



COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ESTREPTOCOCO β HEMOLÍTICO DEL GRUPO B



Alumna: Godoy, Viviana Soledad

Directora: Goyechea, Roxana

Maria Itati

Año:2021



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

Índice

INTRODUCCIÓN, PREVENCIÓN	3
OBJETIVOS Y MATERIALES	5
MÉTODO	6
RESULTADOS	8
COMENTARIOS	9
CONCLUSIÓN	10
BIBLIOGRAFÍA	11



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

Introducción

El estreptococo β hemolítico del grupo B (EGB), es un coco gram positivo que puede hallarse como colonizante del tracto genitourinario y gastrointestinal del ser humano; y puede ser causante de enfermedad invasiva en neonatos, mujeres embarazadas y adultos con comorbilidades.

En la embarazada puede determinar infección urinaria, corioamnionitis y endometritis(1); además las mismas pueden transmitir la bacteria al neonato durante el parto, considerándose uno de los principales agentes causantes de infección bacteriana perinatal.

En el recién nacido la enfermedad por EGB puede presentarse como sepsis, neumonía o meningitis, y aproximadamente el 25% de los casos se produce en prematuros. En el 80% de los casos se presenta como enfermedad de inicio temprano la cual ocurre durante los primeros 7 días de vida, adquiriendo el microorganismo por transmisión vertical. La forma tardía se presenta después de los 7 días de vida, y puede ser resultado de la adquisición del germen por transmisión vertical, infección adquirida desde la comunidad o infección nosocomial (2).

De acuerdo a algunos estudios realizados en Argentina la tasa de colonización en embarazadas es del 5 al 18%. En ausencia de medidas de prevención, del 50 al 70% de las mujeres colonizadas transmiten el EGB al recién nacido (RN) durante el parto, y de estos del 1 al 2% desarrollan una infección precoz(3).

La mortalidad, que en los años 1970-1980 alcanzaba el 50%, actualmente se ha reducido al 4-5% como resultado de los avances en la asistencia neonatal. Sin embargo, como consecuencia de la infección, el 25-30% de los RN afectados padece importantes secuelas neurológicas (4)

Prevención

En 1996, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) desarrolló una estrategia con el objetivo de reducir la morbilidad y mortalidad de las enfermedades neonatales asociadas al EGB, basada en el cultivo vagino rectal, de todas las



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

embarazadas entre las 35 a 37 semanas de gestación, y una profilaxis intraparto a todas aquellas mujeres positivas para el cultivo o que presenten factores de riesgo(5). Los factores que aumentan el riesgo de infección neonatal precoz además de la colonización materna por EGB son: prematuridad, rotura prolongada de membranas (más de 18 h), fiebre intraparto (≥ 38 °C), bacteriuria por EGB durante el embarazo y RN previo afectado por infección por EGB.(6)

La técnica recomendada por el CDC y por la Sociedad Americana de Microbiología para el procesamiento de las muestras vagino rectales indica que se requiere incubación, durante 18-24 hs a 35 °C en atmósfera aeróbica, en caldo de enriquecimiento selectivo Todd Hewitt con gentamicina (8 ug/ml) o ácido nalidíxico (15 ug/ml) y colistin (10 ug/ml); y posterior subcultivo en agar tripteina soya + 5% de sangre de carnero en atmósfera aerobia con 5% de dióxido de carbono a 37°C o bien utilizar medios selectivos como el CHROMagarStrepto B, el cual inhibe la mayoría de las bacterias y levaduras saprofitas y produce colonias de color malva de EGB(Fig. 1) en atmósfera aerobia a 37°C.(4,7)



Fig. 1

En la última propuesta del modelo de control prenatal del año 2001 presentado por la Organización Mundial de la Salud, no se recomienda el cultivo a todas las embarazadas. Se recomienda la profilaxis en las mujeres con factores de riesgo.(5)

En Argentina, el Ministerio de Salud, recomienda desde 1996 la estrategia de factores de riesgo, al igual que un consenso sobre infecciones perinatales realizado por la Sociedad Argentina de Pediatría en 1999. Esta situación fue modificada en Mayo de 2008 con la Ley Nacional N° 26.369, que incorporó con carácter obligatorio para los efectores públicos y privados, como práctica rutinaria de control y prevención la



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

realización del examen de detección de EGB, con alcance a todas las embarazadas en edad gestacional entre las semanas 35 y 37, con o sin condiciones de riesgo. (8)

Objetivos

Generales:

