

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 12 / N° 14 / 2010 / 14–18

Estudio comparativo de sangre de diversos orígenes para el aislamiento e identificación de *Streptococcus agalactiae*

Comparative study of blood from different sources for the isolation and identification of Streptococcus agalactiae

Natalia Regali, Eduardo Pegels, Patricia Oviedo, Marina Quiroga, Marta Vergara

Resumen

Streptococcus agalactiae o *Streptococcus* grupo B (SGB) es una de las causas principales de infección neonatal grave. Dada la importancia de su detección, el objetivo de este estudio fue identificar los tipos de sangre (humana, bovina, equina y ovina) que provean mejor rendimiento para el aislamiento e identificación de SGB y que puedan ser utilizados en laboratorios de baja y mediana complejidad. En 30 cepas de SGB de colección estudiadas, los mejores rendimientos (número, tamaño, grado de hemólisis de las colonias y resultados de la Prueba de CAMP) se obtuvieron con sangre bovina y ovina. Sugerimos, el uso de sangre ovina o bovina para la recuperación e identificación de SGB en laboratorios de mediana y baja complejidad, evitando así el riesgo que significa el uso de sangre humana.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*; SGB; Agar sangre; Aislamiento; Identificación.

Abstract

Streptococcus agalactiae or Group B *Streptococcus* (GBS) is one of the major causes of serious neonatal infection. Given the importance of their detection, the aim of this study was to identify the types of blood (human, bovine, equine, and ovine blood) that provide better yields for the isolation and identification of GBS. They could be used in laboratories of low and medium complexity. In 30 GBS strains of collection studied, the best yields (number, size, degree of hemolysis of the colonies and results of CAMP's test obtained with bovine and ovine blood. We suggest the use of ovine or bovine blood for the recovery and identification of GBS in laboratories of medium and low complexity, thus avoiding the risk of using human blood.

Key words: *Streptococcus agalactiae*; GBS; Blood agar; Isolation; Identification.

Introducción

Streptococcus agalactiae o *Streptococcus* grupo B (SGB) es actualmente una de las causas principales de infección neonatal grave.

Dada la capacidad de traspasar las membranas ovulares intactas, a SGB se lo ha relacionado con muerte fetal y parto pretérmino. [1]

SGB forma parte de la flora normal del intestino, desde donde coloniza el tracto urogenital, siendo este un importante factor de riesgo en gestantes por la posibilidad de transmisión al recién nacido. [2]

Sin las medidas de prevención, entre un 50–75 % de los recién nacidos de madres portadoras de SGB se colonizan en el momento del parto. De las colonizadas el 1–2 % desarrollará una infección invasiva temprana [3], con una tasa de letalidad que oscila entre el 6 y el 20 %. [1]

Un factor importante en el mecanismo de patogenicidad de SGB es la producción de β -hemolisina la que participa

activamente en el proceso de invasión actuando como una citolisina. [4]

En la mayoría de los casos SGB es β -hemolítico, aunque hay aproximadamente un 2 % de cepas no hemolíticas. [5]

En el laboratorio, la β -hemolisina es la responsable de la β hemólisis que se observa alrededor de las colonias por debajo de la superficie del agar sangre [6], medio de cultivo de uso corriente para la recuperación de SGB.

Para la identificación presuntiva del SGB se utiliza, entre otras, la prueba de CAMP, que también se realiza en un medio que contiene sangre como suplemento.

Esta prueba, depende de dos factores: del factor CAMP liberado por el SGB y de una esfingomielinasa secretada por el *Staphylococcus aureus*. [7-9]

La hidrólisis de la esfingomielina sensibiliza al eritrocito a la acción lítica del factor CAMP, lo que aumenta el área de hemólisis cuando SGB crece cerca de dicho microorganismo.

El sinergismo se observa como un área de β -hemólisis en forma de “punta de flecha” en la zona de desarrollo más cercana a ambas estrías.

Existen variantes en el uso de sangre de animales para la preparación del agar sangre.

La sangre ovina es aceptada como el suplemento más eficiente para el trabajo habitual de laboratorio y es utilizada como estándar para definir las reacciones hemolíticas de *Streptococcus* hemolíticos [10], ya que permite una mejor visualización de la hemólisis en 24 hs al tener menor concentración de NAD libre.

