

COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA CON LA IDENTIFICACION SEROLOGICA DE *Streptococcus pyogenes*

Patricia Rivera*, Rosa M. Rodríguez*, Francisco Hernández**

Key Word Index: Group A *Streptococcus pyogenes*, bacitracin classification, serología classification

RESUMEN

Se compara la prueba de sensibilidad a la bacitracina, como método presuntivo, para clasificar las cepas de ***Streptococcus*** del Grupo A, con la prueba de precipitación en capilar empleando suero anti grupo A. Los resultados se analizan estadísticamente, asumiendo como sensibles a ese antibiótico, primero aquellas cepas que muestran halos de inhibición mínima de 10 mm de diámetro; o bien, como segunda definición, se consideró sensible un halo mínimo de 7 mm. Los parámetros evaluados para la primera definición de sensibilidad (10 mm) fueron: sensibilidad 88 por ciento, especificidad 94 por ciento, valor predictivo positivo 97,8 por ciento y valor predictivo negativo 72,3 por ciento. Para la segunda definición de sensibilidad (7 mm) los resultados fueron: sensibilidad 98,9 por ciento, especificidad 91,2 por ciento, valor predictivo positivo 96,8 por ciento y valor predictivo negativo 97 por ciento. Se concluye que, la definición óptima es aquella que permite captar la mayoría de las cepas del grupo A y ésta es la que señala como sensibles a la bacitracina las cepas con halos de inhibición de 7 o más milímetros. No obstante, aún bajo este criterio, se presenta un 3 por ciento de cepas resistentes a ese antibiótico, que son del grupo A (falsos negativos), por lo que se recomienda que las cepas resistentes sean reevaluadas mediante una prueba serológica. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1984; 5 (2);).

INTRODUCCION

Los estreptococos son parte de la flora indígena de boca y faringe, aunque también pueden localizarse en el intestino. Sin embargo, el *Streptococcus pyogenes* es un patógeno potencial, que ha sido relacionado con una serie de enfermedades, desde infecciones de tracto respiratorio superior, faringitis, hasta aislamientos en sangre de pacientes con erisipela, fiebre puerperal y celulitis. También, es un contaminante frecuente en heridas expuestas. Pero su mayor importancia médica estriba en las secuelas post infección, como fiebre reumática y glomerulonefritis. Estas infecciones se asocian patogénicamente a reacciones autoinmunes, inducidas por anticuerpos antiestreptocócicos que reaccionan en forma cruzada con antígenos de válvulas cardíacas y glomerulos renales(1, 9, 12). Estas secuelas post estreptocócicas obligan a identificar tempranamente y tratar las infecciones producidas por este agente, aún en cuadros relativamente leves.

Lancefield clasificó los *Streptococcus* en grupos antigénicos, algunos de los cuales son especie específicos, como el A que corresponde a *S. pyogenes*, cuya identificación puede hacerse serológicamente (2, 6, 11), o mediante la prueba de sensibilidad a la bacitracina, ya que es la especie del género más sensible a ese antibiótico (4, 5, 7, 10, 13, 14).

* Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social.

** Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica.

En este informe se compara la prueba de sensibilidad a la bacitracina con la precipitación en capilar, empleando anticuerpos tipo específicos, para identificar los *Streptococcus* del grupo A.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 126 cepas *Streptococcus* beta hemolíticos.

Las cepas se identificaron como *Streptococcus* sp, con base en la morfología de la colonia, tipo de hemólisis, tinción de Gram y catalasa. La clasificación del grupo A de Lancefield se realizó mediante precipitación en capilar, empleando antisuero tipo específico. Además, se analizó su sensibilidad a la bacitracina.

PRECIPITACION CAPILAR:

Se realizó según las especificaciones de la casa Difco (3), que en resumen son: las cepas de *Streptococcus* se inocularon en botellas con 40 ml de caldo de proteosa fosfato (medio de Todd Hewitt) y se incubaron a 35°C durante cinco minutos, para sedimentar las bacterias, que luego se resuspendieron en 0,5 ml de solución salina al 0,85 por ciento, y se autoclavaron a 212°C durante quince minutos. El material autoclavado se centrifugó para separar el polisacárido grupo específico (sobrenadante), de los detritos celulares (sedimento).