- Proporcionar al alumno que está finalizando el Ciclo de Formación Profesional, un espacio curricular que le permita profundizar su capacitación en distintos campos disciplinares de la Bioquímica.
- Alcanzar capacidades para el desarrollo de competencias en lo relacionado a investigación básica y clínica.
- Lograr habilidades y destrezas en el manejo del trabajo de mesada en el área de Bacteriología y procesamiento informático de datos estadísticos

Particulares:

- Comparar la sensibilidad de los métodos para la recuperación y la determinación de la prevalencia de *S. agalactiae* en un grupo de mujeres gestantes que concurren al Servicio de Maternidad del Hospital Materno Neonatal Eloísa Torrent de Vidal.
- Aportar datos al equipo de salud del Hospital Materno Neonatal de la Ciudad de Corrientes

Materiales

Para el presente trabajo de investigación se recibieron 75 muestras de hisopados de la zona peri rectal y del introito vaginal durante el periodo comprendido entre el 12 de Agosto-12 de Noviembre del 2021, provenientes de mujeres embarazadas de 35 a 37 semanas de gestación que concurren o se encontraban internadas en el servicio de maternidad del Hospital Materno Neonatal Eloísa Torrent de Vidal, las cuales fueron remitidas en medio de transporte.



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

Método

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio del Hospital Materno Neonatal Eloísa Torrent de Vidal, en el sector de Bacteriología a cargo de la Bioquímica Goyechea Roxana Marialtati.

Las muestras fueron colocadas en caldo selectivo Todd-Hewitt suplementado con Colistin (10 ug/ml) + Ácido Nalidíxico (15 ug/ml) e incubadas a 37° C. Se subcultivaron a las 18-24 hs en agar tripteina soya + 5% sangre humana (AS) y CHROMagarStrepto B (AC), mediante la técnica de siembra por agotamiento con el fin de obtener colonias aisladas (Fig. 2a,b). Se incubaron a 37°C y la placa de AS en atmósfera aerobia con 5% de dióxido de carbono.

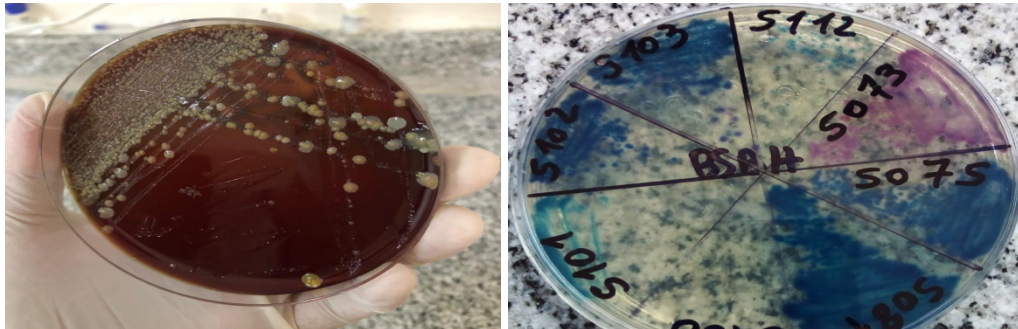


Fig. 2a. Siembra en AS

Fig. 2b. Siembra en AC

Las placas fueron observadas a las 24 hs, las colonias hemolíticas y no hemolíticas con morfología sugestiva de EGB en AS y las colonias rosadas del AC, se tipificaron por medio de pruebas bioquímicas CAMP, Hipurato de Sodio, Bilis Esculina y PYR.

Las placas negativas fueron incubadas por 72 horas más.

Prueba de CAMP: denominada así por Christie, Atkins y Munch-Petersen, se utiliza para identificar estreptococos del grupo B y se realiza utilizando una cepa de *S. aureus* ATCC 25923 productora de hemolisina, la cual interactúa con una proteína llamada “factor CAMP” secretado por los EGB para producir una hemólisis mayor o sinérgica. Esta aparece como un área con forma de punta de flecha de mayor hemólisis en el lugar donde las dos líneas de crecimiento están más próximas. (Fig. 3)

Esta prueba es altamente sensible, e incluso cepas del grupo B no hemolíticas serán CAMP positivas. (9,10)