Sin embargo, existen laboratorios que se ven impedidos de preparar medios suplementados con sangre ovina, debido al alto costo de la misma, y lo dificultoso que resulta el mantenimiento por su corto período de estabilidad.[11]

Por ello, varios laboratorios utilizan sangre humana proveniente de bancos de sangre para la preparación de medios microbiológicos.

El uso de sangre humana conlleva varios riesgos:

- Riesgo de adquirir infecciones transmitidas por la sangre (HIV, hepatitis y otras) por los trabajadores de la salud.
- Presencia de concentraciones variables de antibióticos y anticuerpos que interfieren en la recuperación de los microorganismos. [12]
- Muchas bacterias exhiben un crecimiento y patrones hemolíticos alterados, resultando en un alto riesgo de realizar diagnósticos erróneos. [12]

Si bien la búsqueda de SGB no es inaccesible en términos de disponibilidad técnica y de conocimientos teóricos, las cifras dispares de frecuencia y distribución, aún dentro de nuestro país [5, 13, 14-16], pueden obedecer, no sólo a variaciones geográficas sino, además, a variables metodológicas, muchas de ellas dependientes, no sólo del operador, sino de factores de accesibilidad a determinados productos o reactivos.

Dependiendo del lugar, la obtención de sangre equina o bovina es más accesible que la obtención de sangre ovina.

Dada la importancia de la detección de SGB, el objetivo de este estudio fue identificar los tipos de sangre que provean mejor rendimiento para el aislamiento e identificación de este microorganismo y que puedan ser utilizados en laboratorios de baja y mediana complejidad.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas estudiadas

Para este estudio, se seleccionaron al azar 30 cepas de SGB β -hemolíticas de colección de la Cátedra de Bacteriología recuperadas durante el período 2004–2009 de hisopados vagino–rectales de mujeres embarazadas con 35–37 semanas de edad gestacional.

Origen de la sangre utilizada

Se utilizó sangre ovina, bovina y equina desfibrinada estéril de origen comercial (HEMO-G, Rafaela, Santa Fe, Argentina). La sangre humana (grupo A+) anticoagulada con citrato fosfato dextrosa fue donada por el banco de sangre del Hospital Dr. Ramón Madariaga de Posadas, Misiones.

Recuento, evaluación del tamaño y grado de hemólisis de las unidades formadoras de colonias (UFC)

Se realizó, de cada cepa en estudio, una suspensión equivalente al 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/ml) en solución fisiológica estéril, las que se re-suspendieron en solución fisiológica estéril hasta lograr una dilución 1/10000.

Posteriormente, 5 μ l de cada suspensión se transfirieron a placas de agar sangre (agar Columbia suplementado al 5 % con sangre ovina, equina, bovina o humana) preparadas bajo idénticas condiciones. La siembra se realizó con ansa de recuento.

Las placas fueron incubadas por 24 hs. a 37 °C bajo atmósfera de CO₂.

El recuento bacteriano se realizó en forma manual.

El tamaño colonial y el grado de hemólisis (halo) se evaluaron midiendo con calibre en milímetros.

Prueba de CAMP

Se sembró una estría de *S. aureus* β -hemolítico (ATCC 25923) a lo largo de las distintas placas de agar suplementadas con las diferentes sangres.

Las cepas de SGB se sembraron, en ángulo recto, a 1–2 mm de la estría de *S. aureus*.

Las placas se incubaron durante 24 hs a 37 °C en aerobiosis.

La observación de un incremento de la hemólisis en el área de intersección de ambas cepas (en punta de flecha) se consideró como un resultado positivo.

Análisis estadístico

La comparación de las distintas variables se realizó utilizando el test no paramétrico de Friedman. [17]

Valores de p menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Comparación del rendimiento del agar sangre suplementado con eritrocitos humanos, ovinos, equinos y bovinos en el crecimiento bacteriano.

Recuento de UFC/ml

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 4 variables (medios de cultivos suplementados con eritrocitos humanos, ovinos, equinos y bovinos) en un nivel de confianza del 95 % ($p > 0,05$).

Tamaño colonial

En agar sangre humana se observó, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), el desarrollo de colonias de menor tamaño que al suplementar el medio con sangre de animales.

No se hallaron diferencias significativas en el tamaño de las colonias desarrolladas al utilizar sangre equina o bovina con respecto a las desarrolladas en sangre ovina (Figura 1).

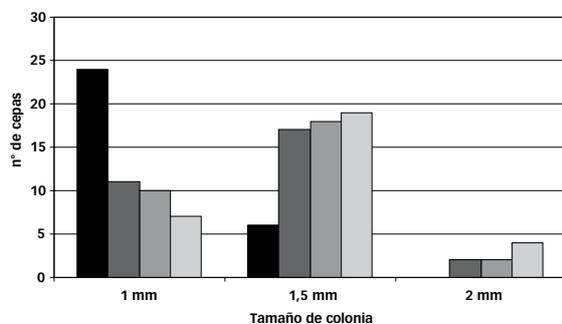


Figura 1. Tamaño (media) colonial de cepas de SGB en agar suplementado con distintos tipos de sangre. Referencias: ■ Humana; ■ Ovina; ■ Equina; □ Bovina.

Grado de Hemólisis

Se observó un mayor grado de hemólisis en sangre bovina con respecto a la sangre ovina y equina, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El menor grado de hemólisis se observó en sangre humana (Figura 2).

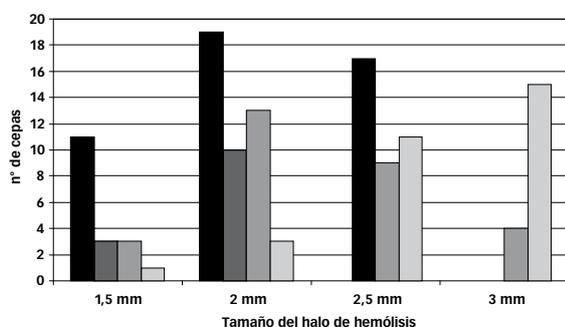


Figura 2. Grado de hemólisis (media) de cepas de SGB en agar suplementado con distintos tipos de sangre. Referencias: ■ Humana; ■ Ovina; ■ Equina; □ Bovina.

Comparación del rendimiento del agar sangre suplementado con eritrocitos humanos, ovinos, equinos y bovinos en la Prueba de CAMP

El 100 % de cepas de SGB (30/30) dieron una prueba de CAMP positiva tanto en sangre ovina como en sangre bovina.

En sangre equina el 100 % de las cepas (30/30) mostraron un resultado negativo en la prueba de CAMP.

En sangre humana, 40 % de cepas de SGB (12/30) dieron un resultado negativo.

Discusión

SGB es actualmente una de las causas principales de infección severa neonatal.

Este hecho nos obliga a mejorar los diagnósticos de SGB y hacerlos, en especial en nuestra provincia, más accesibles a laboratorios de mediana y baja complejidad.

En las técnicas utilizadas para el aislamiento de *Streptococcus* β -hemolíticos frecuentemente se utiliza agar sangre ovina y alternativamente en nuestro medio se utiliza agar sangre humana ya que permite reflejar las propiedades hemolíticas de los *Streptococcus*.

El personal de laboratorio debe estar advertido acerca de las variaciones en las reacciones hemolíticas que pueden producirse, según la especie animal de la que se obtenga la sangre.

Así, para el aislamiento de *Haemophilus influenzae* se prefiere sangre de caballo por carecer de muchos efectos inhibitorios sobre factores de crecimiento bacteriano y por ser una rica fuente de factor X. [6]

Se aconseja sangre humana para el aislamiento e identificación de *Gardnerella vaginalis* la que es hemolítica en sangre humana, pero no en agar sangre de animales. [6]

Los enterococos, que hemolizan sangre de carnero, sólo muy raramente producen un β -hemólisis visible en sangre de caballo. [6]

Staphylococcus aureus, que por lo general es β -hemolítico en sangre de carnero, a menudo no es hemolítico en sangre de caballo. [6]

Al analizar nuestros resultados, coincidimos con un estudio realizado en Perú [18] en que no encontramos diferencias significativas en el uso de sangre humana como sustituto de la sangre ovina en la recuperación de SGB.

Con respecto a la sangre equina, recomendada como segunda opción (luego de la ovina) y ampliamente utilizada en países europeos [6], tampoco observamos diferencias en la recuperación de SGB.

No encontramos referencias bibliográficas que evalúen el crecimiento de SGB en sangre bovina.

