidad de *S. pyogenes* a la bacitracina, este antimicrobiano se une al Bactoprenol, molécula lipídica de membrana que transporta las subunidades de peptidoglicán hacia la cara externa de la membrana. La prueba se realiza mediante la colocación de un disco que contiene 0,04 U de bacitracina sobre la colonia extendida. Al día siguiente se determina la susceptibilidad a ella mediante la medición del halo de inhibición de crecimiento, cualquier zona de inhibición alrededor del disco se considera una prueba positiva. Esta técnica tiene 5% de falsos negativos y entre 10 y 20% de falsos positivos ya que hay otros estreptococos (grupos C y G), que también son susceptibles.^{13,27}

Trimetoprim-sulfametoxazol: La prueba de sensibilidad a Trimetoprim-sulfametoxazol distingue los estreptococos del grupo A y B de otros estreptococos beta hemolíticos. Cuando se utiliza junto a la bacitracina ayuda a distinguir estreptococos del grupo A y B. Las cepas A y B son resistentes a Trimetoprim-sulfametoxazol. Se utiliza un disco comercial (1,25 ug Trimetoprim y 23,75 sulfametoxazol), cualquier zona de inhibición indica sensibilidad a Trimetoprim-sulfametoxazol.¹³

Este antimicrobiano interfiere con el metabolismo del ácido fólico, que es un precursor de la síntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos, bloquea la síntesis de ácidos nucleicos y pared celular.

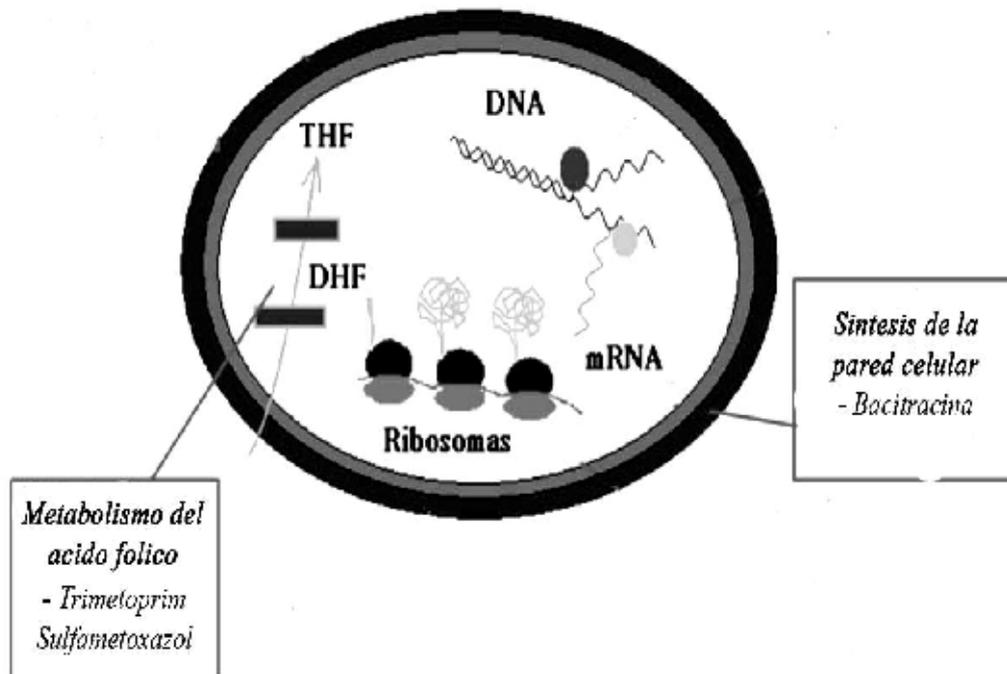
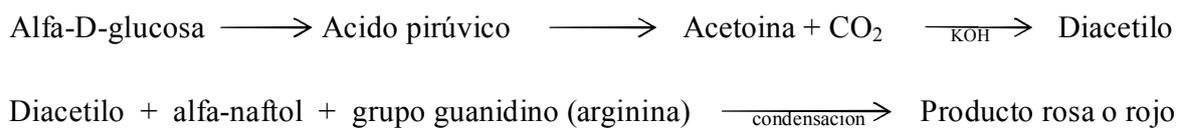


Fig. 4. Sitios de acción de los antimicrobianos Trimetoprim-sulfametoxazol y bacitracina.
 THF: Tetrahidrofolato, DHF: Dihidrofolato

Prueba de PYR: Es otro método muy utilizado y se basa en la actividad de la enzima pirrolidonil arilamidasa, el sustrato para la prueba es la *L*-pirrolidonil-beta-naftilamida libre que es hidrolizado por una aminopeptidasa específica bacteriana, la hidrólisis del sustrato por esta enzima libera beta-naftilamida libre que se detecta por el agregado *N,N*-dimetilaminocinnamaldehído, luego este reactivo de detección se une a la naftilamida para formar una base de Schiff de color rojo. Es una prueba presuntiva tanto para estreptococos del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) como del grupo D. Es producida únicamente por estos estreptococos, salvo algunos otros raramente aislados en clínica como *Aerococos*, *Estafilococos*, *Arcanobacterium haemolyticum*, por lo que es esencial comprobar que la bacteria estudiada es un estreptococo. Una gran ventaja es su rapidez de ejecución y lectura.^{13,27}

Prueba Vogues-Proskauer: El ácido pirúvico es el principal compuesto formado durante la degradación fermentativa de la glucosa, más tarde se metaboliza a través de diferentes vías metabólicas. Una de esas vías es la vía de fermentación butanediol, que da como resultado la producción de acetoina (acetil metil carbinol), en presencia de oxígeno atmosférico e hidróxido de potasio (KOH) al 40 %, la acetoina se convierte a diacetilo y el alfa-naftol sirve de catalizador para producir un complejo rojo que indica una prueba positiva. En el caso de *Streptococcus pyogenes*, el resultado es negativo para la prueba, se utiliza ante casos dudosos con otros estreptococos beta hemolíticos.¹³



1.4.2.4.2 **TECNICAS DE DETECCIÓN DIRECTA DE ANTÍGENOS**

Una desventaja del cultivo es que demora entre 2 a 3 días en entregar resultados y por eso se han desarrollado pruebas de detección rápida de antígenos.

La prueba de detección de antígenos permite detectar al carbohidrato de la pared celular bacteriana directamente, a partir de un hisopado faríngeo, con la ventaja de obtener resultados inmediatos.²² El ensayo inmunoenzimático es una alternativa altamente específica ya que existen numerosos kits comerciales disponibles, estas pruebas emplean técnicas de extracción del antígeno específico de grupo mediante un paso de extracción enzimática seguido de la detección del antígeno extraído. La mayoría de las pruebas disponibles tiene una especificidad mayor o igual a 97% comparado con el cultivo y una sensibilidad del 62% al 96%.¹³ La ventaja comparativa es el resultado inmediato, pero se recomienda realizar un cultivo de hisopado faríngeo confirmatorio ante un resultado negativo de la prueba directa y una fuerte sospecha clínica.^{7,25}

También se han utilizado técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa con sondas y sondas amplificadas de DNA, para la detección directa en muestras de hisopado faríngeo, la evaluación de este ensayo muestra una sensibilidad del 88,6% al 94,8% y especificidad del 98% al 99,7%⁹ por lo que en algunos laboratorios han sustituido el cultivo con esta prueba para la confirmación de los resultados negativos del antígeno directo.²⁸

1.4.2.5 TRATAMIENTO

El curso clínico habitual de los pacientes con faringoamigdalitis estreptocócica no complicada es la resolución de la sintomatología en tres o cuatro días. Los objetivos del tratamiento antimicrobiano son aliviar los signos y síntomas, y evitar las complicaciones supuradas y no supuradas. Sin embargo aun sin tratamiento los pacientes tenderán a la resolución espontánea de su enfermedad, pero un porcentaje de los pacientes con eventos no tratados desarrollará un cuadro de fiebre reumática u otras complicaciones.²⁹

El tratamiento antimicrobiano está indicado en pacientes con faringoamigdalitis estreptocócica confirmada por cultivo faríngeo o una prueba rápida positivo. *S. pyogenes* no ha presentado hasta ahora cepas resistentes a las penicilinas o cefalosporinas, o haber mostrado un aumento en la concentración inhibitoria mínima (CIM) en las últimas décadas, por lo tanto a pesar de su amplio uso por más de 50 años el tratamiento de elección es la penicilina. La eritromicina o alguno de los nuevos macrólidos es la elección de segunda línea y de preferencia en pacientes con hipersensibilidad a la penicilina.³⁰ Sin embargo existe una tasa de resistencia a macrólidos que esta entre 5 y 7%.⁷

En 1974 se aislaron en Japón las primeras cepas resistentes a macrólidos y de ahí han sido descritas ampliamente en la literatura, en la mayoría de las áreas ha permanecido en baja frecuencia de resistencia, pero en países como España y Finlandia ha alcanzado porcentajes superiores a 30%, lo que en varios trabajos se ha correlacionado con un mayor uso de macrólidos. En Japón se redujo el porcentaje de resistencia de 22% en 1981 a 1% en 1990, lo que ha sido atribuido a una disminución del uso de macrólidos durante ese tiempo.

S. pyogenes describe dos mecanismos de resistencia a macrólidos: modificación del sitio blanco y eflujo activo.^{31,32}

Modificación del sitio blanco. Este mecanismo se produce por la adquisición de un gen *erm* (*erythromycin ribosome methylase*) que codifica una enzima que N6 dimetila un residuo específico de adenina en el 23S rARN, produciendo un cambio conformacional en el ribosoma que disminuye la afinidad a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B, fármacos químicamente distintos pero con similar mecanismo y sitio de acción. Esta resistencia cruzada se conoce como resistencia fenotípica MLSB y se expresa en forma constitutiva o inducible.

