

ASLAMIENTO E IDENTIFICACION DE COCOS GRAM
POSITIVOS PRODUCTORES DE ANGINAS:
II. ESTREPTOCOCOS

por

J. LLOSÁ, P. ROMERO y V. SALMERÓN

INTRODUCCION

Los estreptococos beta-hemolíticos son bacterias productoras de anginas. Entre ellos los pertenecientes al grupo A de Lancefield presentan una mayor incidencia (1), (2). Entre las enfermedades que producen destacan por su importancia las enfermedades cardiorreumáticas, relacionadas con la angina estreptocócica (3), (4), (5), (6), (7), (8).

COBURN (9), indica que una de las manifestaciones de la fiebre reumática, es la lesión de corazón, que se presenta en forma de cardiopatía reumática.

En la actualidad son objeto de estudio los mecanismos inmunes que relacionan las fiebres reumáticas y las cardiopatías resultantes de postinfecciones amigdalinas causadas por estreptococos beta-hemolíticos del grupo A, cuyo papel en procesos autoinmunes está evidenciado por la presencia, en los sueros de enfermos cardíacos, de autoanticuerpos, frente a constituyentes de tejidos del corazón. Así, en sujetos con fiebre reumática, datos experimentales y clínicos indican que la autoinmunidad del tejido cardíaco es ocasionada por un constituyente del estreptococo que actúa como antígeno cruzado con el antígeno del corazón, produciéndose autoanticuerpos siempre que existan ciertas condiciones específicas por parte del enfermo. La confirmación de estos hechos la realiza LANNIGAN (10) en un estudio inmunopatológico de 90 muestras pertenecientes a corazones de enfermos, en los que se observa mediante microscopia electrónica la presencia de nódulos de Aschoff intracitoplasmáticos. KAPLAN (11) (12) demuestra la presencia de antígenos de estreptococos beta-hemolíticos del grupo A en el miocardio, mediante inmunofluorescencia, empleando para ello suero anticonejo obtenido por inoculación de extractos de dichos microorganismos.

Es el mismo KAPLAN (13) quien investiga esta sustancia antigénica; la extrae mediante ácido, la purifica y estudia sus distintas fracciones por cromatografía y observa la presencia de proteína M, sustancia asociada a la virulencia de los estreptococos. También KAPLAN and SUCHY (14), empleando antisueros preparados con malaxados de corazón y extractos ácidos de estreptococos beta-hemolíticos del grupo A, observaron que se producen reacciones de precipitación con un alto grado de positividad.

Por todo ello es importante diagnosticar con precisión si una infección amigdalар es producida por estreptococos del grupo A o por otro tipo de gérmenes, para lo cual se hace preciso su aislamiento e identificación, así como su correcto tipado inmunológico.

Esto es lo que pretendemos realizar en el presente trabajo con el objeto de facilitar la labor tanto al bacteriólogo como al clínico, ya que mediante diagnóstico y tratamiento específico es posible prevenir las secuelas cardiorreumáticas que desarrollan este tipo de gérmenes.

MATERIAL Y METODOS

Muestras. Se han recogida 273 muestras correspondientes a anginas estirpadas y secreciones amigdalinas (15).

Observación. Tinción por el método de Gram.

Aislamiento. Se ha realizado mediante diseminación en placas de agar-corazón de buey-sangre de cordero, e incubación a 37°C durante 18-24 horas, resemebrando aquellas colonias pequeñas, brillantes, convexas, beta-hemolíticas, pertenecientes a estreptococos.

Conservación. Siembra en tubos que contienen 2 ml de caldo infusión de corazón de buey, incubando a 37°C durante 18 horas. De este cultivo se siembra masivamente en un tubo con agar blando-ascitis e incuba a 37°C durante 18 horas. Los tubos crecidos se conservan en nevera.

Identificación. Se han realizado las siguientes pruebas:

(1) Fermentación de lactosa, sorbitol, trealosa, rafinosa y maltosa según métodos de SANDERS (16).

Prueba de sensibilidad a la bacitracina según MAXTED (17).