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

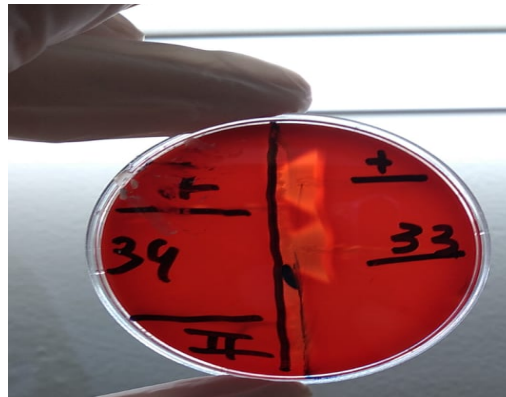


Fig. 3. Prueba de CAMP

Hidrólisis del Hipurato de Sodio: los estreptococos del grupo B poseen la enzima hipuricasa por lo que pueden hidrolizar el hipurato en sus componentes glicina y ácido benzoico. Para la prueba se inocula el microorganismo en caldo con 400 ul de hipurato de sodio al 1% y se incuba durante 2 horas a 35 °C, luego se agregan 200 ul de ninhidrina que reacciona con la glicina libre dando un color azul intenso (Fig. 4).(9-11)

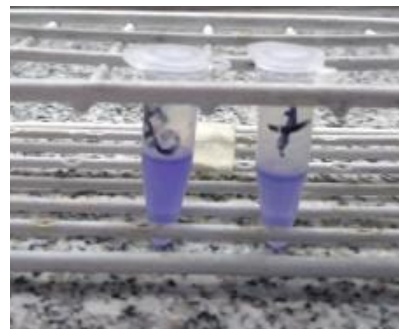


Fig. 4. Hidrólisis del Hipurato

Bilis esculina: el objetivo de esta prueba es separar los estreptococos del grupo D y Enterococcus de los demás grupos de estreptococos, basándose en la capacidad de los mismos para crecer en un medio de cultivo que contiene 40% de bilis y de hidrolizar la esculina a esculina; ésta se combina con el citrato ferroso que posee el medio, dando un complejo de color negro. La concentración de bilis es fundamental, ya que existen estreptococos del grupo viridans que son capaces de crecer a concentraciones menores de bilis. En general, la prueba se realiza en agar inclinado o en una placa, donde la mayoría de las especies de Enterococcus y los estreptococos del grupo D ennegrecen el medio de bilis-esculina dentro de las 24 horas (Fig. 5).(9-11)



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

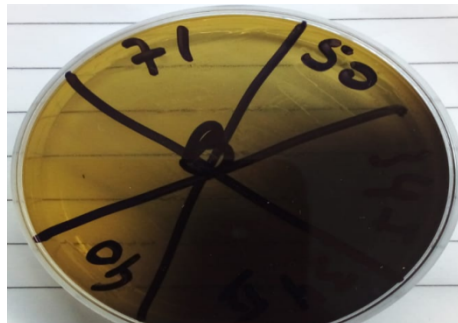


Fig. 5. Prueba de Bilis Esculina

Hidrólisis del PYR: permite separar *Streptococcus pyogenes* y *Enterococcus* de los demás estreptococos. *S. pyogenes* y *Enterococcus* poseen la capacidad de hidrolizar el sustrato PYR (pirridonil β -naftilamida) debido a que poseen la enzima l-piroglutamil aminopeptidasa. Para esta prueba se realiza un inóculo denso en solución fisiológica con las colonias sospechosas, se agrega el disco comercial de PYR y el tubo se incuba durante 30 minutos en estufa a 37°C. Luego se agregan 1 o 2 gotas del reactivo revelador de cinamaldehído (la solución toma color amarillo) y se observa a los 5 minutos; si el resultado es positivo el disco de PYR se tornara de un color rosa fuerte. Si el resultado es negativo la solución tomara un color amarillo o incoloro y el disco permanecerá blanco (Fig. 6).(9-11)

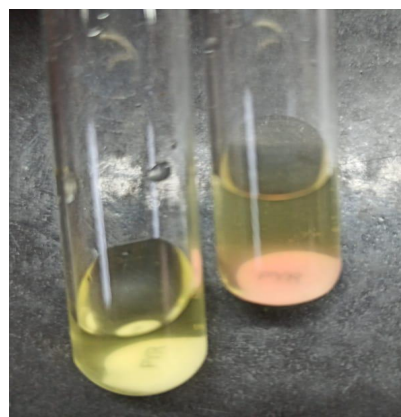


Fig. 6. Prueba PYR

Resultados

Del universo de las 75 gestantes estudiadas, en 12 se aisló EGB con una prevalencia del 16%, por ambos medios de cultivo utilizados como se muestra en la tabla 1.