La precipitación se hace en capilares de 9 por 1 mm, llenando un tercio con el antisuero anti grupo A (Difco) y otro tercio se llenó con el sobrenadante de la cepa a analizar. Los capilares se colocaron verticalmente sobre una base de plasticina y se incubó a 4°C durante 12 horas. La identificación de cada tipo se hace por la presencia de un anillo de precipitación en la base del capilar.

SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA:

De cada cepa se tomaron tres a cuatro colonias y se pasaron a platos de agar sangre de carnero al 5 por ciento, distribuyendo la muestra en cuatro sentidos y se colocó un sensidisco impregnado con bacitracina (0,04 UI) en el traslape del primer y segundo rayado. Las placas se incubaron a 35°C durante 18 a 24 horas, en jarras con candela de extinción y se midieron los halos de inhibición. Se definió las cepas como sensibles, según dos criterios: a) cuando el halo de inhibición era igual o mayor a 7 mm. b) Cuando el halo era igual o mayor de 10 mm.

CORRELACION ESTADISTICA:

Se calculó el valor predictivo, tanto positivo como negativo, la sensibilidad y especificidad de la prueba de la bacitracina, con relación a la precipitación en capilar para la identificación de los *Streptococcus* grupo A.

Los términos y fórmulas empleadas fueron los siguientes:

- Verdadero positivo: Resultado positivo por la prueba de precipitación en capilar, empleando suero anti grupo A.
- Verdadero negativo: Resultado negativo por la prueba de precipitación en capilar, empleando suero anti grupo A.
- Falso positivo: Cepa que mostró un halo de inhibición a la bacitracina mayor o igual a 10 mm (ó 7 mm según se especifique) y mediante precipitación en capilar con antigupo A fue negativa.
- Falso negativo: Cepa que mostró un halo de inhibición a la bacitracina menor de 10 mm (o 7 mm según se especifique), pero que correspondió al grupo A mediante la precipitación en capilar.

% del valor predictivo = positivo	$\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$
% del valor predictivo = negativo	$\frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}} \times 100$
% de especificidad =	$\frac{\text{Verdaderos negativos} - \text{falsos positivos}}{\text{Verdaderos negativos}} \times 100$
% de sensibilidad =	$\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$

Estos términos y fórmulas fueron adaptados de Hamaudi y colaboradores (8).

RESULTADOS

PRECIPITACION EN CAPILAR:

De las 126 cepas analizadas, 92 fueron clasificadas en el Grupo A mediante la prueba de precipitación en capilar, empleando sueros anti grupo A, y se consideran verdaderos positivos; las 34 cepas restantes fueron negativas en cuanto a precipitación con anti A y las consideramos verdaderos negativos.

SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA:

Los resultados de sensibilidad a la bacitracina se analizaron tomando dos parámetros diferentes para clasificar las cepas sensibles. Primero, se asumió que las cepas eran sensibles cuando el halo de inhibición tenía un diámetro igual o mayor de 10mm. Como segunda opción, se tomaron como sensibles las cepas que mostraban halos con un diámetro mínimo de 7 mm.

Analizando los datos con base en la primera opción (sensible = 10mm), se encontraron 79 cepas sensibles; dos de las cuales habían sido negativas por la prueba de precipitación con anti A, por lo que se consideran "falsos positivos". En tanto 13 de las 47 cepas que resultaron resistentes (halos menores de 10 mm), fueron positivas por la prueba

CUADRO 1

COMPARACION DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA Vs. PRECIPITACION EN CAPILAR CON ANTI A, PARA LA IDENTIFICACION DE *S. pyogenes**

EVALUACION	HALOS DE INHIBICION EN mm		% Cambio
	= 0	= 7	
Falsos positivos	2	3	
Falsos negativos	13	1	
% Sensibilidad	88	98.4	10.9
% Especificidad	94	91.2	-2.8
% Del valor predictivo positivo	97.8	96.8	-1
% Del valor predictivo negativo	72.3	97	24.7

* De las cepas estudiadas, 92 fueron verdaderos positivos y 34 verdaderos negativos, según precipitación en capilar.

de precipitación, o sea, fueron “falsos negativos”. De estos datos se desprende que la sensibilidad de la prueba es del 88 por ciento y la especificidad del 94 por ciento, con un porcentaje de valor predictivo positivo del 97,8 por ciento y un porcentaje de valor predictivo negativo del 72,3 por ciento (Cuadro 1).

A la luz de la segunda opción para juzgar la sensibilidad a la bacitracina (sensible = 7 mm), se encontraron 94 cepas sensibles, de las cuales tres fueron falsos positivos; también, entre las resistentes se encontró un falso negativo. Estos datos arrojan una sensibilidad de 98,9 por ciento, una especificidad de 91,2 por ciento, un valor predictivo positivo de 96,8 por ciento y un valor predictivo negativo de 97 por ciento (Cuadro 1).

DISCUSION

Para la primera opción (sensible = 10mm), la prueba tiene una sensibilidad de 88 por ciento, con un número relativamente alto de falsos negativos (13 casos). En contraposición, la segunda opción (sensible = 7mm) eleva la sensibilidad de la prueba a 98,9 por ciento, pues disminuyen sustancialmente los resultados falsos negativos (un caso); pero se sacrifica un poco la especificidad de la prueba, pues ésta cambia de 94 por ciento a 91,2 por ciento, ya que los resultados falsos positivos aumentaron de 2 a 3 casos.

Análogamente, el valor predictivo de la prueba cambia de una opción a la otra. Así, el valor predictivo positivo de la primera opción fue de 97 por ciento, lo que significa que al aseverar que un determinado resultado es positivo existirá un 2,2 por ciento de posibilidades de que se trate de un falso positivo, o bien, en 100 determinaciones positivas habrán 2,2 por ciento falsos positivos. En tanto el valor predictivo negativo fue de 72,3 por ciento, o sea, que un 27,7 por ciento de los valores catalogados como negativos son falsos negativos.

Por otra parte, la segunda opción (sensible = 7mm) arroja un valor predictivo positivo de un 1 por ciento inferior a la primera (96,8 por ciento), o sea, que se aumenta a 3,8 por ciento las posibilidades de obtener resultados falsos positivos. Pero el valor predictivo negativo mejoró en un 24,7 por ciento, ya que éste aumentó de 72,3 por ciento a 97 por ciento, lo que indica que sólo hay un 3 por ciento de error en la catalogación de los resultados falsos negativos.

Al parangonar ambas opciones para clasificar las cepas de *Streptococcus*, y, por ende, clasificarlas en el grupo A, debe hacerse tomando en consideración las secuelas que podrían sufrir los individuos infectados con esta bacteria si no son tratados. Así, sería recomendable aquella prueba que captara más casos positivos, o sea, que presentara menos falsos negativos. Esta es la segunda opción. Por lo tanto, debe asumirse que las cepas de *Streptococcus* son sensibles a la bacitracina cuando muestran halos de inhibición de 7 o más milímetros de diámetro, ya que posiblemente serían del grupo A de Lancefield. El asumir esta opción, implicaría que un 3,2 por ciento de los pacientes a los que se les diagnostique una cepa del Grupo A recibirían un tratamiento innecesario, ya que serían falsos positivos; pero sólo quedaría un 3 por ciento de falsos negativos, de pacientes infectados con ***Streptococcus*** grupo A, que no serían diagnosticados, pues esas cepas serían catalogadas como resistentes, y serían diagnosticadas equivocadamente como diferentes del grupo A, cuando en realidad pertenecen a este grupo.

Concluyendo, con base en estos datos, se recomienda que se aplique la prueba de sensibilidad a la bacitracina, para identificar presuntivamente las posibles cepas de *Streptococcus* del grupo A se definirán como sensibles, aquellas que muestren halos de inhibición mínimos de 7mm de diámetro. A la vez, las cepas resistentes a este antibiótico deben estudiarse mediante precipitación en capilar u otra prueba serológica, que permita captar ese 3 por ciento de cepas de *S. pyogenes* (Grupo A) resistentes a la bacitracina y que han sido denominadas en este trabajo como "falsos negativos".

ABSTRACT

*The bacitracin sensibility test a presuntive method to classify the group A **Streptococcus**, was compared with a capilar precipitation test using anti A serum. The results were statistically analyzed, accepting two definitions for antibiotic sensibility: first, a sensibility strain exhibited a inhibition halo of 10 or more mm; the other criterion was 7mm of halo. The analysis of the first definition had: a 88 por ciento sensibility, 94 por ciento specificity, 97,8 percent predictive positive value and 72,3 percent predictive negative value. For the second definition the parameters were: 98,9 percent sensibility, 91,2 percent specificity, 96,8 percent predictive positive value and 97 percent predictive negative value. It was concluded that the best definition permitted the diagnosis of more group A strains, and this was the second proposal (sensibility = 7mm of inhibition halo); but 3 percent of the group A strains were bacitracin resistant (false negative). However, we recommend testing the bacitracin resistant strains, with some serological method to classify group A.*

BIBLIOGRAFIA

- 1.— Burrows, W. *Tratado de microbiología*. 19 ed. Editorial Interamericana, S. A., México, 1969; 424-445.
- 2.— Damask, L. J., Montoya, O., Axelrod, J. L. Rapid slide agglutination test for Lancefield grouping of Streptococci. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1979; 103: 456-458.
- 3.— Difco. *Supplementary Literature* Difco Laboratories Detroit, Michigan 48232. 1972; 366.
- 4.— Facklam, R. R., Padula, J. F., Wortham, E. D., Cooksey, R. C. and Rounthe, H. A. Presumptive identification of group A, B and D. Streptococci on agar plate media. *J. Clin. Microbiol.* 1979; 9: 665-672.
- 5.— Facklam, R. R., Padela, J. F., Thacker, L. G., Worthan, E. C. and Sconyers, B. J. Presumptive identification on group A, B and D Streptococci. *Appl. Microbiol.* 1974; 27: 107-113.
- 6.— Finch, R. G. and Philips, I. Serological grouping of Streptococci by a slide coagglutination method. *J. Clin. Pathol.* 1977; 30: 168-170.
- 7.— Gray, B. M., Pass, M. A. and Dillon, H. C. Jr. Laboratory and field evaluation of selective media for isolation of group B Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1979; 9: 466-470.
- 8.— Hamaudi, A. Ch., Marcon, M.J., Cannon, H.J. McClead, R. E. Comparison of three major antigen detection methods for the diagnosis of group B. streptococcal sepsis in neonates. *Pediatr. Infect. Dis.* 1983, 2: 432-435.
- 9.— Lennette, E. H., Spauling, E. H. Truant, J. P. *Manual of Clinical Microbiology*. 3ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1980; 88-110.
- 10.— Levinson, M. T. Frank, P. F. Differentiation of group A from other beta hemolytic streptococci with bacitracin. *J. Bacteriol.* 1955; 69: 284-287.
- 11.— Matthie, D. E. Jr., Wasilaukas, B.L. Stallings, R. A. A rapid Staphylococcal coagglutination technic to differentiate group A from other Streptococcal groups. *Am J. Clin. Pathol.* 1979; 72: 463-467.
- 12.— Margolis, H. S., Lum, M.W., Bender, T. R., Eliot, S.L., Fitzgerald, M.A., Harpster, A.P. Acute glomerulo nephritis and stretococcal skin lesions in eskimo children. *Am J. Dis. Chil.* 1980; 138: 681-685.
- 13.— Maxted, W. R. The use of bacitracin for identifying group A haemolytic streptococci. *J. Clin. Pathol.* 1953; 6: 224-226.