Tipado inmunológico, mediante reacción de precipitación en tubos capilares, según LANCEFIELD (18) para determinar el grupo y reacciones de inmunofluorescencia directa (19).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se han aislado 59 cepas de estreptococos beta-hemolíticos, correspondiendo 48 de ellos al grupo A de Lancefield, 4 al grupo F, ninguno al grupo G y 7 no se han podido clasificar por carecer de los antisueros correspondientes. (Tabla I).

TABLA I
RESULTADOS: LANCEWIELD

N.º de muestra	Grupo			N.º de muestra	Grupo		
	A	F	G		A	F	G
1	+	—	—	82	+	—	—
3	+	—	—	83	+	—	—
8	+	—	—	84	+	—	—
12	+	—	—	87	+	—	—
14	—	+	—	94	—	+	—
16	+	—	—	98	+	—	—
17	+	—	—	99	+	—	—
18	+	—	—	100	+	—	—
24	+	—	—	103	—	—	—
26	+	—	—	104	+	—	—
31	+	—	—	111	+	—	—
32	+	—	—	112	+	—	—
33	+	—	—	115	—	—	—
35	+	—	—	117	—	+	—
36	+	—	—	118	+	—	—
38	+	—	—	121	+	—	—
45	+	—	—	124	+	—	—
50	+	—	—	135	+	—	—
53	+	—	—	138	+	—	—
55	—	—	—	146	+	—	—
56	+	—	—	150	—	—	—
57	+	—	—	151	+	—	—
63	—	+	—	154	+	—	—
64	—	—	—	157	+	—	—
69	+	—	—	158	+	—	—
70	+	—	—	161	+	—	—
71	—	—	—	162	+	—	—
79	—	—	—	164	+	—	—
81	+	—	—	165	+	—	—

La lactosa ha sido fermentada por todas las cepas, presentando una fermentación variable respecto a los demás azúcares ensayados. (Tabla II).

TABLA II

RESULTADOS

FERMENTACION DE LACTOSA, SORBITOL, TREALOSA, RAFINOSA Y MALTOSA, POR ESTREPTOCOCOS BETA-HEMOLITICOS

N.º de muestra	Lactosa	Sorb.	Treal.	Raf.	Mal.
1	1	—	1	1	—
3	1	1	1	—	—
8	2	—	2	—	—
12	2	—	2	1	—
14	1	—	—	—	—
16	1	—	1	—	—
17	2	—	—	—	—
18	2	—	—	—	—
24	2	—	2	—	—
26	2	—	—	1	1
31	2	1	1	—	—
32	2	—	—	—	—
33	2	—	1	—	—
35	2	—	1	—	—
36	2	—	—	—	—
38	2	—	—	—	1
45	2	—	—	1	—
50	2	1	1	—	—
53	2	—	—	—	—
55	2	2	3	—	—
56	2	—	—	—	—
57	2	—	—	—	—
63	2	1	—	—	1
64	2	—	—	—	—
69	2	—	1	—	—
70	2	—	1	—	1
71	2	—	1	—	1
79	2	—	—	—	—

TABLA II (Continuación)

N.º de muestra	Lactosa	Sorb.	Treal	Raf.	Mal.
81	2	—	1	1	—
82	2	—	—	—	—
83	2	—	2	—	—
84	2	—	—	—	—
87	2	—	1	—	—
94	2	—	—	—	1
98	2	—	—	—	—
99	2	1	2	—	—
100	1	—	—	—	—
103	2	1	—	—	—
106	2	—	1	—	2
111	1	—	—	—	—
112	2	—	2	1	—
115	1	1	—	—	1
117	2	—	—	1	—
118	1	—	2	—	2
121	2	—	—	—	—
124	2	2	—	1	—
135	2	—	—	—	1
137	2	—	—	—	—
138	2	—	1	—	—
146	2	—	—	—	2
150	1	2	—	1	—
151	2	—	—	2	—
154	2	—	—	—	—
157	1	—	—	1	—
158	1	—	—	—	1
161	2	—	1	—	—
162	2	—	1	—	—
164	1	—	—	—	—
165	2	—	—	—	—

Abreviaturas:

- 1.—Ligera formación de ácidos.
- 2.—Formación de ácidos.
- 3.—Formación de ácidos y gases.

La sensibilidad a la bacitracina fue positiva para el 83,33 por ciento de las cepas del estreptococo del grupo A ensayadas, siendo negativa en el 16,16 por ciento (8 cepas). Las cepas pertenecientes al grupo F no fueron sensibles y de las restantes cepas dos si lo fueron. (Tabla III).

TABLA III

RESULTADOS: SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA

N.º de muestra	Resultado	N.º de muestra	Resultado
1	+	83	+
3	+	84	+
8	+	87	+
12	-	94	-
14	-	98	+
16	+	99	-
17	+	100	+
18	+	103	-
24	+	106	+
26	+	111	+
31	-	112	+
32	+	115	-
33	+	117	-
35	+	118	+
36	-	121	-
38	+	124	-
45	+	135	+
50	+	137	+
53	+	138	+
55	+	146	+
56	+	150	-
57	-	151	+
63	-	154	+
64	-	157	+
69	-	158	+
70	-	161	+
71	+	162	+
79	-	164	-
81	+	165	+
82	+		

Estos resultados indican que la prueba de sensibilidad a la bacitracina no puede ser considerada como inequívoca de que un estreptococo que sea sensible a dicho antibiótico pertenezca al grupo A, ya que incluso hay cepas que son sensibles y pertenecen a otros grupos. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por HEESCHEN, TALLE y ZEIOLER (21).

La reacción de inmunofluor cepas pertenecientes al grupo A y negativas en los demás casos. (Tabla IV).

Este resultado está de acuerdo con el obtenido por MOODY (20). El conjugado empleado siendo para esta última dilución los resultados no fiables por producir datos negativos falsos (cepas: 8, 16, 24, 33, 36, 38, 45, 50), por lo que a partir de la cepa n.º 50 se prescindió de esta investigación.

TABLA IV
RESULTADOS: INMUNOFLUORESCENCIA

N.º de muestra	C o n j u g a d o		
	1/20	1/40	1/80
1	+++	++	+
3	+++	+++	++
8	+++	+++	—
12	+++	+++	++
14	—	—	—
16	+++	++	—
17	+++	+++	+
18	+++	++	+
24	+++	+++	—
26	+++	++	+
31	+++	++	+
32	+++	+++	+
33	+++	++	—
35	+++	++	+
36	+++	++	—
38	+++	+++	—
45	+++	+	—
50	+++	+	—
53	+++	++	+
55	—	—	—
56	+++	++	—

TABLA IV (Continuación)

N.º de muestra	C o n j u g a d o		
	1/20	1/40	1/80
57	+++	+	
63	—	—	
64	—	—	
69	+++	+	
70	+++	+	
71	—	—	
79	—	—	
81	+++	++	
82	+++	+	
83	+++	+	
84	+++	+	
87	+++	+	
94	—	—	
98	+++	++	
99	+++	+	
100	+++	++	
103	—	—	
106	+++	++	+
111	+++	+++	+
112	+++	+++	+
115	+++	+++	—
117	—	—	—
118	++	+++	+
121	+++	+++	++
124	++	+++	+
135	+++	+++	+
137	++	+++	+
138	++	+++	+
146	+++	+++	+
150	++	+++	—
151	++	+++	+
154	++	+++	+
157	+++	+++	+
158	+	+++	+
161	+	+++	++
162	++	+++	+
164	—	—	+
165	++	+++	+

RESUMEN

Se indica la técnica seguida para aislamiento y conservación de estreptococos beta-hemolíticos a partir de enfermos con amigdalitis. También se especifican las pruebas realizadas, tanto bioquímicas como serológicas, para la identificación de las 59 cepas aisladas, encontrándose 48 pertenecientes al grupo A de Lancefield, 4 al grupo F, ninguna al G y 7 no se identifican por carecer de los antisueros específicos.

La lactosa es fermentada por todas las cepas.

El test de la bacitracina positivo, no es concluyente para afirmar que un estreptococo beta-hemolítico pertenece al grupo A de Lancefield. Por último la reacción de inmunofluorescencia ha sido solo positiva para las cepas del grupo A.

SUMMARY

We show the technical followed to isolations and conservations of beta-hemolitic-streptococcus from patients with quinsy. We appoint as well the tests, biochemical as serological, to identification of 59 isolated strains, we find that 48 are of the Lancefield's "A" group, 4 of the "F" group, none of the "G" group and 7 are imposible to make the identification because we have not the specific antibody.

The lactose is fermented by all the strains.

The positive bacitracine test is not convincing to asseverate that a beta-hemolitic-streptococcus concerns to the "A" group of Lancefield. Finally the immunofluorescens reaction has only been positive to the group "A" of strains.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—WANNAMAKER, L. W. (1954). Streptococcal Infections. pág. 157. Columbia University Press. New York.
- 2.—EVANS, A. C. (1947). J. Bact. 53, 489.
- 3.—ALES (1959). Ponencia III. Congreso Hispano-Lusitano de Cardiología. Actas.
- 4.—GLYWN, L. L. and HOLBOROW, E. J. (1960). Immunological aspects of rheumatoid disease: a review. Ann. rheum. Dis., 19, 197.
- 5.—ALEXANDER, W. R. M.; BRENNER, J. M. and DUTHIE, J. J. R. (1960). Incidence of the anti-nuclear factor in human sera. Ann. rheum. Dis., 19, 338.
- 6.—HALL, A. P.; BARDAWILL, W. A. (1960). The relations between the anti-nuclear rheumatoid and L.E.-cell factors in the system rheumatoid diseases. New Engl. J. Med., 263, 769.
- 7.—WARD, D. J.; JOHNSON, G. D. and HOLBOROW, E. J. (1964). Antinuclear factor in rheumatoid arthritis. Its incidence and clinical significance. Ann. rheum. Dis., 23, 306.

- 8.—PITKEATHLY, D. A. and TAYLOR, G. (1967). Antinuclear factor in rheumatoid arthritis and related diseases. *Ann. rheum. Dis.*, 26, 1.
- 9.—COBURN, A. F. (1931). The factor in infection in the rheumatic state. Williams & Wilkins. Baltimore.
- 10.—LANNIGAN, R. and ZAKI, S. A. (1967). Ultrastructure of lesions of rheumatic carditis. *The J. of Path. and Bact.*, 93, 449-461.
- 11.—KAPLAN, M. H. and MEYESERIAN, M. (1962). An immunological cross-reaction between group A streptococcal cells and human heart tissue. *Lancet*, 1, 706.
- 12.—KAPLAN, M. H. (1963). Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. I. Properties of and antigen in certain strains of group A streptococci exhibiting an immunologic cross-reaction with human heart tissue. *J. Immunol.* 90, 595.
- 13.—KAPLAN, M. H. (1967). Multiple nature of the cross-reactive relationships between antigens of group A streptococci and mammalian tissue. Edited by Trentin J. J. Williams & Wilkins. Baltimore.
- 14.—KAPLAN, M. H. and SUCHY, M. L. (1964). Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. *J. Exper. Med.* 119, 643.
- 15.—ROMERO, P.; SALMERON, V.; LLOSA, J. (1975). Aislamiento e identificación de cocos Gram positivos productores de anginas. I. Estafilococos. *Ars Pharm* (En prensa).
- 16.—SANDERS, FABER and COOK (1957). *Appl. Microbiol.*, 5, 36. Ref.: Manual de Difco.
- 17.—MAXTED (1953). The use of bacitracin for identifying group A, hemolytic streptococci. *Journal clin. Path.*, 6, 224.
- 18.—LANCEFIELD, R. C. (1928) The antigenic complex of streptococcus hemolyticus. I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of streptococcus hemolyticus. *J. Exp. Med.*, 47, 91-103.
- 19.—OLIVARES, J. (1961). Anticuerpos fluorescentes en infecciones vegetales. Memoria para beca Fundación Juan March. *Anales.* 61-65
- 20.—MOODY, M. D.; GOMEZ, E. E. (1958). Staining bacteriol aurears with fluorescent antibody. *J. of Bacteriol.*, 75, 553-560.
- 21.—HEESCHEN, W.; TOLLE, E. and ZEJOLER, H. (1967). Zur klassifizierung der gattung streptococcus. *Zbl. Bakt. I.* 205, 250-259.