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

Respecto al medio de cultivo AS se estudiaron 47 muestras (anexo 1), que presentaban hemólisis y/o morfología sugestiva de EGB, de las cuales 12 fueron positivas por las pruebas de tipificación (CAMP, Hidrólisis de Hipurato, PYR, BE).

En correlación en el medio CHROMagarstrep B de todas las muestras estudiadas solo 12 presentaron colonias sugestivas de EGB, las cuales fueron positivas mediante la tipificación.

En 3 casos se logró la tipificación solamente en el AC, debido a la presencia de la familia Proteae, que no permitía el correcto aislamiento de las colonias en AS.

Medio de cultivo	Nº total de muestras	Nº muestras Estudiadas	Muestras positivas para EGB	
			Nº	%Prevalencia
AS	75	47	12	16
AC	75	12	12	16

Tabla 1. Prevalencia de EGB en la población estudiada, según medio de cultivo utilizado.

Comentarios

Mediante los datos recolectados para este trabajo podemos destacar que la infección por EGB es sumamente importante ya que es una de las principales causas de meningitis, neumonía, sepsis neonatal, muerte neonatal, aborto séptico, corioamnionitis, entre otras infecciones perinatales, así como secuelas neurológicas. Por esta razón es importante establecer las medidas de prevención adecuada, así como también seleccionar los métodos y medios de cultivo más efectivos para su detección.

Cabe mencionar que la tasa de colonización por EGB en embarazadas varía de acuerdo con el área geográfica estudiada, la edad, factores étnicos y sociales y de forma muy importante por los procedimientos microbiológicos empleados para su detección(12). En Argentina los estudios muestran una prevalencia del 5-18%(1). En el presente estudio se pudo observar una prevalencia del 16%, pero es necesario tener en cuenta



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

que el mismo se realizó bajo el marco de una pandemia mundial cuya influencia se manifiesta en la escasa concurrencia de las gestantes para sus controles periódicos.

Conclusiones

En este trabajo se comparó la sensibilidad del agar tripteina soya + 5% de sangre humana (AS) con el CHROMagarStrepto B (AC) utilizado como método de referencia, obteniéndose una correlación en la detección de EGB. Por otro lado el AC presenta la ventaja de inhibir el desarrollo de la familia Proteae a diferencia del AS en donde su presencia no permite el correcto aislamiento y visualización de las colonias sugestivas de EGB debido al fenómeno de swarming.

Podemos concluir que el uso del caldo Todd- Hewitt suplementado con ácido nalidíxico (15 ug/ml) y colistin (10 ug/ml), y posterior subcultivo en AS o AC son procedimientos confiables para su implementación en cualquier laboratorio de bacteriología, destacando que el agar tripteina soya + 5% de sangre humana (AS) aun sin ser considerado el método de referencia por el CDC continúa siendo efectivo y confiable para esta prueba, pero es operador dependiente, es decir, que su sensibilidad depende de la experiencia del encargado de su procesamiento. A diferencia del AC que permite una visualización mucho más fácil de las colonias sospechosas de EGB.

Los costos de los medios comprados en agosto se pueden ver en el anexo 2. Luego del análisis podemos concluir que si bien el AC tiene un costo mayor que el agar tripteina soya usado para el AS, al usar una placa por muestra en el caso del AS y al fraccionando el AC para ocho muestras por placa, los costos del AC disminuyen, siendo mas beneficioso el AC ya que solo se siguen las colonias color malva sugestivas de EGB.

Además podemos decir que la prevalencia encontrada de EGB en la población estudiada concuerda con los reportes a nivel nacional.