Eflujo activo. Este mecanismo se produce por la presencia de un gen *mef* (*macrolide efflux*) que codifica la síntesis de una bomba que media el eflujo en forma activa dependiente de energía, se activa un sistema de expulsión para que la célula elimine a los macrólidos y exprese su resistencia. Este eflujo activo sólo confiere resistencia a macrólidos por lo que se conoce como resistencia fenotípica M. Es el mecanismo de resistencia más frecuentemente descrito en *S. pyogenes*.

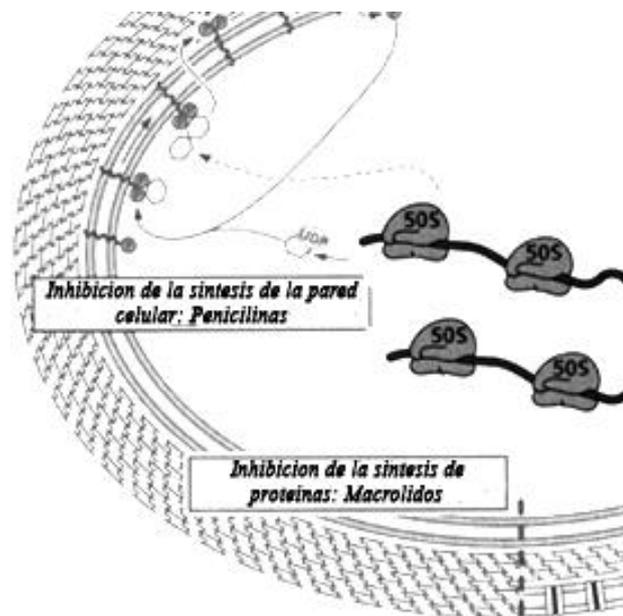


Fig. 5. Sitios de acción de las Penicilinas y Macrólidos.

El tratamiento antibiótico en faringoamigdalitis estreptocócica por antimicrobiano, dosis y duración es la siguiente:

➤ Por vía oral se administra penicilina V:

En niños: 250 mg cada 8–12 horas por 10 días,

En adolescentes y adultos: 250 mg cada 6–8 horas por 10 días o 500 mg c/ 12 horas por 10 días.

➤ Por vía Intramuscular se administra penicilina Benzatina:

Penicilina Benzatina de 1.2×10^6 U para pacientes con una masa mayor o igual a 27 kg en 1 dosis.

Penicilina Benzatina de 6 x 105 U para pacientes con una masa menor a 27 kg en 1 dosis.

➤ Para pacientes con reacciones de hipersensibilidad a la penicilina se administra por vía oral:

Eritromicina estolato 20 - 40 mg /Kg/día cada 6-12 horas por 10 días.

Eritromicina succinato 40 mg/kg/día cada 6-12 horas por 10 días.

Azitromicina 5 - 15 mg/kg/día cada 24 horas por 5 días.

Claritromicina 15 mg/kg/día cada 12 horas por 10 días.

Cefadroxilo 30 mg/kg/día cada 12 horas por 10 días.

Cefuroximo axetil 20 - 30 mg/kg/día cada 12 horas por 10 días.

Cefaclor 20 - 40 mg/kg/día cada 8-12 horas por 10 días.

Cefprozil 15 - 30 mg/kg/día cada 12 horas por 10 días.

Clindamicina 10 - 20 mg/kg/ día cada 6-8 horas por 10 días.

La amoxicilina puede ser utilizada en lugar de la penicilina oral en niños pequeños debido a su mejor tolerancia y no por ventajas microbiológicas.³³

1.4.2.6 PORTACIÓN, FRACASO DE TRATAMIENTO Y REINFECCIÓN

Se entiende por portador aquel paciente que en forma persistente presenta *S. pyogenes* en su faringe pero que se encuentra asintomático y sin respuesta inmune correspondiente, no se realiza tratamiento antimicrobiano en general excepto en casos con antecedentes de fiebre reumática.

Se entiende por fracaso del tratamiento a la persistencia o recurrencia de los síntomas o signos sugerentes de faringoamigdalitis estreptocócica. El fracaso real es la incapacidad de erradicar el *S. pyogenes* responsable del episodio agudo de faringoamigdalitis luego de un tratamiento antibiótico adecuado. La falla en el tratamiento con penicilina se puede atribuir a la presencia de otras bacterias productoras de beta lactamasas, un mal cumplimiento del tratamiento, una

reinfección desde una fuente cercana o por un diagnóstico erróneo asociado a la portación de *S. pyogenes*.²⁶

Los pacientes que presentan múltiples reinfecciones pueden ser portadores crónicos de *S. pyogenes* y su cuadro clínico ser provocado por otra etiología. La amigdalectomía debe ser considerada excepcionalmente y sólo en aquellos pacientes que presentan episodios frecuentes en los que se ha descartado razonablemente una portación crónica de *S. pyogenes*.³⁴

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- ❖ Evaluar medios de cultivo alternativos para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico en pacientes con diagnóstico clínico de faringoamigdalitis, utilizando el agar sangre de carnero como prueba de referencia o patrón de oro (gold standard), en muestras de hisopado faringeo de pacientes que acuden al laboratorio del SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar la sensibilidad de los medios de cultivo evaluados a las 24 horas y 48 horas de incubación.
- ❖ Determinar la especificidad de los medios de cultivo evaluados a las 24 horas y 48 horas de incubación.
- ❖ Determinar los valores predictivos positivos y negativos de los medios de cultivo evaluados a las 24 horas y 48 horas de incubación.
- ❖ Determinar que medios de cultivo evaluados son los más efectivos para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico en pacientes con faringoamigdalitis.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 DESCRIPCIÓN

El presente trabajo de investigación tiene un diseño de test diagnóstico de tipo longitudinal, prospectivo y observacional, siendo el periodo de recolección de los datos el tiempo que se demoró en alcanzar el tamaño muestral. Se realizó una evaluación de medios de cultivo para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico en pacientes con diagnóstico clínico de faringoamigdalitis, tomando en cuenta la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos de cada uno de los medios de cultivo. De esta manera se evaluó la eficacia de cada uno, con la finalidad de que los resultados de la investigación nos permitan elegir el o los medios de cultivo más adecuados.

La presente investigación se realizó en el instituto de Servicios de Laboratorio Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS) dependiente de la UMSA, en el área de Bacteriología Clínica y Micología, ubicado en la avenida Saavedra Nro. 2224, de la ciudad de La Paz, Bolivia.

3.2 TAMAÑO MUESTRAL

Se tomó como universo a todas las muestras de hisopados faringeos con diagnóstico clínico de faringoamigdalitis que mensualmente se solicitan al laboratorio de Bacteriología Clínica y Micología, que según las estadísticas del 2007 son un promedio de 35 por mes. Las unidades de observación fueron las muestras de hisopados faringeos y el tamaño muestral calculado es de 100 muestras, para un nivel de confianza del 95% y un error estándar no mayor al 5%.

3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron en el estudio muestras de hisopados faringeos de pacientes con diagnóstico clínico de faringoamigdalitis que acudieron al laboratorio del SELADIS, sin tomar en cuenta edad ni sexo.

3.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron de este estudio las muestras de pacientes que recibieron tratamiento antimicrobianos en los últimos 2 días, pacientes que no cumplían los requisitos para la toma de muestra, como pacientes que no se encontraban en ayunas o se realizaron limpieza de la boca y dientes.

3.5 VARIABLES Y SU MEDICIÓN

Se entiende por sensibilidad de la prueba a la proporción de muestras positivas correctamente identificadas por la prueba empleada.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}} \times 100$$

La especificidad es la proporción de muestras negativas correctamente identificadas por la prueba empleada.

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Positivos}} \times 100$$

El valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad que tiene el paciente de tener faringoamigdalitis por *S. pyogenes*, cuando el resultado de la prueba evaluada ha resultado positivo.

$$\text{VPP} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Positivos}} \times 100$$

El valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad que tiene el paciente de no tener faringoamigdalitis por *S. pyogenes*, cuando el resultado de la prueba evaluada es negativo.

$$\text{VPN} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Negativos}} \times 100$$

3.5.1 VARIABLE DEPENDIENTE

Se tiene como variable dependiente, la evaluación de los medios de cultivo para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*.

3.5.2 VARIABLE INDEPENDIENTE

Como variables independientes se tienen a las tasas de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de los medios de cultivo evaluados.

3.5.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	TIPO	OPERACIONALIZACIÓN		INDICADOR
		ESCALA	DESCRIPCIÓN	
Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos lavados	Cualitativa nominal dicotómica	Positivo Negativo	Presencia de colonias de <i>Streptococcus pyogenes</i> , confirmado por tinción gram, catalasa, bacitracina, TMS, PYR y VP.	Porcentaje de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos
Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica	Cualitativa nominal dicotómica	Positivo Negativo	Presencia de colonias de <i>Streptococcus pyogenes</i> , confirmado por tinción gram, catalasa, bacitracina, TMS, PYR y VP.	Porcentaje de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos
Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos sin lavado	Cualitativa nominal dicotómica	Positivo Negativo	Presencia de colonias de <i>Streptococcus pyogenes</i> , confirmado por tinción gram, catalasa, bacitracina, TMS, PYR y VP.	Porcentaje de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos
Cultivo en agar sangre de carnero	Cualitativa nominal dicotómica	Positivo Negativo	Presencia de colonias de <i>Streptococcus pyogenes</i> , confirmado por tinción gram, catalasa, bacitracina, TMS, PYR y VP.	Porcentaje de positividad

TMS: Trimetoprim/sulfametoxazol

PYR: pirrolidonil arilamidasa

VP: Vogues-Proskauer

3.6 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

MATERIALES:

- ✓ Hisopos estériles.
- ✓ Cajas petri de 10 y 20 mL.
- ✓ Tubos de ensayo con tapa rosca estériles.
- ✓ Portaobjetos.
- ✓ Asa bacteriológica.
- ✓ Aguja bacteriológica.
- ✓ Mechero bunsen.
- ✓ Matraz erlenmeyer de 200 y 500 mL.

EQUIPOS:

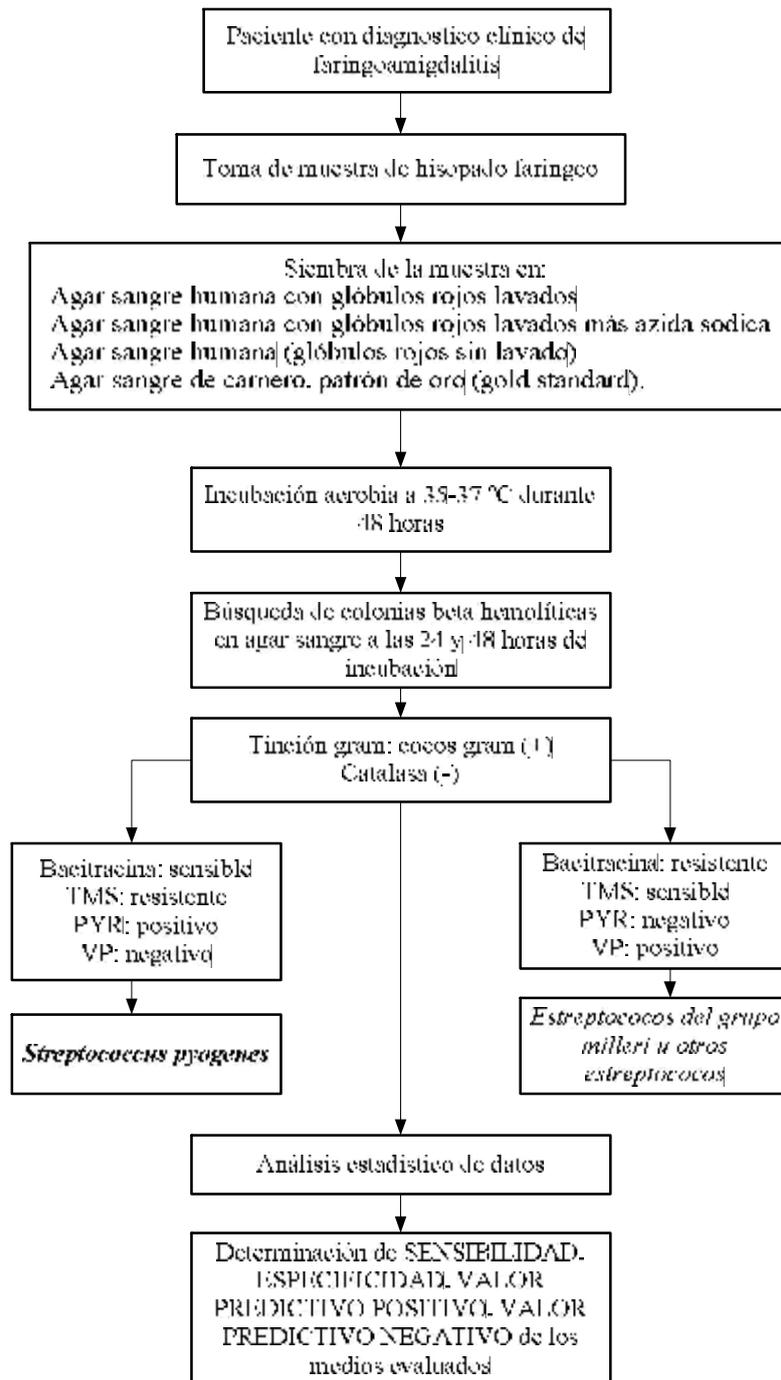
- ✓ Autoclave de vapor.
- ✓ Incubadora de 35 a 37 °C.
- ✓ Microscopio óptico.
- ✓ Refrigerador 4 °C.

REACTIVOS:

- ✓ Medio de cultivo sólido Agar Soya Trypticasa (BD Difco™ & BBL™).
- ✓ Medio de cultivo sólido Agar azida sodica (BIOBRAS S.A., Brasil).
- ✓ Discos prueba Pirrolidonil Arilamidasa PYR (Lab. W. Brizuela SA, Argentina).
- ✓ Prueba de Vogues Proskauer.

- ✓ Sangre humana obtenida con citrato de sodio.
- ✓ Sangre humana, con glóbulos rojos lavados con solución fisiológica.
- ✓ Sangre de carnero (Androgen, Bolivia).
- ✓ Solución fisiológica estéril.
- ✓ Peroxido de hidrogeno al 3 %.
- ✓ Sensidiscos de bacitracina 0.04 U (BBL™) y trimetoprim/sulfametoxazol 1.25 ug/23.75ug (Lab. Britania, Argentina).
- ✓ Bateria de tinción gram.
- ✓ Aceite de inmersión.
- ✓ Cepa *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

3.7 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS



TMS: Trimetoprim-sulfametisazol
PYR: pirrolidónil arilamidasa
VP: Voges-Proskauer

Antes de iniciar la evaluación de los medios de cultivo se utilizó una cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 beta hemolítico, como control positivo en los medios de cultivo y las pruebas de identificación complementarias.

3.7.1 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

3.7.1.1 Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados

Se preparó el medio de cultivo utilizando 5 % de sangre humana con glóbulos rojos lavados y medio de cultivo solidó Agar Soya Trypticasa (BD Difco™ & BBL™). (anexo 1)

La sangre humana fue obtenida en tubos colectoras siguiendo los protocolos de extracción de bancos de sangre, utilizando como anticoagulante citrato de sodio en una proporción 1/5,5 (1 ml citrato de sodio (3,2%) + 4.5 mL sangre fresca donante), la sangre humana utilizada pertenece a una persona clínicamente sana y que no presento antecedentes de enfermedades infecciosas de gravedad. Esta sangre fue lavada 5 veces con solución fisiológica estéril antes de su uso, para eliminar interferentes del plasma. (anexo 2)

3.7.1.2 Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica

Se preparó el medio de cultivo utilizando 5 % de sangre humana con glóbulos rojos lavados y medio de cultivo solidó Agar Azida Sodica (BIOBRAS S.A., Brasil). (anexo 3)

3.7.1.3 Agar Sangre Humana (glóbulos rojos sin lavado)

Se preparó el medio de cultivo utilizando 5 % de sangre humana con glóbulos rojos sin lavado y medio de cultivo solidó Agar Soya Trypticasa (BD Difco™ & BBL™). (anexo 4)

3.7.1.4 Agar Sangre de Carnero

Se preparó el medio de cultivo utilizando 5 % de Sangre de carnero (Androgen Bolivia) y medio de cultivo solidó Agar Soya Trypticasa (BD Difco™ & BBL™). (anexo 5)

3.7.2 TOMA DE MUESTRA

Se solicitó al paciente que coloque la cabeza en hiperextensión y se iluminó la faringe, se enfocó una luz brillante dentro de la cavidad bucal por encima del hombro de la persona que tomó la muestra, luego con un bajalenguas estéril se deprimió la lengua con el fin de tener una buena visualización de la faringe y amígdalas.

Se pidió al paciente que respire profundamente y con un hisopo se frotó con firmeza ambas amígdalas y la faringe posterior, también se tomó una muestra de todo el exudado purulento cuando hubo, se realizó esta operación 2 veces.

Al introducir y retirar el hisopo se tuvo cuidado de no tocar las paredes laterales de la cavidad bucal o lengua para reducir al mínimo la contaminación con bacterias de la flora comensal.

Luego de la recolección, para transportar la muestra se introdujeron los hisopos en un tubo estéril con medio de transporte líquido, las muestras se conservaron menos de 2 horas a temperatura ambiente antes de la siembra.

A las muestras obtenidas se les realizó los siguientes procedimientos:

3.7.3 SIEMBRA

Una vez tomada la muestra se sembró en los medios a evaluar:

Agar sangre humana con glóbulos rojos lavados.

Agar sangre humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica.

Agar sangre humana (glóbulos rojos sin lavado).

Finalmente se sembró en agar sangre de carnero, que fue utilizado como prueba de referencia o patrón de oro (gold standard).

Se sembró en 1/3 de una placa de agar sangre con el hisopo y se agotó la muestra en la superficie con un asa bacteriológica, se utilizó la técnica de agotamiento en pentágono, haciendo cortes en profundidad de tal manera que se expresen las hemolisinas de *Streptococcus pyogenes*.

Los cultivos se incubaron a una temperatura de 35 a 37 °C en atmósfera aerobia por 24 a 48 horas, la primera lectura se realizó a las 24 horas buscando colonias beta hemolíticas. Si no hubo desarrollo de estas colonias, se volvió a incubar hasta las 48 horas.

3.7.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS AISLADOS

Las colonias beta hemolíticas fueron identificadas según métodos estándares normados con los que el laboratorio cuenta:

- ❖ Tinción Gram
- ❖ Prueba de la catalasa
- ❖ Susceptibilidad a Bacitracina 0.04 U y Trimetoprim/sulfametoxazol 1.25ug/23.75ug
- ❖ Prueba PYR (Pirrolidonil Arilamidasa)
- ❖ Ante casos dudosos se completó con la prueba Vogues-Proskauer

3.7.4.1 HEMÓLISIS

Streptococcus pyogenes en agar sangre presentó colonias beta hemolíticas circulares, translucidas o transparentes y que tienen una superficie lisa o mate, de borde entero con un diámetro variable de 0.3 a 0.5 mm. El tamaño de la zona de hemólisis fue de dos a tres veces el diámetro de la colonia, en alguna cepas fue de menor tamaño.



Fig.6. Colonias de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico en agar sangre de carnero.

Para diferenciar *Streptococcus pyogenes* de otros estreptococos beta hemolíticos se utilizaron distintos métodos que mencionamos a continuación.

3.7.4.2 TINCIÓN GRAM

Se hizo un frotis delgado de la colonia en solución fisiológica estéril, se dejó secar, se fijó pasándolo a través de la llama de un mechero bunsen y se utilizó la batería para tinción gram. (anexo 6)

Se examinó el frotis teñido con aceite de inmersión con el objetivo de 100X del microscopio óptico. Microscópicamente las colonias de *Streptococcus pyogenes* se observaron como cocos gram (+) de 0.6 a 1.0 μm de diámetro, que se agrupan en forma de cocos en cadenas de longitud variable.

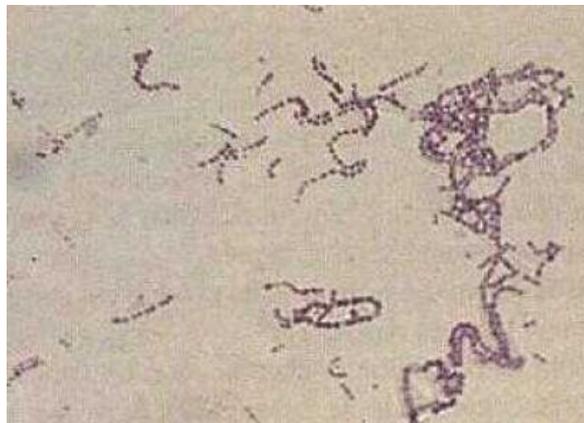


Fig.7. Tinción gram de colonia beta hemolítica de *Streptococcus pyogenes* en agar sangre.

3.7.4.3 PRUEBA DE LA CATALASA

Con una aguja de inoculación se transfirió una porción del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos de vidrio, luego se colocó una gota de H_2O_2 al 3% sobre el portaobjetos. El desprendimiento de burbujas se consideró una prueba positiva. La formación de unas pocas burbujas luego de 20 a 30 segundos no se consideró un resultado positivo, además los eritrocitos tienen catalasa por lo cual se tuvo cuidado de no arrastrarlos junto con la colonia estudiada.

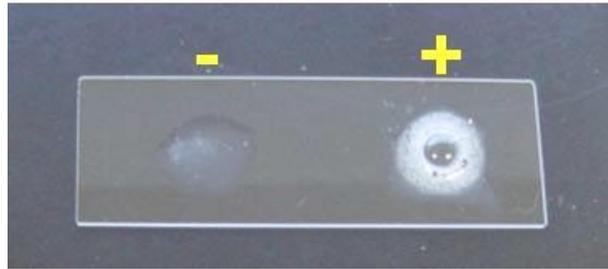


Fig.8. Prueba de la catalasa. (-) Prueba negativa para colonias de *Streptococcus pyogenes*. (+) Prueba positiva para colonias de *Staphylococcus aureus*.

3.7.4.4 BACITRACINA Y TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL

Bacitracina (A): Esta prueba se basa en la susceptibilidad de *S. pyogenes* a la bacitracina. Se realizó mediante la colocación de un disco que contiene 0,04 U de bacitracina sobre una o dos colonias extendidas en agar sangre y se incubó por 24 horas a 35 -37 °C. Se determinó la susceptibilidad a la bacitracina mediante la medición del halo de inhibición de crecimiento, cualquier zona de inhibición alrededor del disco se consideró una prueba positiva.

Trimetoprim-sulfametoxazol (TMS): La prueba de sensibilidad a Trimetoprim-sulfametoxazol diferenció los estreptococos del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) y del grupo B (*Streptococcus agalactiae*) de otros estreptococos beta hemolíticos. Se utilizó un disco comercial (1,25 ug trimetoprim y 23,75 sulfametoxazol), mediante la colocación de un disco sobre una o dos colonias extendidas en agar sangre y se incubó por 24 horas a 35 -37 °C. Cualquier zona de inhibición indicó sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol.

Cuando se utilizó junto a la bacitracina, permitió diferenciar los estreptococos según la sensibilidad (S) o resistencia (R) que presentaron, de la siguiente forma:

Bacitracina (S) y TMS (R) : *Streptococcus pyogenes* del grupo A.

Bacitracina (R) y TMS (R) : *Streptococcus agalactiae* del grupo B.

Bacitracina (R) o (S) y TMS (R) : Estreptococos beta hemolíticos de otros grupos
(grupos C, F o G).



Fig.9. Prueba de la Bacitracina y Trimetoprim/sulfametoxazol para *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico. Bacitracina (A) sensible, Trimetoprim/sulfametoxazol (TMS) resistente.

3.7.4.5 PRUEBA DE PYR (PIRROLIDONIL ARILAMIDASA)

En un tubo de ensayo se colocaron 50 uL de agua destilada estéril y se realizó una suspensión densa de la bacteria en estudio (2 a 4 escala Mc Farland), se colocó un disco PYR y se agitó el tubo hasta que el disco quedó sumergido en la suspensión. Luego se incubó de 35 a 37 °C durante 30 minutos, posteriormente se agregó al tubo una gota de la solución reveladora (Pirrolidoni-beta-naftilamina) y se observó el cambio de color del disco durante 5 minutos.

Un color rojo rosado del disco indicó una prueba positiva, si el disco no cambio de color se consideró una prueba negativa.

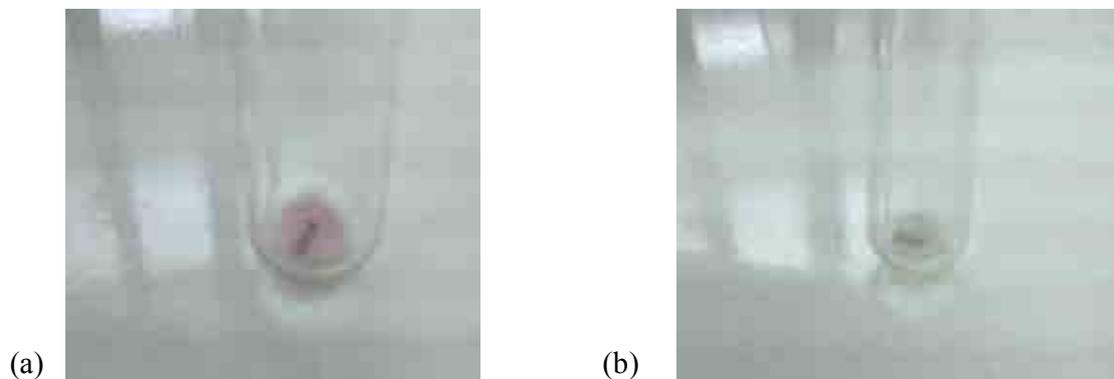


Fig.10. Prueba de PYR (Pirrolidoni Arilamidasa). (a) PYR positivo de cepa de *Streptococcus pyogenes*. (b) PYR negativo de cepa de *Staphylococcus aureus*.

3.7.4.6 PRUEBA VOGUES-PROSKAUER

Streptococcus pyogenes, es negativo para la prueba, se utilizó ante casos dudosos con otros estreptococos beta hemolíticos.

Con un asa bacteriológica se sembró en un tubo de caldo Rojo de Metilo-Vogues Proskauer, un cultivo puro del microorganismo a estudiar, se incubó 24 horas a 35-37 °C. Luego de la incubación se transfirió 1 mL del caldo a un tubo de ensayo estéril, se agregó 0.6 mL de alfa-naftol al 5% y 0.2 mL de KOH al 40% en ese orden al tubo. Se agitó suavemente el tubo para exponer el medio al oxígeno atmosférico y se dejó el tubo en reposo durante 10 a 15 minutos.

El desarrollo de un color rojo después de los 15 minutos constituyó una prueba positiva, si el medio no cambió de color se consideró una prueba negativa.



Fig.11. Prueba Vogues-Proskauer (VP). Izquierda, VP negativo de colonias de *Streptococcus pyogenes*. Derecha, VP positivo de colonias de estreptococos beta hemolíticos del grupo milleri.

3.8 INSTRUMENTOS Y TECNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Para la recolección de datos se utilizó un formulario de registro el cual fue llenado en un diario científico hasta alcanzar el tamaño muestral requerido. (anexo 7)

3.9 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Con los datos obtenidos realizando las pruebas mencionadas en los medios de cultivo evaluados, se creó una base de datos con el programa estadístico EPIDAT 3.0 y se determinaron las tasas de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos a partir de tablas 2X2.

4. RESULTADOS

Después de alcanzar el tamaño muestral deseado de 100 muestras de hisopados faringeos analizados, se obtuvieron 14 cultivos positivos y 86 cultivos negativos para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico del grupo A.

Para obtener las tasas de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los medios de cultivo evaluados, se utilizó el cultivo en agar sangre de carnero como prueba de referencia o patrón de oro (gold standard) a las 24 horas y 48 horas de incubación.

El estudio de la evaluación del medio de cultivo Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados (*ASHGL*) a las 24 horas de incubación, presentó una sensibilidad del 86 % y una especificidad del 100 %, con un valor predictivo positivo del 100 % y valor predictivo negativo del 98 %.

TABLA 1: Tasas de evaluación del *ASHGL* a las 24 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.

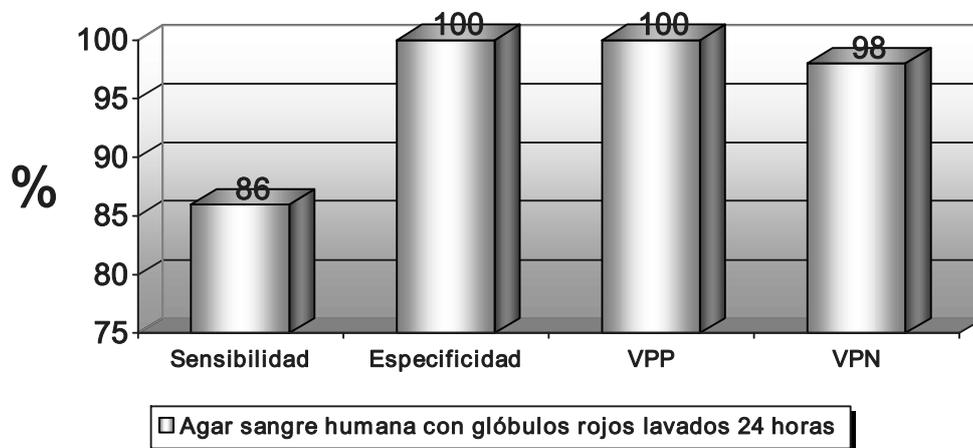
		Verdadero Diagnóstico <i>AS CARNERO</i>			TASAS	<i>ASHGL</i>	Intervalo de confianza 95 %
		cultivo(+)	Cultivo(-)	Total			
PRUEBA <i>ASHGL</i>	C(+)	12	0	12	SENSIBILIDAD	86 %	(60-100%)
	C(-)	2	86	88	ESPECIFICIDAD	100 %	(100-100%)
Total		14	86	100	VPP	100 %	(100-100%)
					VPN	98 %	(93-100%)

ASHGL: Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

GRAFICO 1: Tasas de evaluación del *ASHGL* a las 24 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.



Fuente: Tabla 1

El estudio de la evaluación del medio de cultivo Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados (*ASHGL*) a las 48 horas de incubación, presentó una sensibilidad del 86 % y una especificidad del 100 %, con un valor predictivo positivo del 100 % y valor predictivo negativo del 98 %,

TABLA 2: Tasas de evaluación del *ASHGL* a las 48 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.

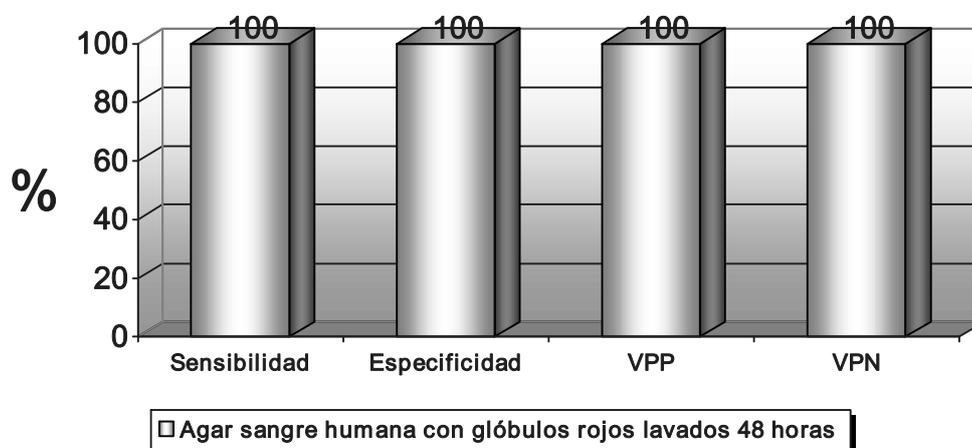
		Verdadero Diagnóstico <i>AS CARNERO</i>			TASAS	<i>ASHGL</i>	Intervalo de confianza 95 %
		cultivo(+)	Cultivo(-)	Total			
PRUEBA <i>ASHGL</i>	C(+)	14	0	14	SENSIBILIDAD	100 %	(100-100%)
	C(-)	0	86	86	ESPECIFICIDAD	100 %	(100-100%)
Total		14	86	100	VPP	100 %	(100-100%)
					VPN	100 %	(100-100%)

ASHGL: Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

GRAFICO 2: Tasas de evaluación del *ASHGL* a las 48 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.



Fuente: Tabla 2

El estudio de la evaluación del medio de cultivo Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica (*ASH-GLA*) a las 24 horas de incubación, presentó una sensibilidad del 43 % y una especificidad del 100 %, con un valor predictivo positivo del 100 % y negativo del 91 %,

TABLA 3: Tasas de evaluación del *ASH-GLA* a las 24 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.

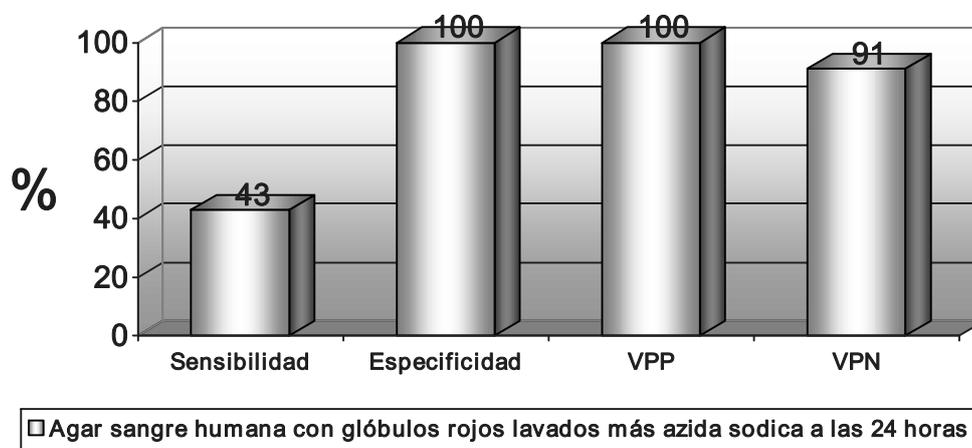
		Verdadero Diagnóstico <i>AS CARNERO</i>			TASAS	<i>ASH-GLA</i>	Intervalo de confianza 95 %
		cultivo(+)	Cultivo(-)	Total			
PRUEBA <i>ASH-GLA</i>	C(+)	6	0	6	SENSIBILIDAD	43 %	(17-69%)
	C(-)	8	86	94	ESPECIFICIDAD	100 %	(100-100%)
Total		14	86	100	VPP	100 %	(100-100%)
					VPN	91 %	(86-97%)

ASH-GLA: Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

GRAFICO 3: Tasas de evaluación del *ASH-GLA* a las 24 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.



Fuente: Tabla 3

El estudio de la evaluación del medio de cultivo Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica (*ASH-GLA*) a las 48 horas de incubación, presentó una sensibilidad del 71 % y una especificidad del 100 %, con un valor predictivo positivo del 100 % y negativo del 96 %,

TABLA 4: Tasas de evaluación del *ASH-GLA* a las 48 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.

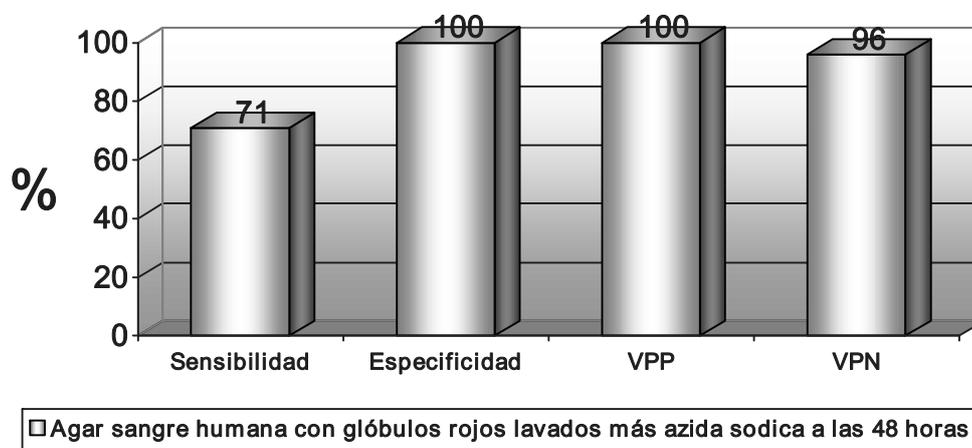
		Verdadero Diagnóstico <i>AS CARNERO</i>			TASAS	<i>ASH-GLA</i>	Intervalo de confianza 95 %
		cultivo(+)	Cultivo(-)	Total			
PRUEBA <i>ASH-GLA</i>	C(+)	10	0	10	SENSIBILIDAD	71 %	(40-100 %)
	C(-)	4	86	90	ESPECIFICIDAD	100 %	(100-100%)
Total		14	86	100	VPP	100 %	(100-100%)
					VPN	96 %	(90-100%)

ASH-GLA: Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

GRAFICO 4: Tasas de evaluación del *ASH-GLA* a las 48 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.



Fuente: Tabla 4

El estudio de la evaluación del medio de cultivo Agar Sangre Humana (glóbulos rojos sin lavado) (*ASH*) a las 24 horas de incubación, presentó una sensibilidad del 57 % y una especificidad del 100 % con un valor predictivo positivo del 100 % y negativo del 93 %,

TABLA 5: Tasas de evaluación del *ASH* a las 24 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.

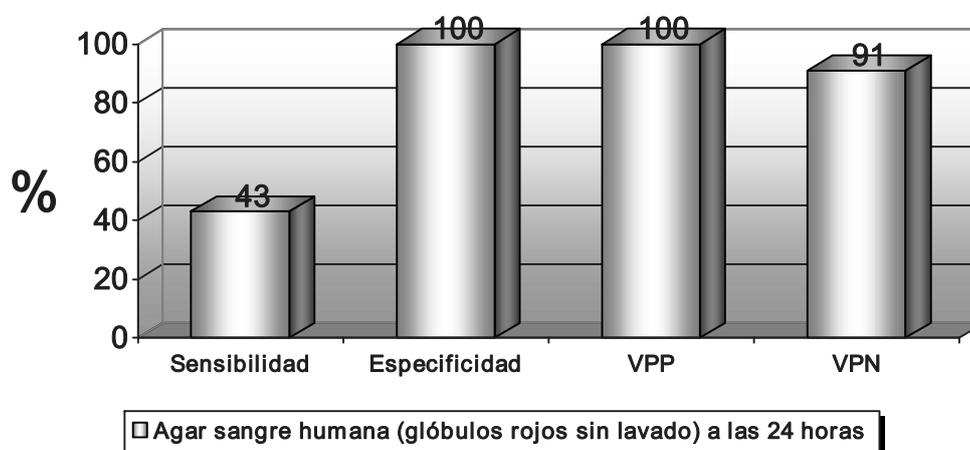
		Verdadero Diagnóstico <i>AS CARNERO</i>			TASAS	<i>ASH</i>	Intervalo de confianza 95 %
		cultivo(+)	Cultivo(-)	Total	SENSIBILIDAD	57 %	(20-94%)
PRUEBA <i>ASH</i>	C(+)	8	0	8	ESPECIFICIDAD	100 %	(100-100%)
	C(-)	6	86	92	VPP	100 %	(100-100%)
Total		14	86	100	VPN	93 %	(86-100%)

ASH: Agar Sangre Humana (glóbulos rojos sin lavado)

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

GRAFICO 5: Tasas de evaluación del *ASH* a las 24 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.



Fuente: Tabla 5

El estudio de la evaluación del medio de cultivo Agar Sangre Humana (glóbulos rojos sin lavado) (*ASH*) a las 48 horas de incubación, presentó una sensibilidad del 86 % y una especificidad del 100 % con un valor predictivo positivo del 100 % y negativo del 98 %,

TABLA 6: Tasas de evaluación del *ASH* a las 48 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.

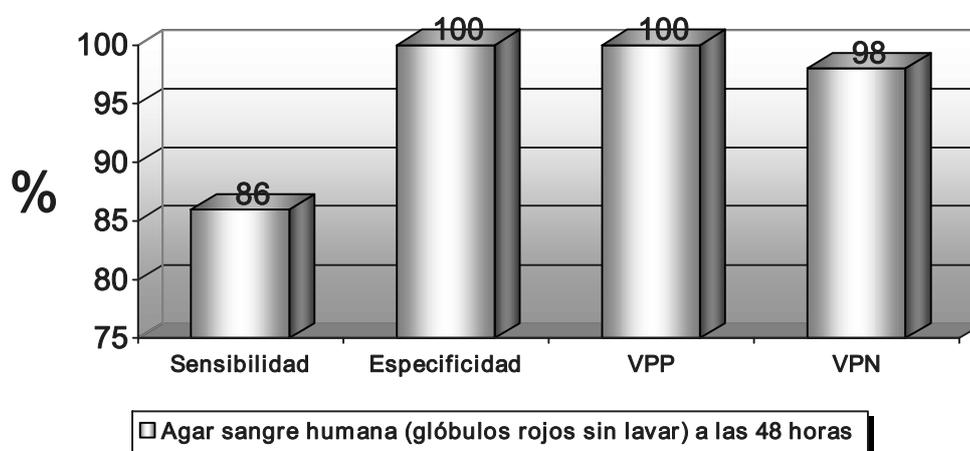
		Verdadero Diagnóstico <i>AS CARNERO</i>			TASAS	<i>ASH</i>	Intervalo de confianza 95 %
		cultivo(+)	Cultivo(-)	Total			
PRUEBA <i>ASH</i>	C(+)	12	0	12	SENSIBILIDAD	86 %	(60-100%)
	C(-)	2	86	88	ESPECIFICIDAD	100 %	(100-100%)
Total		14	86	100	VPP	100 %	(100-100%)
					VPN	98 %	(93-100%)

ASH: Agar Sangre Humana (glóbulos rojos sin lavado)

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

GRAFICO 6: Tasas de evaluación del *ASH* a las 48 horas de incubación para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*, obtenidos en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.



Fuente: Tabla 6

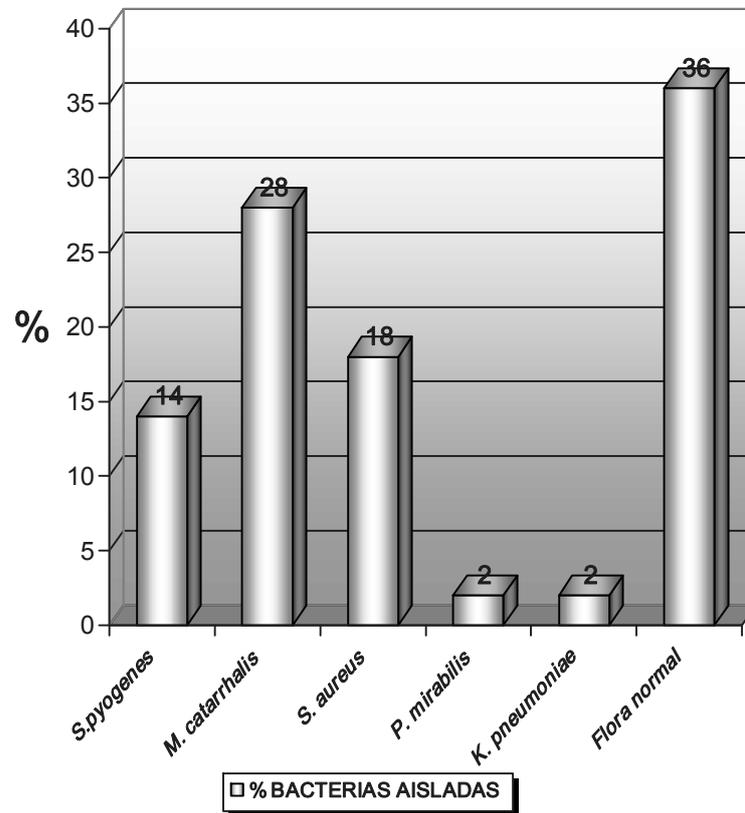
En nuestra población en estudio, la identificación mediante el cultivo de hisopado faringeo reveló 14 aislamientos de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico (14 %).

Tabla 7: Distribución de bacterias aisladas en el cultivo de hisopado faringeo, obtenido en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	n	PORCENTAJE
<i>Streptococcus pyogenes</i>	14	14 %
<i>Moraxella catarrhalis</i>	28	28 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	18 %
<i>Proteus mirabilis</i>	2	2 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2 %
Flora normal de faringe	36	36 %
TOTAL	100	100

n: número de aislamientos

Grafico 7: Distribución de bacterias aisladas en el cultivo de hisopado faringeo, obtenido en el SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2008.



Fuente: Tabla 7

5. DISCUSIÓN

El presente estudio describe el diagnóstico bacteriológico de una de las infecciones de las vías respiratorias altas, que representan para todos los países un importante problema de salud. La faringoamigdalitis, es frecuente en la población pediátrica como también se presenta en adolescentes y adultos jóvenes, es más prevalente en climas fríos y en los periodos de invierno y primavera, por lo que en nuestra ciudad esta situación se hace más preocupante por las bajas temperaturas y los cambios bruscos de temperatura.¹

El cultivo de hisopado faringeo en agar sangre con 5 % sangre de carnero es el método estándar de referencia para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* por su elevada sensibilidad y especificidad, a pesar del tiempo que demanda su realización de 48 a 72 horas, es recomendada en diferentes normas y opiniones de expertos.⁹ Sin embargo deben cumplirse las condiciones adecuadas para el cultivo, ya que *Streptococcus pyogenes* es una bacterias de difícil aislamiento y se deben tomar todas las precauciones para evitar reportar resultados erróneos, en el estudio no se presentó ningún resultado falso positivo por la elevada especificidad que tiene la prueba, pero si se encontraron resultados falsos negativos.

La evaluación de los medios de cultivo *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados*, *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica* y *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos sin lavado*, utilizando el agar sangre de carnero como patrón de oro, mostraron una mejor eficacia a las 48 horas de incubación, porque se observó un mayor número de aislamientos de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico, lo que coincide con estudios de Chávez y colaboradores⁴, además la incubación a las 48 horas reveló un aumento de la sensibilidad y valor predictivo negativo de los medios evaluados, que se debe a que existen cepas que a las 24 horas de incubación no muestran una beta hemólisis perceptible, pero a las 48 horas la hemólisis ya es evidente y permite una correcta identificación, por lo que no es recomendable dar resultados a las 24 horas de incubación, para evitar reportar falsos negativos.

Los tres medios evaluados mostraron una excelente especificidad y valor predictivo positivo a las 24 y 48 horas de incubación. El 100 % de especificidad alcanzado, nos indica que no se encontraron resultados falsos positivos, que los medios no detectaron *Streptococcus pyogenes*

beta hemolítico donde el medio de referencia tampoco lo detecto y esto gracias a que se utilizan pruebas complementarias que apoyan al cultivo (tinción gram, catalasa, bacitracina, TMS, PYR y VP) que son fundamentales para la identificación de *Streptococcus pyogenes*. Los medios también presentaron un valor predictivo positivo del 100% que muestra que la probabilidad de los pacientes de tener una faringoamigdalitis estreptocócica es del 100% cuando el resultado de una de las pruebas es positivo, salvo el caso de paciente portador asintomático de *Streptococcus pyogenes*.

El medio de cultivo *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados* presentó los más altos valores de sensibilidad y valor predictivo negativo de 86% y 98% a las 24 horas respectivamente, pero a las 48 horas estos valores aumentaron a su valor máximo del 100 %, lo que nos indica que este medio de cultivo no reporto resultados falsos negativos y aisló *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico en todas las muestras donde el medio de referencia también lo aisló, que es muy importante para el paciente ya que un tratamiento oportuno resuelve la faringoamigdalitis y evita las posteriores complicaciones post estreptocócicas.

Por los resultados presentados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos a las 48 horas de incubación, que alcanzan el 100%, el presente estudio reveló que el medio de cultivo *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados* es tan eficaz como el agar sangre de carnero para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico (tabla 1 y 2). Estudios anteriores apoyan nuestros resultados, con la diferencia que los cultivos fueron incubados en presencia de 5 % de CO₂ y la sangre humana no utilizó glóbulos rojos lavados.⁴ En cambio en nuestro estudio se utilizó sangre humana con glóbulos rojos lavados que evita la interferencia de elementos del plasma humano (anticuerpos, complemento, anticoagulante) y se incubó en condiciones aerobias, que también permite aislar otros patógenos aerobios estrictos, además de *Streptococcus pyogenes*. Lo que demuestra que el *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados* puede ser usado como una alternativa confiable.

El *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos sin lavado*, es el medio que le sigue en eficacia al *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados*, ya que muestra una sensibilidad a las 24 y 48 horas de 57% y 86% respectivamente y un valor predictivo negativo a las 24 y 48 horas de 93% y 98% respectivamente (tablas 3 y 4). Lo que demuestra que el uso de glóbulos rojos lavados aumenta la eficacia del medio de cultivo y que los elementos del plasma (anticuerpos,

complemento, anticoagulante) interfieren con el crecimiento de algunas cepas de *Streptococcus pyogenes*, por lo que este medio reportó resultados falsos negativos, aunque no son excesivos y la faringoamigdalitis puede autolimitarse, el problema se presenta cuando existe una complicación de la infección la cual generalmente es fatal, y su tratamiento es muy costoso y por tiempos muy prolongados.^{13,18,19}

El medio de cultivo *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica*, es el medio menos eficaz de los tres evaluados, ya que alcanzó una sensibilidad a las 24 y 48 horas de 43% y 71% respectivamente y un valor predictivo negativo a las 24 y 48 horas de 91% y 96% respectivamente (tablas 5 y 6). Aunque el medio contiene azida sodica el cual inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas, favorece el desarrollo de estreptococos y contiene glóbulos rojos lavados, no fue un medio eficaz como se esperaba. Esto se podría deber a que a las 24 horas incubación en la mayoría de los cultivos se presentaban demasiados resultados falsos negativos y a las 48 horas en algunos casos la hemólisis se extendía por todo el medio de cultivo haciendo más difícil y moroso identificar correctamente *Streptococcus pyogenes*, ya que algunos estreptococos alfa hemolíticos se mostraban como beta hemolíticos. También se pudo observar que en este medio de cultivo, los glóbulos rojos envejecían más rápidamente que en los otros medios evaluados, al tercer día de preparado el medio de cultivo ya presentaba un color marrón, probablemente debido a que los glóbulos rojos sufren algún daño por el azida sodica.

De los 100 cultivos de hisopado faríngeo procesados en la población estudiada, *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico fue aislado en un 14 % (tabla 7), lo que coincide con otras investigaciones.^{1,2,7,9}

6. CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que:

- ❖ Los tres medios de cultivo evaluados muestran una mejor eficacia a las 48 horas de incubación, porque se vio un aumento significativo de la sensibilidad y valor predictivo negativo.
- ❖ Al evaluar la Sensibilidad de los medios de cultivo alternativos, el que alcanzó la mayor eficacia a las 48 horas de incubación es el medio *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados*, seguido por el medio *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos sin lavado* y el menos eficaz es el medio *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica*.
- ❖ La evaluación de la Especificidad y Valor Predictivo Positivo de los medios de cultivo señalan que los tres medios mostraron excelentes resultados a las 24 y 48 horas de incubación, alcanzado los valores más altos en ambos casos.
- ❖ En cuanto al Valor Predictivo Negativo el más eficaz a las 48 horas de incubación, pertenece al medio *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados*, seguido por el medio *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos sin lavado* y el menos eficaz es el medio *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados más azida sodica*.
- ❖ Por lo tanto, luego de analizar los resultados obtenidos, el medio de cultivo de mayor eficacia para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico del grupo A en pacientes con diagnóstico de faringoamigdalitis, es el *Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados*, por sus excelentes valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

7. RECOMENDACIONES

Que el personal médico de salud solicite la realización del cultivo de hisopado faringeo ante un diagnóstico clínico de faringoamigdalitis, para no iniciar un tratamiento antimicrobiano inadecuado o innecesario y de esta forma minimizar los efectos adversos de los antimicrobianos administrados y la posible resistencia que esta puede generar. También para reducir la transmisión de la infección y fundamentalmente para prevenir las posteriores complicaciones de la infección por *Streptococcus pyogenes*.

Incluir en la rutina de trabajo de los laboratorios que no utilizan agar sangre de carnero, el uso del Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados, ya que este medio es de fácil preparación y los resultados del estudio nos muestran que es tan eficaz como el agar sangre de carnero para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico y de esta manera evitar reportar resultados falsos negativos principalmente.

Realizar un estudio de resistencia bacteriana de *Streptococcus pyogenes* a las Penicilinas, que según investigaciones anteriores no presentan resistencia hasta nuestros días y del mismo modo realizar un estudio de resistencia a los Macrolidos que han mostrado un aumento de la resistencia en los últimos años.

Realizar un estudio que evalúe y valide la eficacia del medio de cultivo Agar Sangre Humana con glóbulos rojos lavados, para el aislamiento de otras bacterias patógenas humanas, nutricionalmente exigentes, que requieran sangre en la preparación de sus medios de aislamiento.

ANEXOS

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE AGAR SANGRE HUMANA CON GLOBULOS ROJOS LAVADOS

Es un medio de aislamiento especialmente diseñado para facilitar el crecimiento de microorganismos exigentes, bacterias gram positivas y todas las especies encontradas en muestras de origen clínico.

Medios y reactivos:

- Medio de cultivo sólido Agar soya tripticasa (BD Difco™ & BBL™)
- Sangre humana con glóbulos rojos lavados

Preparación:

- En un matraz erlenmeyer disolver una proporción de 40 gramos/litro de medio de cultivo sólido Agar soya tripticasa con agua destilada o desionizada y disolver completamente calentando en hornilla.
- El medio de cultivo ya disuelto se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121 °C y una presión de 1 Kg/cm².
- Una vez autoclavados el medio se traslada a una zona estéril, para enfriarlo lentamente a una temperatura que oscila entre los 45° C +/-2°C.
- Incorporar 5 % de Sangre humana con glóbulos rojos lavados, homogenizar completamente y dispensar un volumen de 10 mL de medio por caja petri estéril.
- Guardar los medios en refrigeración a 4 °C .El medio de cultivo preparado antes de la adición de sangre es claro y amarillo parduzco, posteriormente a la adición de sangre, es del color de la misma.
- Finalmente se incuba de 35 a 37 °C por 24 horas una caja petri de medio de cultivo del lote preparado, como control de esterilidad.

ANEXO 2

LAVADO DE GLOBULOS ROJOS HUMANOS

El objetivo del lavado de los glóbulos rojos es eliminar los componentes del plasma como elementos del sistema inmune y el anticoagulante utilizado que pueden afectar el desarrollo de microorganismos en el agar sangre.

Procedimiento:

- Para evitar la contaminación de la sangre, todos los pasos del procedimiento se hacen bajo la protección de un mechero bunsen y con material estéril.
- En un tubo estéril con cierre hermético se alícuota la cantidad necesaria de sangre humana para la preparación del medio. Los glóbulos rojos son lavados con solución fisiológica estéril (0.85 % NaCl).
- Al tubo se le añade un volumen igual de solución fisiológica, se cierra herméticamente y se mezclan por inversión 5 veces.
- Luego se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos.
- Se elimina el sobrenadante con una micropipeta estéril y se le añade nuevamente un volumen igual de solución fisiológica, se mezcla por inversión y se centrifuga.
- Se repiten los últimos dos paso 5 veces, para que la sangre tenga por lo menos 5 lavados.
- Finalmente se añade al medio de cultivo estéril atemperado.

ANEXO 3

PREPARACION DE AGAR SANGRE HUMANA CON GLOBULOS ROJOS LAVADOS MAS AZIDA SODICA

Es un medio de aislamiento especialmente diseñado para facilitar el crecimiento de microorganismos exigentes y todas las especies encontradas en muestras de origen clínico. El medio contiene azida sodica el cual inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas y favorece el crecimiento de estreptococos, el azida selecciona microorganismos en cuyos procesos respiratorios están implicados los citocromos, debido que actúa como un inhibidor de la cadena respiratoria y además el medio de cultivo contiene glóbulos rojos lavados.

Medios y reactivos:

- Medio de cultivo solidó Agar azida sodica (BIOBRAS S.A., Brasil)
- Sangre humana con glóbulos rojos lavados

Preparación:

- En un matraz erlenmeyer disolver una proporción de 30 gramos/litro de medio de cultivo solidó Agar soya tripticasa con agua destilada o desionizada y disolver completamente calentando en hornilla.
- El medio de cultivo ya disuelto se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121 °C y una presión de 1 Kg/cm².
- Una vez autoclavados el medio se traslada a una zona estéril, para enfriarlo lentamente a una temperatura que oscila entre los 45° C +/-2°C.
- Incorporar 5 % de Sangre humana con glóbulos rojos lavados, homogenizar completamente y dispensar un volumen de 10 mL de medio por caja petri estéril.
- Guardar los medios en refrigeración a 4 °C .El medio de cultivo preparado antes de la adición de sangre es claro y amarillo parduzco, posteriormente a la adición de sangre, es del color de la misma.
- Finalmente se incuba de 35 a 37 °C por 24 horas una caja petri de medio de cultivo del lote preparado, como control de esterilidad.

ANEXO 4

PREPARACION DE AGAR SANGRE HUMANA:

Es un medio de aislamiento especialmente diseñado para facilitar el crecimiento de microorganismos exigentes, bacterias gram positivas y todas las especies encontradas en muestras de origen clínico.

Medios y reactivos:

- Medio de cultivo sólido Agar soya tripticasa (BD Difco™ & BBL™)
- Sangre humana (con glóbulos rojos sin lavado)

Preparación:

- En un matraz erlenmeyer disolver una proporción de 40 gramos/litro de medio de cultivo sólido Agar soya tripticasa (marca) con agua destilada o desionizada y disolver completamente calentando en hornilla.
- El medio de cultivo ya disuelto se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121 °C y una presión de 1 Kg/cm².
- Una vez autoclavados el medio se traslada a una zona estéril, para enfriarlo lentamente a una temperatura que oscila entre los 45° C +/-2°C.
- Incorporar 5 % de Sangre humana con glóbulos rojos sin lavado, homogenizar completamente y dispensar un volumen de 10 mL de medio por caja petri estéril.
- Guardar los medios en refrigeración a 4 °C .El medio de cultivo preparado antes de la adición de sangre es claro y amarillo parduzco, posteriormente a la adición de sangre, es del color de la misma.
- Finalmente se incuba de 35 a 37 °C por 24 horas una caja petri de medio de cultivo del lote preparado, como control de esterilidad.

ANEXO 5

PREPARACION DE AGAR SANGRE DE CARNERO:

Es un medio de aislamiento especialmente diseñado para facilitar el crecimiento de microorganismos exigentes, bacterias gram positivas y todas las especies encontradas en muestras de origen clínico. Es el método de referencia o patrón de oro (gold standard) para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes*.

Medios y reactivos:

- Medio de cultivo sólido Agar soya tripticasa (BD Difco™ & BBL™)
- Sangre de carnero desfibrinada (Androgen Bolivia)

Preparación:

- En un matraz erlenmeyer disolver una proporción de 40 gramos/litro de medio de cultivo sólido Agar soya tripticasa (marca) con agua destilada o desionizada y disolver completamente calentando en hornilla.
- El medio de cultivo ya disuelto se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121 °C y una presión de 1 Kg/cm².
- Una vez autoclavados el medio se traslada a una zona estéril, para enfriarlo lentamente a una temperatura que oscila entre los 45° C +/-2°C.
- Incorporar 5 % de Sangre de carnero desfibrinada, homogenizar completamente y dispensar un volumen de 10 mL de medio por caja petri estéril.
- Guardar los medios en refrigeración a 4 °C .El medio de cultivo preparado antes de la adición de sangre es claro y amarillo parduzco, posteriormente a la adición de sangre, es del color de la misma.
- Finalmente se incuba de 35 a 37 °C por 24 horas una caja petri de medio de cultivo del lote preparado, como control de esterilidad.

ANEXO 6

TINCIÓN DE GRAM:

Es una tinción diferencial usada para demostrar las propiedades tintoriales de bacterias de todos los tipos según la pared celular que estas presenten. Las bacterias gram positivas retienen la violeta de genciana después de la decoloración, las bacterias gram negativas no son capaces de retener este colorante.

Batería para tinción gram:

VIOLETA DE GENCIANA

85 % violeta de genciana

55 % alcohol

H₂O_d csp. 90 mL

4.5 g oxalato de amonio

LUGOL

1 g yodo

2 g yoduro de potasio

100 mL H₂O_d

ALCOHOL-ACETONA

50 mL acetona

50 mL etanol (95%)

FUCSINA BASICA

3 g fucsina basica

100mL etanol (95%)

H₂O_d csp. 1000 mL

Procedimiento:

- Se coloca el frotis sobre un soporte para tensión y se cubre la superficie con solución de violeta de genciana, se deja 1 minuto y se lava con agua.
- Se cubre el frotis con solución de yodo durante 1 minuto y se lava con agua.
- Se cubre el frotis con solución decolorante alcohol-acetona, dejándolo 1 minuto y se lava con agua.
- Se cubre el frotis con fucsina básica y se deja actuar por 1 minuto.
- Se examina el frotis teñido con aceite de inmersión con el objetivo de 1000X del microscopio.

ANEXO 7

FORMULARIO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

PACIENTE: _____ FECHA: _____

	Tincion gram	Catalasa	Sensibilidad bacitracina 0.04 u	Sensibilidad trimetoprim/sulfametoxazol 1.25 ug/23.75ug	Prueba Vogues-Proskauer	DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO
<i>Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos lavados</i>						
<i>Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos lavados mas azida sodica</i>						
<i>Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos sin lavado</i>						
<i>Cultivo en agar sangre de carnero</i>						

ANEXO 8



Fotografía 1: Cultivo de hisopado faringeo con presencia de flora normal, estreptococos alfa hemolíticos y moraxelas.



Fotografía 2: Cultivo de hisopado faringeo con presencia de flora normal, estreptococos alfa hemolíticos y flora patógena, *Streptococcus pyogenes* beta hemolítico.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gonzales MA, Mamani PA. Determinación de la presencia de agentes bacterianos y su susceptibilidad antimicrobiana en IRAs en la Clínica “Caja Petrolera de Salud”. Tesis de licenciatura en Bioquímica. Universidad Mayor de San Andres. La Paz, 2007.
2. Arteaga BR, Onostre GR. Faringoamigdalitis. Estudio clínico y bacteriológico en niños de 3 a 14 años. Rev. Soc. Bol. Ped. 1998;37(3): 99-103.
3. Bisno AL, Stevens DL. *Streptococcus pyogenes*. Principles and practice of infectious disease . 5 Ed . New York: Churchill Livingstone. 2000; 2101-2117.
Disponible en <http://www.medscape.com/medline>
4. Chavez CM, Livia CG, Muñoz GE, Otitiano GM, Lujan VM. Evaluación comparativa de agar sangre de carnero y agar sangre humana en el aislamiento de Streptococcus beta hemolíticos. Rev.Med.Vallejiana. 2006;4(2):148-154.
5. Coria R., López Y., Xochihua L. y Tato P. Bacteriología Clínica. Mexico: Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. 2006. 220-227.
6. Ruize H. Infecciones respiratorias agudas. Guía de infección respiratoria. salud INBURSA. Mexico: Organización Panamericana de la Salud. 2002. 1- 6.
7. Cofre F, Rodriguez J. Faringoamigdalitis aguda. Rev Chil Pediatría 2005;2(3).
Disponible en <http://www.scielo.cl>
8. Cenjor C., García J.A., Ramos A., Cervera J., Tomás M., Asensi F., et al. Tratamiento antimicrobiano de la faringoamigdalitis. Acta otorrinolaringol esp 2003; 54: 369-383
9. Fica A. Manejo de la Faringoamigdalitis Estreptocócica en Pacientes Adultos o Adolescentes. Rev Chil Infect 2002; 19(2): 79-91.
Disponible en <http://www.scielo.cl>
10. Bisno A, Gerber, Guerree MA, Gwaltney JM, Kaplan EL, Schwartz RH. Diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: a practice guideline. Clin Infect Dis 1997; 25: 574-83.
Disponible en <http://www.medscape.com/medline>
11. Mims C. , Playfair J. Roit I. Microbiologia Medica. 2 ed. Madrid: Hancourt . 1999. 585 p.
12. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J Exp Med 1996; 57: 571-595.
Disponible en <http://www.jcm.asm.org>
13. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM, Winn WC. Diagnostico microbiológico. 6 ed . Buenos Aires: Panamericana.2006:641-6.
14. Rodriguez G. Generos Streptococcus y Enterococcus. Temas de Bacteriologia. 2000; 20:273-90.

15. Bisno AL, Alternate complement pathways by group A streptococci: role of protein M .Infect Immun. 1979;6:1172-1176.

Disponible en <http://www.medscape.com/medline>

16. Jhonon DR, Kaplan EL. A review of the correlation of agglutination patterns and M protein typing and opacity factor production in the identification of group A streptococci. J Med Microbiol . 1998;38:311-315.

Disponible en <http://www.medscape.com/medline>

17. Murray P., Rosenthal K., Kobayashi G.et al.: Estreptococos, Microbiologia medica, 3 ed. Buenos aires: Mosby, 1998.

18. Pahisa BA, Pigran SC, Capdenla JA, Almirante GB. Infecciones Estreptocócicas. Medicine Barcelona 2001; 7 (788):3599-3604.

19. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Microbiología medica de Jawestz, Melnieck y Adelberg. 17 ed.México DF: Manual moderno,2002.

20. Shulman ST. Complications of streptococcal pharyngitis.Pediatr Infect Dis J.1999;13:570-574.

Disponible en <http://www.medscape.com/medline>

21. Newton ER, Prihoda TJ, Gibbs RS. A clinical and microbiologic analysis of risk factors for puerperal endometritis. Obstet Gynecol 1998; 75: 402-406.

Disponible en <http://www.medscape.com/medline>

22. Gobernado M. Faringoamigdalitis en el adulto. Rev Esp Microbiología. 2002;11(2):105-109.

23. Kuhn S, Davies H D, Katzko G, Jadavji T, Church D L. Evaluation of the Strep A OIA assay versus culture methods: ability to detect different quantities of group A *Streptococcus*. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34: 275-80.

Disponible en <http://www.jcm.asm.org>

24. Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica. Consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de la faringoamigdalitis estreptocócica. Rev Chil Infect 1999; 16: 218-9.

Disponible en <http://www.scielo.cl>

25. Bisno A, Gerber, Guerree MA, Gwaltney JM, Kaplan EL, Schwartz RH. Diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: a practice guideline. Clin Infect Dis 1997; 25: 574-83.

Disponible en <http://www.medscape.com/medline>

26. Braun S. Estudio Microbiológico del Tracto Respiratorio Superior. Rev Chil Infect 2003; 20(3): 193-198.

Disponible en <http://www.scielo.cl>

27. Ulloa M T, Becker L, Robles M, Giglio M, Camponovo R. Comparación de StrepA y cultivo tradicional en el diagnóstico de Streptococcus b hemolítico grupo A. XXI Congreso Chileno de Microbiología, Asociación Chilena de Microbiología 1999.

28. Lopardo H, Hernandez C, Soloaga R. Diagnostico Microbiologico de las infecciones respiratorias bacterianas. Rev Arg Microb. 2000;15: 5–10.

29. Denny F W, Wannamaker L W, Brinck W R, Rammelkamp C H Jr., Custer E A. Prevention of rheumatic fever. Treatment of the preceding streptococcic infection. JAMA 1950; 143: 151-3.

Disponible en <http://www.medscape.com/medline>

30. Shulman ST. Evaluation of penicillin, cephalosporin and macrolides for therapy on streptococcal pharyngitis. Pediatrics 1999;97:955-959.

Disponible en <http://www.medscape.com/medline>

31. Quintiliani R, Sahm D, Courvalin P. Mechanisms of Resistance to Antimicrobial Agents. Manual of Clinical Microbiology . 7 ed. Washington DC : ASM,1999, 1505-25.

Disponible en <http://www.jcm.asm.org>

32. Rossanna CC. Problemas de resistencia en *Streptococcus pyogenes*. Rev Chil Infect 2002; 19 (2): 107-110.

Disponible en <http://www.scielo.cl>

33. Muñoz S, Córdova M, Morales V, Cifuentes L. Faringitis Aguda, Estreptocócica. Rev Chil Infect 2005; 22(2): 147–153.

Disponible en <http://www.scielo.cl>

34. Dajani A, Taubert K, Ferrieri P et al. Treatment of acute streptococcal pharyngitis and prevention of rheumatic fever. Pediatrics 1998; 96: 758-64.

Disponible en <http://www.emedicine.com>