Nuestros resultados son comparables a los obtenidos en un estudio realizado en Australia [11] donde se observó el desarrollo de colonias más pequeñas y con menor grado de

hemólisis en sangre humana respecto a las desarrolladas en sangre ovina y equina.

Los resultados obtenidos al comparar el rendimiento del agar sangre suplementado con eritrocitos humanos, ovinos, equinos y bovinos en la Prueba de CAMP, coinciden con los informados por los descubridores del factor CAMP [7, 12].

Las diferencias en el crecimiento y en las reacciones hemolíticas detectadas al comparar los cultivos de SGB en sangre animal versus humana podrían deberse a diferencias en la morfología y en la composición de la membrana de los glóbulos rojos que afecta su susceptibilidad para ser lisados por las hemolisinas bacterianas. [19]

Se ha observado que los glóbulos rojos humanos son sustancialmente más grandes que los de oveja, así como se ha atribuido a las diferencias en el contenido de esfingomielina de la membrana de los eritrocitos, las discrepancias observadas en algunas pruebas bioquímicas como la prueba de CAMP. [19]

Ha sido informado que, los glóbulos rojos de oveja producen los mejores resultados en la prueba de CAMP debido a que contienen un 51 % de esfingomielina, a diferencia de los glóbulos rojos humanos, que solo la contienen en un 26 %.[20, 21]

Creemos importante mencionar (a pesar que el análisis de la estabilidad de las sangres no era objetivo de este estudio), que entre las placas de agar sangre animal, aquellas preparadas con sangre bovina se deterioraban (auto-hemólisis) más rápidamente luego de un tiempo de conservación (alrededor de 5 días) a temperatura recomendada.

Es reconocido que el almacenamiento de la sangre puede conducir a que los glóbulos rojos sufran cambios morfológicos y bioquímicos que incluyen daños oxidativos a las proteínas y lípidos de la membrana, disminución del pH, depleción de ATP, pérdida de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG), e incremento de potasio debido al mal funcionamiento de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPasa}$. [12]

El uso de sangre fresca evita estos cambios, que probablemente son la causa de las diferencias observadas en el crecimiento y reacciones hemolíticas de las bacterias en medios preparados con sangre.

Conclusiones

Sugerimos, en base a los resultados obtenidos en el presente estudio, el uso de sangre ovina o bovina para la recuperación e identificación de SGB en laboratorios de mediana y baja complejidad, evitando así el riesgo que significa el uso de sangre humana.

Considerando la accesibilidad de pequeños laboratorios a sangre obtenida directamente de animales, sería más factible en nuestra zona el uso de sangre bovina por volumen de extracción y facilidad de obtención.

Referencias bibliográficas

1. Larcher J.S., Capellino F., De Giusto R., Travella C., Balangione F.G., Kreiker G., Cardona H.P., Zarate A., Vilaro M., Hernandez D., Ruiz Orrico G. Colonización por estreptococo beta hemolítico del grupo B durante el embarazo y prevención de enfermedad neonatal. *Medicina (B. Aires)*; 65 (3): 201–206, 2005.
2. Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología (SEGO), Sociedad Española de Neonatología (SEN), Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Sociedad Española de Quimioterapia (SEQ), Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria (SEMFYC). Prevención de la infección perinatal por *Streptococcus* del grupo B. Recomendaciones españolas revisadas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21(8):417–423, 2003.
3. Brizuela M. Estreptococo *agalactiae* Grupo B (EGB). Patógeno emergente de infección grave en neonatos y niños. *Revista bioanálisis*; 13: 8–10, 2007.
4. Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes. Infect.*; 2 (14):1733–1742, 2000.
5. Schuchat A. Epidemiology of Group B Streptococcal Disease in the United States: Shifting Paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.*; 11: 497–513, 1998.
6. Chávez Castillo M., Livia Córdova G., Muñoz Ganoza E., Otiniano García M., Luján Velásquez M., Castro Sarabia J. Evaluación comparativa de agar sangre de carnero y agar sangre humana en el aislamiento de *Streptococcus* beta hemolíticos de pacientes con faringitis del Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo de Chiclayo, Perú 2006. *Rev. Med. Vallejana*; 4 (2):148–154, 2007.
7. Christie R., Atkins N.E., Munch Peterson E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*; 22:197–200, 1944.
8. Lang S., Palmer M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J Biol. Chem.*; 278 (40): 38167–38173, 2003.
9. Lang S, Xue J, Guo Z, Palmer M. *Streptococcus agalactiae* CAMP factor binds to GPI-anchored proteins. *Med. Microbiol. Immunol.*; 196 (1): 1–10, 2007.
10. Vera H.D., Power D.A. Culture media. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. , p. 965–999, 1980.
11. Russell F.M., Biribo S.S.N., Selvaraj G., Oppedisano F., Warren S., Seduadua A., Mulholland E.K., Carapetis J.R. As a bacterial medium, citrated hair sheep blood agar is a practical alternative to citrated human blood agar in laboratories in developing countries. *J. Clin. Microbiol.*; 44 (9):3346–3351, 2006.
12. Anand C., Gordon R., Shaw H., Fonseca K., Olsen M. Pig and goat blood as substitutes for sheep blood in blood-supplemented agar media. *J. Clin. Microbiol.*; 38:591–594, 2000.

13. Lopardo H.A., Vidal P., Jeric P., Centron D., Paganini H., Facklam R.R., Elliott J. Argentinian Streptococcus Study Group. Six-Month multicenter study on invasive infections due to Group B streptococci in Argentina. *J. Clin. Microbiol.*; 41(10): 4688–4694, 2003.
 14. Pérez J., Limansky A., Toresani I., Ebner G., Di Bartolomeo S., de Inocente I., Pretto G., Salazar N., Laferrara M., Bottiglieri M., Ballester D., Morales M., Rivera L., Cacace M.L., Castro H., Roldán L., Notario R., Borda N., Cera G., Spoletti M.J., Gregorini E., Sutich E.G. Distribución de tipo capsular y sensibilidad antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* productores de infecciones en Argentina. *Rev. Arg Microbiol.*; 36(2):63–67, 2004.
 15. Di Bartolomeo S., Gentile M., Priore G., Valle S., Di Bella A. *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. Prevalencia en el Hospital Nacional Alejandro Posadas. *Rev. Arg. Microbiol.*; 37(3):142–144, 2005.
 16. García S.D., Eiseth M.C., Lazzo M.J., Copolillo E., Barata A.D., de Torres R., Vay C.A., Famiglietti A.M. Portación de estreptococo grupo B en mujeres embarazadas. *Rev. Arg. Microbiol.*; 35(4):183–187, 2003.
 17. Daniel W.W. Estadística no paramétrica y de libre distribución. En: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. UTEHA Grupo Noriega editores. 3ra edición. p. 737–741, 1997.
 18. Valdés E., Pastene C., Morales A., Gutiérrez B., Canales A., Martínez P., Juárez G., Caballero R. Prevalencia de colonización por *Streptococcus agalactiae* (Grupo B) durante el embarazo pesquisado en medio de cultivo selectivo. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*; 69(2): 132–135, 2004.
 19. Yeh E., Pinsky B.A., Banaei N., Baron E.J. Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. *PLoS ONE*; 4 (7):1–7, e6141, 2009.
 20. Sterzik B., Fehrenbach F.J. Reaction components influencing CAMP factor induced lysis. *J. Gen. Microbiol.*; 131(4):817–820, 1985.
 21. Ways P., Hanahan D.J. Characterization and quantification of red cell lipids in normal man. *J. Lipid. Res.*; 5 (3):318–328, 1964.
- Marina Quiroga¹
Bioquímica; Especialista en Microbiología Clínica; Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Microbiología; Profesora Adjunta Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría II Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.
 - Eduardo Pegels¹
Licenciado en Bioquímica; Especialista en Microbiología Clínica; Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría III Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.
 - Patricia Oviedo¹
Bioquímica; Magíster en Gerenciamiento y Administración en Sistema de Salud; Jefe de Trabajos Prácticos, Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría III Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.
1. Cátedra de Bacteriología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Av. Mariano Moreno 1375 (3300) Posadas, Misiones, Argentina. minesvergara1@yahoo.com.ar. marinaquiroga@fceqyn.unam.edu.ar.

Recibido: 02/08/10.

Aprobado: 21/09/10.

- Regali Natalia¹
Bioquímico; Ayudante *ad-honorem* Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM.
- Marta Vergara¹
Bioquímica; Master Internacional en Bacteriología y Micología; Especialista en Educación Superior; Profesora Titular Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría II Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.