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA



Goyechea, Roxana

Bibliografía

- 1) Cobico.com.ar. 2021. [en línea] Disponible en: <<https://cobico.com.ar/wp-content/archivos/300412-STREPTOCOCCUS-AGALACTIAE.pdf>> [Consultado el 24 de octubre de 2021].
- 2) Larcher, J. S., Capellino, F., De Giusto, R., Travella, C., Balangione, F. G., Kreiker, G., Cardona, H. P., Zarate, A., Vilaro, M., Hernandez, D., & Orrico, G. R. (2005). Colonización por estreptococo beta hemolítico del grupo B durante el embarazo y prevención de enfermedad neonatal. *Medicina (B.Aires)*, 201–206. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-425259>
- 3) Bancos.salud.gob.ar. 2021. [en línea] Disponible en: <<https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2018-10/0000000318cnt-consenso-estreptococo-b-hemolitico.pdf>> [Consultado el 13 de octubre de 2021].
- 4) Alós Cortés, J. I., Andreu Domingo, A., Arribas Mir, L., Cabero Roura, L., de Cueto López, M., López Sastre, J., Melchor Marcos, J. C., Puertas Prieto, A., de la Rosa Fraile, M., Salcedo Abizanda, S., Sánchez Luna, M., Sanchez Pérez, M. J., & Torrejon Cardoso, R. (2013). Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas. Actualización 2012. Documento de consenso SEIMC/SEGO/SEN/SEQ/SEMFYC. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(3), 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.03.013>
- 5) Rivas, Carlos, Tallac, Ivalú, & Etchenique, Analí. (2006). Colonización vaginorrectal por Streptococcus del grupo B en mujeres embarazadas, entre las 35 a 37 semanas de



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

gestación. *Revista Médica del Uruguay*, 22(3), 191-196. Recuperado en 14 de octubre de 2021, de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902006000300005&lng=es&tlng=es.

6) Cortés, Hernán. (2005). Prevención de la infección neonatal por estreptococo del grupo B: ¿Es necesaria en nuestro medio? *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 56(3), 231-238. Retrieved October 24, 2021, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342005000300006&lng=en&tlng=es.

7) By, P., Verani, J. R., McGee, L., & Schrag, S. J. (2010, noviembre 19). *Prevention of perinatal group B streptococcal disease*. Cdc.Gov. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5910a1.htm>

8) Argentina.gob.ar. 2021. *Argentina.gob.ar*. [en línea] Disponible en: <<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-26369-140274>> [Consultado el 24 de octubre de 2021].

9) Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M., Hernández Chavarria, F. y García Hidalgo, J., 2005. *Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio*. 1ª ed. Editorial Universidad de Costa Rica, págs. 237-257.

10) Porres, N. & Ruiz, E. (2018). *Microbiología clínica*. España. Editorial: Paraninfo. Núm. Págs. 91-93.

11) Elmer William Koneman, Allen, S. D., Giovanniello, O. A., Fabin Benencia, & Al, E. (2008). *Diagnóstico microbiológico : texto y atlas color*. Editorial Médica Panamericana. Págs. 681-690.

12) López, de C. (s/f). *Estreptococo grupo BB*. Gob.es. Recuperado el 23 de noviembre de 2021, de https://www.mscbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/vol29_5EstreptococoGrB.pdf



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

Anexo 1

Tabla de muestras estudiadas, tipificación.

Muestra	AS	AC	CAMP	BE	Hipurato
5070	+	+	+	-	+
5081	+	+	+	-	+
5101	+	+	+	-	+
5113	+	+	+	-	+
5141	-	-	-	-	
5171	-	-	-	-	
5180	+	+	+	-	+
5185	-	-	-	-	
5188	-	-	-	+	
5198	-	-	-	-	
5205	-	-	-	-	
5209	-	-	-	+	
5224	-	-	-	-	
5233	-	-	-	+	
5249	-	-	-	+	
5272	+	+	+	-	+
5348	-	-	-	+	
5350	-	-	-	-	
5405	-	-	-	-	
5415	-	-	-	-	
5416	-	-	-	+	
5417	-	-	-	-	
5433	+	+	+	-	+
5434	-	-	-	+	
5442	-	-	-	-	
5479	-	-	-	-	
5480	-	-	-	-	
5494	-	-	-	+	
5516	-	-	-	+	
5534	-	-	-	+	
5540	-	-	-	+	
5550	+	+	+	-	+
5562	-	-	-	-	
5563	+	+	+	-	+
5571	-	-	-	-	



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

5580	-	-	-	-	
5582	+	+	+	-	+
5601	-	-	-	-	
5602	-	-	-	+	
5613	-	-	-	-	
5614	-	-	-	-	
5670	+	+	+	-	+
5700	-	-	-	+	
5705	-	-	-	-	
5715	-	-	-	-	
5759	-	-	-	+	
5761	+	+	+	-	+

Anexo 2

	Precio total	Presentación	Precio por litro	Cantidad de placas por litro	Siembra de muestras	Total de muestras	Precio por muestra
AC	\$45.427	5000ml	\$9100	50	1 muestra por placa	50	\$22.75
Agar tripteina soya	\$15300	500g (40g x litro)	\$1300	50	8 muestras por placa	400	\$26



Universidad Nacional del Nordeste
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA