



**Universidad  
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE CIENCIA DE LA SALUD  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EVALUACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR SANGRE HUMANA  
CON GLÓBULOS ROJOS LAVADOS PARA EL DESARROLLO DE  
CEPAS DE *Streptococcus agalactiae***

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA  
EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LABORATORIO CLÍNICO Y  
ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**AUTORES:**

Bachiller CANO CORALES, KATIA ALEJANDRA

Bachiller UGARTE CÓRDOVA, ANA MARGARITA

**LIMA -PERÚ**

**2020**



## **DEDICATORIA**

Dedicamos este logro a nuestros  
padres por el esfuerzo y  
perseverancia para con nosotros.  
Por habernos apoyado  
continuamente a lo largo de nuestra

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, agradecer a Dios por permitir desarrollarnos profesionalmente en esta prestigiosa universidad, para así, forjar nuestro futuro a base de esfuerzo y disciplina.

A nuestros docentes por sus enseñanzas vertidas durante estos cinco años de formación académica.

A nuestro asesor, al Dr. Pedro Javier Navarrete y al Licenciado Tecnólogo Médico Raúl Vicuña Osorio, por su valioso aporte en cada etapa de la elaboración de nuestra tesis para lograr la licenciatura.

**ASESOR DE TESIS**

MG. BORJA VELEZMORO, GUSTAVO ADOLFO

**JURADO**

PRESIDENTE

Dr. ASTETE MEDRANO, DELIA JESSICA.

VOCAL

Mg. GUADALUPE GOMEZ, HAYDEE ANA.

SECRETARIA

Mg. HUAMAN CARDENAS, VICTOR RAUL

## Índice

CAPÍTULO I.....	13
EL PROBLEMA.....	13
1.1. Planteamiento del problema.....	13
1.2. Formulación del problema.....	15
1.2.1. Problema General.....	15
1.2.2. Problemas específicos.....	15
1.3. Justificación .....	16
1.4. Objetivos.....	17
1.4.1. Objetivo general.....	17
1.4.2. Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO II.....	18
MARCO TEÓRICO .....	18
2.1. Antecedentes .....	18
2.2. Bases Teóricas .....	27
2.2.1. Características Generales de los <i>Streptococcus</i> .....	27
2.2.2. Antígenos de los <i>Streptococcus</i> .....	29
2.2.3. <i>Streptococcus agalactiae</i> o Estreptococo del grupo B .....	31
2.2.4. Diagnostico microbiológico: .....	39
3.3. Terminología básica.....	60
3.4. Hipótesis .....	61
3.5. Variables e indicadores.....	62
CAPÍTULO III.....	63
DISEÑO METODOLÓGICO.....	63
4.1. Tipo de investigación .....	63
4.2. Ámbito de la investigación.....	63
4.3. Población y Muestra.....	63
4.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos .....	64
4.5. Plan de procesamiento y análisis estadístico .....	67
4.6. Aspectos éticos.....	68

CAPÍTULO IV.....	69
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
5.1. Resultados.....	69
5.2. Discusión .....	78
CAPÍTULO V.....	81
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	81
6.1. Conclusiones .....	81
6.2. Recomendaciones .....	82
REFERENCIAS .....	84
ANEXOS.....	90



## ÍNDICE TABLAS

	Pág.
Tabla N°1. Clasificación de los <i>Streptococcus</i> de importancia clínica.....	28
Tabla N°2. Clasificación de Lancefield.....	30
Tabla N°3. Interpretación de la bacitracina y STX.....	54
Tabla N°4. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.....	58
Tabla N°5. Tasas de evaluación del ASHGL a las 24 horas de Incubación para el desarrollo de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	70

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1. $\beta$ – hemólisis .....	47
Gráfico N° 2 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	49
Gráfico N° 3 Prueba de catalasa.....	51
Gráfico N° 4 Prueba de sensibilidad a la bacitracina.....	52
Gráfico N° 5 Sensibilidad a la bacitracina y el SXT.....	54
Gráfico N° 6 Prueba de CAMP.....	56
Gráfico N° 7 Prueba de CAMP positivo.....	57
Gráfico N° 8 Cepas ATCC de <i>Streptococcus agalactiae</i> en ASC y ASHGL.....	71
Gráfico N°9 Betahemólisis y colonias en ASHGL y ASC.....	72
Gráfico N°10 Coloración GRAM.....	73
Gráfico N°11 Prueba de CATALASA.....	73
Gráfico N°12 BACITRACINA Y STX en ASC.....	74
Gráfico N°13 CAMP en ASHGL y ASC.....	75
Gráfico N°14 Ficha de recolección de datos.....	76

Gráfico N° 15 Uropatógenos y línea de tendencia del aumento de *Streptococcus agalactiae* durante los años 2010 a 2018 recuperados en muestras de orina en el Hospital San Bartolomé.....77

## RESUMEN

El presente estudio evaluó el rendimiento del medio de cultivo alternativo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL), para el desarrollo de cepas de *Streptococcus agalactiae*, frente al agar sangre de carnero al 5% como patrón de referencia. En los laboratorios de microbiología ocasionalmente reemplazan a la sangre de carnero con sangre humana para la preparación de medios de cultivo. Se realizó un estudio observacional tipo descriptivo de corte transversal. La muestra estuvo conformada por 36 cepas de *Streptococcus agalactiae* debidamente identificadas con el sistema automatizado Vitek 2 compact y la realización de la prueba de CAMP. En el Servicio de Microbiología del Hospital Docente Madre-Niño San Bartolomé. Los resultados obtenidos del medio ASHGL al 5 % evidenciaron a las 24 horas de incubación una sensibilidad y especificidad de 100%, respectivamente. Valores predictivos positivo y negativo alcanzaron un 100 %. La morfología de las colonias y la presencia de la beta hemólisis en agar sangre de carnero al 5 % y ASHGL al 5 % se evidenciaron a las 24 horas de incubación y se mantuvieron así hasta las 48 horas de incubación. Por lo tanto, se concluye que el medio agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL) es tan eficaz como el medio agar sangre de carnero al 5%, utilizado como patrón de referencia.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, beta hemólisis.

## SUMMARY

The present study evaluated the performance of the alternative culture medium human blood agar with washed red blood cells at 5% (ASHGL), for the development of *Streptococcus agalactiae* strains, against sheep blood agar at 5%, as a reference standard. In microbiology laboratories, they occasionally replace sheep's blood with human blood for the preparation of culture media. An observational, descriptive, cross-sectional study was carried out. The sample consisted of 36 *Streptococcus agalactiae* strains duly identified with the Vitek 2 compact automated system and the CAMP test was carried out. In the Microbiology Service of the Hospital Teaching Madre-Niño San Bartolomé. The results obtained from the 5% ASHGL medium showed a sensitivity and specificity of 100%, respectively, at 24 hours of incubation. Positive and negative predictive values reached 100%. The morphology of the colonies and the presence of beta hemolysis in 5% sheep blood agar and 5% ASHGL were evidenced at 24 hours of incubation and remained so until 48 hours of incubation. Therefore, it is concluded that the human blood agar medium with washed red blood cells at 5% (ASHGL) is as effective as the sheep blood agar medium at 5%, used as a reference standard.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, positive predictive value, negative predictive value, beta hemolysis

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1. Planteamiento del problema

El estreptococo beta hemolítico del grupo B (EGB) o *Streptococcus agalactiae*, se encuentra como microbiota en el tracto gastrointestinal y genitourinario; sin embargo, esta bacteria al colonizar el tracto genital de las gestantes puede causar cuadros clínicos que afecten a la mujer (cistitis) y al neonato (sepsis neonatal, neumonía y shock séptico)<sup>1</sup>.

En el Perú se ha reportado prevalencia, colonización de *Streptococcus agalactiae*, del 10.9% en gestantes<sup>2</sup>. Haciendo urgente el diagnóstico preciso, correcto y oportuno para el inicio de tratamiento adecuado y como forma de prevención de la transmisión. Es muy importante cumplir con las medidas y condiciones necesarias para su aislamiento debido a que es una bacteria muy exigente, reduciendo así, la posibilidad de falsos negativos.

Los problemas o errores en el aislamiento de *Streptococcus agalactiae* se presentan, por lo general, por una mala toma de muestra, muestras de pacientes que han recibido terapia antibiótica, mal procesamiento de la muestra, incubación breve (menos de 48 horas), presencia de cepas no hemolíticas y el uso de medio de cultivo alternativo (sangre humana reemplazando sangre de carnero)<sup>3,4</sup>.

La sangre de carnero, para la preparación del agar sangre, es recomendada por normas Nacionales e Internaciones, pero su elevado costo limita el uso solo a laboratorios de referencia nacional o investigación (INS).

Algunos laboratorios hacen uso de la sangre humana provenientes de los bancos de sangre para la elaboración de medios de cultivo, así como también, de la donación voluntaria del personal miembros del laboratorio<sup>5,6</sup>, sin embargo, su uso no es recomendable ya que conlleva a varios riesgos tales como: El personal que trabaja en la elaboración del medio de cultivo podría correr el riesgo de adquirir enfermedades infecciosas transmitidas por la sangre humana como hepatitis B, HIV, etc., la presencia de concentraciones variables de antibióticos, anticuerpos y anticoagulante, dando como resultado un deficiente aislamiento bacteriano y hemolisis apenas visible o ninguna presencia de hemolisis, interfiriendo así con el normal crecimiento del *Streptococcus agalactiae* dando como resultado falsos negativos.<sup>3,7,8</sup>

Por ello es necesario conocer e implementar estrategias que permitan el uso de la sangre humana para la elaboración de medios de cultivo reduciendo al mínimo las interferencias en el crecimiento de determinados agentes bacterianos.

## 1.2. Formulación del problema

### 1.2.1 Problema General

¿Cuál es el rendimiento del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados para el desarrollo de cepas de *Streptococcus agalactiae*?

### 1.2.2 Problemas Específicos

2. ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados para el desarrollo de cepas de *Streptococcus agalactiae*?
3. ¿Cuál es el valor predictivo positivo y negativo del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados para el desarrollo de cepas de *Streptococcus agalactiae*?

### 1.3. Justificación

El hisopado vagino-ano-rectal, es considerado como la muestra idónea para detectar colonización por *Streptococcus agalactiae* en gestantes; el medio de elección es el agar sangre de carnero al 5% (elevada sensibilidad y especificidad). Laboratorios de microbiología hacen uso de sangre humana como alternativa a la sangre de carnero para la preparación del medio de cultivo (agar sangre), pero esto conlleva a obtener resultados falsos negativos.

El uso de sangre humana con glóbulos rojos lavados, podría ser una alternativa importante para el aislamiento e identificación de *Streptococcus agalactiae*, no solo por el tema de costos, sino también por la oportunidad de diagnóstico y tratamiento oportuno para el paciente. De determinar su utilidad diagnóstica, sería una alternativa confiable para el trabajo de rutina en el área de microbiología, en el aislamiento e identificación de *Streptococcus agalactiae*.



## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general**

Evaluar el rendimiento del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados para el desarrollo de cepas de *Streptococcus agalactiae*.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

4. Determinar la sensibilidad y especificidad del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados.
5. Determinar el valor predictivo positivo y negativo del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes

Briceño C. (2018, Nicaragua), realizó en el Hospital Bertha Calderón Roque Durante el mes de enero del año 2018, un estudio con la finalidad de precisar la prevalencia de colonización vaginal por *estreptococo*  $\beta$ -hemolítico grupo B. La muestra estuvo conformada por 23 mujeres con edad gestacional de 35 a 37 semanas, hospitalizadas en el servicio de alto riesgo obstétrico de dicho hospital. Se encontró de las 23 mujeres gestantes un total de 7 con crecimiento de flora vaginal normal (31%), indicando una prevalencia alta, lo cual favorece a las gestantes. Un 21% que corresponde a 5 pacientes se aisló *Candida albicans*; solo el 4.3% hubo aislamiento de *Streptococcus agalactiae*. En su mayoría mujeres con 37 semanas de gestación. Concluyendo que según las características sociodemográficas las gestantes que formaron parte del estudio tenían una edad comprendida de 20 a 24 años con secundaria como nivel de escolaridad y provenientes de zona urbana. Finalmente, la prevalencia de estreptococo beta hemolítico grupo B fue muy baja y no se encontró ningún recién nacidos con sepsis neonatal <sup>9</sup>.

Alva J. (2017, Perú), realizó un estudio con el objetivo de evaluar la frecuencia de *Streptococcus agalactiae* en gestantes del tercer trimestre de edad gestacional de un centro Materno de la ciudad de Trujillo. Se evaluó a una población de 86 mujeres en el tercer trimestre de gestación, las muestras obtenidas fueron de secreción vaginal y anorrectal, utilizaron caldo Todd Hewitt suplementado con gentamicina (8mg/ml) y Ácido Nalidíxico (15mg/ml) como medio de enriquecimiento selectivo.

Posteriormente las muestras fueron sembradas en el cultivo agar sangre de carnero al 5% e incubado a 37 °C durante 24 a 48 horas. A las colonias obtenidas, se le realizaron coloración Gram, prueba de CAMP, resistencia a Bacitracina, resistencia a Trimetropim-Sulfametoxazol e identificación bacteriana mediante paneles de MicroScan. El resultado obtenido fue el aislamiento *Streptococcus agalactiae* en una sola paciente, lo cual representa una frecuencia de 0.86 %. El autor concluye; que la frecuencia de *Streptococcus agalactiae* en el centro Materno infantil El milagro es bajo<sup>10</sup>.

Niederstebruch N. (2017, Alemania), realizó un estudio con el fin de determinar la idoneidad del medio de cultivo agar sangre con sangre humana citratada reconfigurada, con respecto a la visibilidad de la hemólisis y características de los antibiogramas. Las muestras utilizadas fueron cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus mitis*. Todas las cepas mencionadas anteriormente se aislaron a partir de muestras clínicas en placas de agar sangre que contenían agar Columbia enriquecido con sangre de carnero al 5 %. Para comparar la visibilidad de la hemólisis, se tomó una colonia de cada bacteria ya mencionada y se cultivó en: (1) agar Columbia enriquecido con 5% de sangre de oveja desfibrinada (dSBA5.0) como patrón de referencia; (2) agar Columbia enriquecido con 5% de sangre humana citratada (cHuBA5.0); y (3) agar Columbia enriquecido 2.5% de sangre humana citratada (cHuBA2.5). Para la evaluación de la sensibilidad se utilizó: (1) agar Mueller-Hinton agar enriquecido con 5% de sangre de oveja desfibrinada como patrón de referencia; (2) agar Mueller-Hinton enriquecido con 5% de sangre humana citratada; y (3) agar Mueller-Hinton enriquecido 2.5% de sangre humana citratada (cHuBA2.5). Los resultados obtenidos en los agares de

sangre reconfigurada que contenía 2.5% de sangre humana citratada mostraron reacciones casi idénticas al del agar sangre enriquecido 5% de sangre carnero desfibrinada utilizada como patrón de referencia, es decir: en la morfología de las colonias: tamaño, apariencia, y en la evidencia de la hemólisis. Con respecto a las pruebas de sensibilidad también se obtuvieron resultados similares en el agar sangre reconfigurados con el agar Mueller-Hinton enriquecido con 5% de sangre de oveja desfibrinada como patrón de referencia. Finalmente, el estudio muestra por primera vez, que los agares que contienen 2.5% de sangre humana citratada, es una alternativa para el aislamiento de *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus mitis* y *Staphylococcus aureus*. Así como también para la utilización en la sensibilidad antibiótica de los patógenos anteriormente mencionados. Por lo tanto, en un futuro los laboratorios de los países en vía de desarrollo podrán realizar la preparación de este nuevo agar sangre reconfigurado<sup>7</sup>.

Rubio M. (2016, Perú), realizó en el hospital Nacional Cayetano Heredia en los meses comprendidos de enero a mayo. Un estudio con el objetivo de conocer la frecuencia de gestantes portadoras de *Streptococcus agalactiae*, así mismo, comparar la frecuencia de acuerdo a la zona de colonización en secreción vaginal y ano-rectal, y explorar la asociación entre las características clínica y sociodemográficas con ser portador de este microorganismo. Para este trabajo se tomaron muestras de secreción vaginal y ano-rectal a 53 gestantes 35 a 37 semanas de embarazo, para cultivarlo en agar sangre de carnero desfibrinada al 5% y luego identificarlo de acuerdo al protocolo de procesos estandarizados. Los resultados obtenidos de las 53 gestantes evaluadas la edad promedio fue de 28.2 años, en 9 de ellas se identificó *Streptococcus agalactiae* siendo un 17%, y lo restante que

pertenece a 83% fueron negativo para este patógeno, cabe resaltar 3 de las 9 gestantes que dieron positivo a *Streptococcus agalactiae* tuvieron antecedentes de abortos y diabetes. Respecto a la zona anatómica: solo la colonización vaginal fue de 45%, la colonización ano-rectal 33% y la colonización vaginal y ano-rectal 22%. Se observó un 89 % de colonización en gestantes de 35 a 37 semanas de gestación. Los investigadores concluyen que el porcentaje de colonización por *Streptococcus agalactiae* es considerable, recomendando así que los centros de salud deben de implementar protocolos de prevención para este microorganismo<sup>11</sup>.

Sotomayor F. (2015, Perú), realizó un estudio en el Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión con la finalidad de identificar la prevalencia de *Streptococcus* beta hemolíticos, en mujeres con amenaza de parto pretérmino, hospitalizadas en la unidad de embarazo patológico en dicho nosocomio. Fueron 30 gestantes quienes formaron parte del estudio, las muestras obtenidas fueron hisopado vaginal y rectal. Se utilizaron como medio de transporte el medio AMIES y luego se sembró en agar sangre, caldo de granada y agar cromogénico. Los resultados fueron: el 60 % de los cultivos positivos fue *E. coli*, el 6.67 % *Gardnerella vaginalis*, un 6.67% *Enterobacter aerogenes* y 3.33% *Klebsiella pneumoniae*. Finalmente, el 23.3% de gestantes muestran flora vaginal normal. En conclusión, las muestras estudiadas ninguna fue positivo para *Estreptococo* del grupo B. cabe indicar que, la edad promedio de las gestantes fue de 26 años, el 80 % de ellas son amas de casa, y el 73% solo referían secundaria como grado académico<sup>2</sup>.

Brañez J. (2015, Perú), realizaron una investigación con el objetivo de determinar la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes de tercer trimestre en el centro de salud de Ocopilla Huancayo. Se tomaron muestras de hisopado vaginal y rectal de las 50 gestantes atendidas en el centro de salud quienes conformaron el estudio, seguidamente las muestras fueron cultivadas en agar sangre de carnero al 5% incubadas a 37°C de 24 a 48 horas en condiciones de microaerofilia al 5%. Logrando identificar 10 gestantes positivas, de los cuales 5 fueron vaginales con un 10% y 10 rectales con un 20%. Los autores concluyen que la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* fue de un 10%, sin embargo, el nivel de colonización fue de un 20 %<sup>12</sup>.

Guisha D. (2015, Ecuador), desarrolló un estudio con la finalidad de identificar *Estreptococo* beta hemolítico del grupo B y su relación con infecciones vaginales en gestantes de 35 a 37 semanas de embarazo. La muestra estuvo conformada por todas las pacientes gestantes que acudieron a su control prenatal en el centro de salud tipo "A" Pujalí durante los meses de febrero a marzo. Se les realizó la obtención de muestra de exudado vaginal, el cual fue cultivado en agar sangre de carnero al 5% para su posterior identificación. De las 90 gestantes que asistieron solo 24 de ellas tuvieron cultivos positivos: 9 presentaron *Staphylococcus epidermidis* (37,50%), 11 gestantes *Staphylococcus aureus* (45.83%), y en 4 gestantes se obtuvo *Streptococcus agalactiae* lo que representa el 16.67%. El estudio concluyó que las bacterias predominantes son los cocos Gram positivo, estableciendo que solo 4 mujeres fueron positivas para *Streptococcus agalactiae* de 90 mujeres que formaron parte del estudio<sup>13</sup>.

Gonzaga G. (2014, Ecuador), desarrolló una investigación tipo descriptivo de corte transversal en gestantes de 28 a 37 semanas de embarazo, con el objetivo de identificar la presencia de *Streptococcus agalactiae* y conocer la susceptibilidad antimicrobiana. Para llevar a cabo el estudio se obtuvo secreción vaginal de 50 pacientes que cursaban el tercer trimestre de gestación, quienes forman parte de la muestra de estudio, una vez obtenidas las muestras se realizó el aislamiento en el medio agar sangre de cordero al 0.5 % y posterior identificación según los protocolos establecidos. Obteniéndose los siguientes resultados: un 96% de casos negativo y un 4% de casos positivos para *Streptococcus agalactiae*, a los casos positivos se realizó el antibiograma presentando sensibilidad a penicilina y a cefazolina del 100%. El autor concluye que se logró identificar dos casos positivos a *Streptococcus agalactiae*, así como también la susceptibilidad antimicrobiana, además, el personal del centro de salud tiene conocimiento de los resultados para la administración del tratamiento respectivo. Al término del estudio el autor recomienda realizar rutinariamente previo al parto para poder prevenir las infecciones en el recién nacido<sup>14</sup>.

Salgado R. (2014, Nicaragua), se desarrolló en un hospital de Nicaragua un estudio a mujeres gestantes mayor de 35 semanas de embarazo con el objetivo de identificar la prevalencia de colonización vaginal y ano-rectal por *Streptococcus Agalactiae* y algunos procesos patológicos asociados a su colonización. Para este estudio las muestras obtenidas fueron sembradas en Medio de cultivo Granada, obteniendo un resultado del 19% de prevalencia de *Estreptococo* del grupo B en embarazadas mayor de 37.6 semanas con una edad media de 23.8 años, por consiguiente, los

procesos patológicos asociados a las pacientes que participaron en el estudio de investigación fueron: infección de vías urinarias 79%, leucorrea 62.5%, amenaza de parto prematuro 20.8%. En conclusión, las mujeres que participaron en el estudio en su mayoría fueron casadas o convivientes, con un grado académico de secundaria. La prevalencia de aislamiento para *Streptococo* beta hemolítico del grupo B en pacientes con un embarazo mayor o igual a 35 semanas fue de 19.4% <sup>15</sup>.

Álvarez A. (2011, Cuba), desarrolló un estudio con la finalidad de identificar la prevalencia de colonización vaginal/rectal por *Streptococcus Agalactiae*. Se obtuvieron 120 muestras de hisopado vaginal y rectal de mujeres de 35 a 37 semanas de embarazo. Las muestras fueron cultivadas en caldo Todd Hewitt y medio Granada para posteriormente calcular la sensibilidad y especificidad de los medios antes mencionados. Los resultados obtenidos fueron: con el medio de Granada se obtuvo una especificidad superior a 94,57% y una sensibilidad de 60,71% para el aislamiento de *Streptococo*  $\beta$ -hemolítico grupo B (SGB). Luego de la resiembra en agar sangre de carnero a partir del caldo Todd Hewitt demostró la colonización por *estreptococo*  $\beta$ -hemolítico grupo B (SGB) en un 27,5% de colonización vaginal/rectal de las mujeres gestantes. Se concluye: que el cultivo de exudados rectales incrementa la posibilidad de detectar la colonización genital por *Streptococo* beta hemolítico del grupo B<sup>16</sup>.

Regali N. (2010, Argentina), realizó un estudio con el objetivo de determinar el mejor rendimiento de los diferentes tipos de sangre (ovino, bovino, equino y humana), para el aislamiento e identificación de *Streptococcus agalactiae* para poder ser utilizados



en los laboratorios de baja y mediana complejidad. La muestra estuvo conformada por 30 cepas identificadas de *Streptococcus agalactiae*.

Los resultados obtenidos muestran que la sangre de ovino y bovino presenta un mejor rendimiento en el aislamiento de *Streptococcus agalactiae*, evidenciándose en la morfología de las colonias, el grado de hemolisis y el CAMP. Los autores concluyen el estudio, recomendando el uso de sangre ovino o bovino, para el aislamiento e identificación de *Streptococcus agalactiae* en los laboratorios de baja y mediana complejidad. Evitando así el uso de sangre humana que puede ser un riesgo para el personal de laboratorio <sup>5</sup>.

Valencia I. (2009, Bolivia), realizó un estudio con el objetivo de evaluar la eficacia de medios de cultivos alternativos: Agar Sangre humana con glóbulos rojos lavados (ASHGL), Agar Sangre humana con glóbulos rojos lavados más azida sódica (ASHGLA) Y Agar Sangre humana con glóbulos rojos sin lavar (ASH), para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* beta hemolíticos, frente al Agar sangre de carnero como Gold estándar a las 24 y 48 horas de incubación. El estudio estuvo conformada por 100 muestras de hisopado faríngeo. Obteniendo como resultado que, los medios estudiados lograron a las 48 de incubación un 100% de especificidad y valor predictivo positivo. El medio de cultivo ASHGL, mostró valores más altos alcanzando a las 48 horas de incubación 100% de sensibilidad y valor predictivo negativo. El ASH, le sigue con una sensibilidad a las 48 horas de 86% y un valor predictivo negativo a las 48 horas de 98%. Concluyendo que el Agar ASHGL e incubado por 48 horas, permite un número mayor de aislamiento, posesionándose como el medio más eficaz debido a que los resultados obtenidos presentan muy buena sensibilidad

y especificidad que el medio agar sangre de carnero usado como patrón de referencia<sup>17</sup>.

Chávez M. (2006, Perú), realizó un estudio con el objetivo de evaluar el rendimiento del agar sangre humana para el aislamiento de *Streptococcus* beta hemolítico. La muestra estuvo conformada por 242 pacientes diagnosticados con faringitis, atendidos en el Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo de Chiclayo. Se tomaron muestras duplicas a cada paciente, posteriormente fueron inoculadas en Agar Soya Tripticasa con 5% de sangre de carnero y en Agar Soya Tripticasa con 5% de sangre humana, incubadas a 37°C y en tres atmosferas diferentes: en aerobiosis, en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> y en jarra de Ga-Pak (anaeróticamente); realizando las lecturas a las 24 horas y otra a las 48 horas. De los resultados obtenidos se aisló 41 cultivos positivos a *Estreptococo* beta hemolítico, 38 pertenecen a *Estreptococo* beta hemolítico del grupo A (83%), y 7 cultivos positivos a *Estreptococo* beta hemolítico no grupo A (17%). El estudio concluye: Al no encontrarse diferencias significativas entre el medio utilizado como patrón de referencia (agar sangre de carnero) con el medio Agar Sangre Humana, permite el aislamiento de *Estreptococo* beta hemolítico. Así mismo, la incubación en una atmosfera anaeróbica y con una incubación de 48 horas, permitió la recuperación y mayor aislamiento de *Estreptococo* beta hemolítico<sup>3</sup>.

## 2.2. Bases Teóricas

### 2.2.1. Características Generales de los *Streptococcus*

Los *Streptococcus* pertenecen a la familia *Streptococaceae*. Son bacterias grampositivas, que suelen desarrollarse en pares y cadenas<sup>1</sup>.

Algunas cepas de *Streptococcus* crecen mejor en condiciones anaerobias. Sin embargo, son anaerobios facultativos. El crecimiento de esta especie por lo general, es favorecido por un incremento del CO<sub>2</sub> (crecimiento capnófilico). Los *Streptococcus*, tienen un tamaño menor de 2 µm de diámetro, poseen una forma esférica, son inmóviles, carecen de flagelos, no producen esporas y son catalasa negativa. Estas bacterias son homofermentadores. Es decir, que al fermentar la glucosa el único producto obtenido, es el ácido láctico sin producción de gas.

Las bacterias Gram positivas debido a que poseen una gruesa pared celular, que está constituida principalmente por peptidoglicano, se cree que, debido a éste las bacterias retienen el cristal violeta de la coloración Gram. Y así, al realizarse la coloración, se observa como cocos Gram –positivos. No obstante, estas células poseen gran cantidad de ácido teicoico. La función que cumplen, los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, es dar estabilidad a la pared celular, pero es el ácido que da la virulencia a la bacteria, sirviendo como antígeno de superficie el cual que va unir a los receptores específicos de las células del huésped<sup>18,19</sup>.

En las bacterias grampositivas la superficie externa del peptidoglicano es cubierta de proteínas. A su vez, hay diferencias en la composición de sus proteínas y ácidos teicoico, siendo de mucha importancia para la identificación bacteriana, así como para la clasificación serológica.

Para poder diferenciar las especies del género *Streptococcus* se utiliza tres sistemas como son: las propiedades serológicas (clasificación de Lancefield), patrones hemolíticos y las propiedades bioquímicas<sup>18,20</sup>.

TABLA N°01 Clasificación de los *Streptococcus* de importancia clínica

<b>Clasificación serológica</b>	<b>Tipo de hemólisis</b>	<b>Identificación Bioquímica</b>
<b>A</b>	Beta	<i>S. pyogenes</i>
<b>B</b>	Beta, Gamma (1-2%)	<i>S. agalactiae</i>
<b>C, G</b>	Beta	<i>S. dysgalactiae</i>
<b>D</b>	Alfa, Gamma y ocasionalmente Beta	<i>S. bovis</i>
<b>A, C, F, G o no agrupables</b>	Beta, Alfa o Gamma	<i>S. anginosus</i>

Fuente: elaboración propia.

Al realizar el aislamiento de los *Streptococcus* en el medio agar sangre de carnero al 5%, es necesario conocer los tipos de hemólisis que desarrollan cada especie, para una correcta identificación. Existen tres tipos de hemólisis como son:

1.  $\alpha$ -hemolíticos o *viridans*: modifica el medio de cultivo, ocasionando un halo parcial de color verdoso alrededor de la colonia.
2.  $\beta$ -hemolíticos o hemolíticos: hay una modificación en el medio, evidenciándose un halo transparente alrededor de la colonia.

3.  $\gamma$ -hemolíticos o no hemolíticos: No se observa ninguna modificación en el medio de cultivo.

La estructura antigénica del género *estreptococos* es muy compleja, sin embargo, en la pared celular y en la cápsula se encuentran ubicados los antígenos más importantes<sup>21</sup>.

### **2.2.2. Antígenos de los *Streptococcus***

- **Antígenos de grupo**

**Sustancia o carbohidrato C** es quien permite la clasificación de los *Estreptococos* en grupos y designarlos por letras de la A-V. Los grupos comprendidos de A-K, a excepción del grupo D están constituidos por polisacáridos. Sin embargo, pueden ser ácidos lipoteicoicos, polímeros de fosfato de glicerol (grupos D y N) o de ribitol en el caso de *Streptococcus pneumoniae*. Existen *Estreptococos* que no presentan antígenos, por eso no pueden ser clasificados ni agrupados, constituyendo a *estreptococos* no agrupables. Los *estreptococos* agrupables en su gran mayoría lo conforman los *estreptococos*  $\beta$ -hemolíticos, cabe resaltar, que en el grupo D se encuentra una mínima cantidad de *estreptococos*  $\alpha$  y  $\gamma$ -hemolíticos, quienes a su vez, se encuentran en los *Estreptococos* no agrupables.

TABLA N°02 Clasificación de Lancefield

Serogrupo	Ag. de grupo específico de la pared celular
<b>A</b>	Ramnosa-N-acetil-glucosamina
<b>B</b>	Ramnosa-N-acetil-glucosamina y galactosa
<b>C</b>	Ramnosa-N-acetil-glucosamina
<b>D</b>	Ácido glicerol teicoico
<b>F</b>	3-O- β-D-glucopiranosil-N-acetilgalactosamina
<b>G</b>	Ramnosa –galactosamina
<b>H</b>	Ácido teicoico

Fuente: Gonzales G. Manual electrónico para la identificación de *Streptococcus* por grupos de Lancefield y su importancia clínica.[Tesis de pre grado].Mexico D.F : Universidad Nacional Autónoma de México; 2013<sup>21</sup>.

- **El Antígeno de Tipo** se encuentra en la capa más externa de la pared celular y pueden ser proteínas o polisacáridos.

En el grupo A existen las proteínas M, T y R. La proteína M es considerada la más importante por ser resistente al calor y a los ácidos, posee propiedades antifagocitarias ya que está asociada con el ácido lipoteicoico en estructuras semejantes a fimbrias, el cual permite la adherencia. Asimismo, las proteínas T y R han sido empleadas para la clasificación en tipos, especialmente la proteína T que se caracteriza por ser sensible al calor y a los ácidos. Sin embargo, ambas proteínas no están relacionadas con la virulencia. En el grupo C, también podemos encontrar proteínas tipo específicas. A diferencia de los grupos B, D, F, G y en *S. pneumoniae* los antígenos de tipo son polisacáridos y se encuentran relacionados con estructuras tipo capsular<sup>22</sup>.

- **Cápsula**

Una cápsula de ácido hialurónico, el cual posee propiedades antifagocitarias, pero no es antigénica, es lo que presentan los *Streptococos* que pertenecen al grupo A y C. Por otro lado, en el grupo B se localiza un carbohidrato de tipo capsular o sustancia S, el cual permite la clasificación en serotipos<sup>20</sup>.

### **2.2.3. *Streptococcus agalactiae* o *Estreptococo* del grupo B**

Este microorganismo es el único en su especie que posee el antígeno del grupo B. Forma parte del microbiota habitual de los tractos gastrointestinal y genitourinario. En las gestantes, la colonización en el tracto genital puede ser perjudicial para el recién nacido, quien adquiere a la bacteria en el útero por vía ascendente a través de la ruptura de la membrana intactas o durante el proceso de parto. Provocando enfermedades en el recién nacido. El *Streptococcus agalactiae*, también ocasiona infecciones de piel, tejidos blandos, endocarditis e infecciones osteoarticulares, en pacientes inmunocomprometidos, es decir, pacientes diabéticos, alcohólicos, cirróticos, etc. Pacientes que tienen un problema crónico. Esta bacteria también ocasiona patologías en mujeres no gestantes<sup>18,19,21</sup>.

- **Fisiología y Estructura**

El *Streptococcus agalactiae*, es un coco grampositivo que mide de 0.6 a 1.2  $\mu\text{m}$ . En el medio de cultivo forman cadenas largas, por el contrario, en muestras clínicas se observa cadenas cortas, evitando así poder distinguir del *estreptococo* del grupo A al realizarse la coloración Gram<sup>22</sup>.

Al aislarse en el medio de cultivo agar sangre carnero al 5%, se observan colonias de color grisáceas o blanquecinas, con un diámetro de 2 a 3 mm, presentando una beta hemólisis, existen algunas cepas (1-2%) que no presentan hemólisis. Estas cepas que no presentan hemólisis no se estudian en su relación con el antígeno del grupo B<sup>1</sup>.

Asimismo, las cepas de *S. agalactiae* se pueden subdividir en función de la presencia de tres marcadores serológicos:

1. El antígeno B o el antígeno polisacárido de la pared celular específico (antígeno de agrupamiento de Lancefield, de ramnosa, N-acetilglucosamina y galactosa).
2. Polisacáridos de la capsula específica (Ia, Ib, II, III a VIII)
3. Proteína de superficie conocida como antígeno C.

- **Factores de virulencia**

- **Cápsula:** Antifagocítica, especificidad tipo. La cápsula permite diferenciar y reconocer diez serotipos capsulares, quienes están compuestos por glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico); las



disposiciones de los componentes en cada uno de los tipos capsulares, permite la especificidad de serotipo. (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX).

- **Antígeno Proteico** es designado con la letra c, y existiendo de dos formas: c $\alpha$  y c $\beta$ . El antígeno c se localiza en todas las cepas de **Ib**, sin embargo, las cepas **Ia** carecen de la proteína c. En las cepas de tipo **II** el 60% de ellas poseen la proteína c, en las de tipo **III** es poco frecuente que se encuentre esta proteína. Por ello, se expresa como **Ib/c y II/c**, para las cepas que contienen antígeno c. la virulencia de estos componentes celulares está demostrada con datos in vitro e in vivo.
- **Antígeno C específico de grupo:** actúa mediando la internalización del patógeno luego de su fijación internamente de las células epiteliales cervicales humanas protegiéndolo de la destrucción intracelular después de la fagocitosis. Existen otros antígenos como: R, BPS y Rib.
- **Beta-hemolisina/citolisina:** con mayor frecuencia posee una acción virulenta en las infecciones pulmonares. Actúa lisando las células epiteliales y endoteliales de los alvéolos humanos in vitro. Cabe resaltar, que puede ampliar la capacidad del microorganismo para atacar células endoteliales del SNC. Existen estudios in vivo e in vitro señalando que favorecen a la bacteriemia y la invasión del hígado, activando las vías apoptóticas en los hepatocitos, conduciendo así, a necrosis hepática.

- **Ácido lipoteicoico:** considerado como un primer paso de la infección debido a que facilita la adherencia. El ácido lipoteicoico de los *estreptococos* del grupo B es citotóxico para las células encefálicas embrionarias y amnióticas humanas que crecen en cultivo tisular<sup>18,19</sup>.
- **Enzimas producidas por *S. agalactiae***
  - **Hialuronato liasa:** descompone el ácido hialurónico que se encuentra en la matriz extracelular, en tejidos placentarios y fetales, y líquido amniótico. Propagando la infección.
  - **Proteína de unión a penicilina de la superficie celular (PBPI a),** permite resistir de la destrucción intracelular de las células fagocíticas.
  - **C5a peptidasa:** las células epiteliales alveolares actúan dividiendo los componentes del complemento, resultando como producto la C5a peptidasa, que, a su vez, atrae a las células inflamatorias, tiene participación en el proceso de inflamación pulmonar. La C5a peptidasa al escindir sobre el termino c de C5a, interfiere en la quimiotaxis de los neutrófilos. La C5a peptidasa se une a la fibronectina sirviendo como adhesina e invasinas bacterianas. Para lograr una actividad máxima de esta enzima, esta necesita la presencia de la capsula del grupo B. La opsonización de los estreptococos del grupo B pertenecientes a los serotipos Ia, Ib, II, III y V con anticuerpos de C5a generan mayor destrucción por parte de los macrófagos como de los polimorfonucleares. Estas enzimas, si bien es cierto, son útiles para la identificación de este agente, se desconoce cuál es su función en la patogenia de la infección<sup>1,18,19</sup>.

- **Características de *Streptococcus agalactiae***

- Cocos Gram Positivos dispuestos en cadenas.
- Presentan beta Hemólisis (1-2 % no presentan hemólisis).
- Catalasa negativa.
- Oxidasa negativa.
- Son inmóviles.
- Colonias de color grisáceo o blanquecino con tamaño 2 a 3 mm de diámetro, presentan una beta hemólisis.
- Son anaerobios facultativos.
- Se desarrollan mejor en presencia de 5% CO<sub>2</sub> <sup>1</sup>

- **Epidemiología**

El *Streptococcus agalactiae* causa enfermedades en los periodos neonatal y perinatal. Las gestantes que presentan colonización por *estreptococos* del grupo B, causan un mayor riesgo al recién nacido, siendo colonizados en la piel o las superficies mucosas debido a la transmisión vertical en el útero o durante el parto. Sin embargo, cabe resaltar que debido a la exposición hospitalaria el recién nacido puede ser colonizado.

La enfermedad del recién nacido ocasionado por *Streptococcus agalactiae*, se puede dividir en: enfermedad de comienzo temprano y enfermedad de comienzo tardío.

Comienzo temprano: Aquella que se presenta dentro de las 12 a 24 horas después de su nacimiento (más de 50 % de los casos) y en los recién nacidos menores de 5 días de vida. Esta patología está asociada a que el microorganismo fue adquirido por una infección ascendente en el útero o antes del parto, a través de la rotura prolongada de membranas o durante el paso en el canal del parto. Los factores maternos que aumentan el riesgo de que el recién nacido adquiriera la infección son: trabajo de parto prolongado, ruptura de membranas, bacteriemia posparto, amnionitis materna, colonización vaginal y bacteriuria por *estreptococos* del grupo B. En la enfermedad de comienzo temprano y sin meningitis, está asociado a los serotipos Ic, II y III.

Comienzo tardío: Cuando la enfermedad se inicia entre la primera semana y 3 meses (promedio de 3 a 4 semanas) después del nacimiento. La infección de comienzo tardío se adquiere en 50%, a partir, del canal del parto de las madres colonizadas, los demás casos están asociados a la exposición del recién nacido dentro del hospital. El 50% de los niños con meningitis de comienzo tardío poseen complicaciones y secuelas neurológicas permanentes.

En la enfermedad de comienzo tardío, donde la meningitis es la manifestación clínica más frecuentes, cepas del serotipo III representan más del 90% de los aislamientos. Por otro lado, la meningitis ocasionada por el *estreptococo* del grupo B en los pacientes adultos se asocia al serotipo II.

Es muy importante resaltar que también están predispuestos los pacientes con diabetes mellitus, alcohólicos, cirróticos varones y mujeres con cáncer. Es decir, pacientes inmunocomprometidos a adquirir alguna enfermedad ocasionada por *estreptococo* del grupo B<sup>1,18,19</sup>.

- **Cuadros clínicos**

1. Sepsis neonatal, se presenta dentro de las 24 y 48 horas del nacimiento, los factores asociados a esta patología son: la colonización de *estreptococo* del grupo B durante el embarazo, parto prematuro, rompimiento de las membranas y corioamnionitis.
2. Bacteriemia puede conducir a meningitis y endocarditis.
3. Meningitis: es poco frecuente, representa un 4% de la meningitis bacteriana en los adultos los más vulnerables son mujeres posparto y adultos mayor con enfermedades crónicas, enfermedad cardiovascular-pulmonar e infección por VIH.
4. Osteomielitis vertebral en lactantes, es la complicación de una bacteriemia posparto e infecciones urinarias de las gestantes.
5. Artritis séptica, causada por *estreptococo* del grupo B se caracteriza por la presencia de fiebre y dolor articular continuando a una bacteriemia o es simultáneo con ella. los pacientes que presentan artritis, son aquellos ancianos que presentan como factores de riesgo como: diabetes o neoplasias.

6. Neumonía, esta patología con frecuencia es el resultado de la aspiración del contenido orofaríngeo y puede complicarse con el desarrollo de empiema, los pacientes propensos a desarrollar neumonía, son aquellos pacientes debilitados, es decir, los ancianos.
7. Conjuntivitis, queratitis y la endoftalmitis hematológica causadas por *estreptococo* del grupo B. son infecciones raras y muy graves en ojos que ya se encuentran con algún daño previo. Estas infecciones pueden producir una disminución de la agudeza visual o en algunos casos ceguera.
8. La endocarditis, puede presentarse de forma aguda o subaguda en adultos de ambos sexos, con cardiopatías preexistentes antes del inicio de la enfermedad, con el desarrollo grandes vegetaciones y la válvula mitral es la más afectada. En los recién nacidos la endocarditis es poco frecuente.
9. Bacteriuria por *estreptococo* del grupo B está asociada con una evolución desfavorable en el desarrollo del embarazo, mayor tasa de trabajo de parto y ruptura prematura de membranas. En varones, mujeres no embarazadas y niños, este patógeno causa cistitis y pielonefritis.

Los estreptococos del grupo B pueden producir el síndrome similar al shock tóxico que se asocia con *estreptococo* del grupo A <sup>1</sup>

#### 2.2.4. Diagnostico microbiológico:

- **Muestra:**

El hisopado vagino-ano-rectal es la muestra idónea para detectar colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes entre las 35 y 37 semanas de gestación. Las muestras de hisopado vaginal se toman del tercio inferior de la vagina y del conducto anal (un único hisopado de la vagina y luego del conducto anal o un hisopado tomado de cada sitio) <sup>4,18</sup>

Inmediato a la toma de muestra inocular el hisopado en tubos con medio de enriquecimiento selectivo, incubar a 37°C de 18 a 24 horas. El Centro de Control de Enfermedades (CDC), recomienda el cultivo de hisopados vaginales y ano-rectales en un caldo selectivo como caldo Todd-Hewitt suplementado con colistina y ácido nalidíxico o gentamicina, para elevar al máximo la probabilidad de recuperación de *estreptococos* del grupo B en placas de agar sangre de carnero <sup>19,23,24</sup>.

Después de la incubación en el caldo Todd Hewitt se subcultiva en agar sangre de carnero al 5% <sup>23</sup>.

Para el presente estudio se emplearon cepas conocidas de *Streptococcus agalactiae* que ya fueron aisladas de pacientes gestantes, por ende, no necesita previa recuperación en caldo Todd-Hewitt.

Dichas cepas fueron transportadas y conservadas en medio TSA para su posterior recuperación y desarrollo en los medios de estudio.

- **Reconstitución de la CEPA ATCC 12403 *Streptococcus agalactiae***

La CEPA ATCC 12403 *Streptococcus agalactiae* que se utilizaron para el control de calidad de los medios de cultivo agar sangre de carnero al 5% (ASC) y el medio de estudio agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL). Fueron reconstituidas siguiendo las normas específicas del fabricante (Genlab).

- **Agar soya tripticasa (TSA)**

El medio TSA, es una alternativa muy adecuada para la conservación de las cepas de *Streptococcus agalactiae*, debido a que mantiene la viabilidad, pureza y estabilidad fenotípica y genotípica de las cepas<sup>32</sup>.

Materiales:

- Medio de cultivo solido agar soya tripticasa.
- Suero fisiológico 0.9%.



## Preparación del medio de transporte TSA

1. En un matraz de Erlenmeyer colocamos 10 gr de agar TSA y agregamos 250 ml de agua destilada, mezclamos y dejamos reposar por cinco minutos.
2. Llevamos la mezcla al calor para que pueda ser disuelta totalmente, con frecuencia se debe agitar y dejar hervir de 1 a 2 minutos.
3. Luego se esteriliza en la autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.
4. Dejamos enfriar para posteriormente distribuir en los crioviales estériles.
5. Con ayuda de una pipeta dispensamos 1ml de medio a los crioviales.

Sembrar las cepas en los siguientes medios de cultivo: Agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (medio de cultivo en estudio) y agar sangre de carnero al 5% (Gold Standard).

Existe en el mercado diversos agares según la especie animal de la que se obtenga la sangre, sin embargo, hay que tener en cuenta las variaciones en las reacciones hemolíticas. La sangre de caballo y conejo carecen de efectos inhibitorios sobre factores de crecimiento bacteriano y poseen una rica fuente de factor V y X, es recomendable para el aislamiento de *Haemophilus influenzae*. Para el aislamiento e identificación de *Gardnerella vaginalis* es recomendable La sangre humana por presentar hemolisis, pero no en sangre de animales <sup>3</sup>.

- **Agar sangre de carnero al 5% (ASC) Gold standard.**

Es un medio muy nutritivo de uso general, 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 evidenciar reacciones hemolíticas y realización de la prueba de CAMP para la identificación presuntiva de *Streptococcus agalactiae*. Los *estreptococos*  $\beta$  – hemolíticos producen hemolisinas que lisan los eritrocitos, en consecuencia, se observa aclaramiento del medio que rodea las colonias <sup>18,25</sup>.

Para identificar el tipo de hemólisis producida, es necesario emplear como base un medio carente de azúcares, pues el descenso en el pH que provoca por su fermentación puede inactivar las hemolisinas bacterianas, por ello el agar tripticasa soya como base es la más utilizada en la identificación del tipo de hemólisis <sup>18,26</sup>.

**Materiales:**

- Medio de cultivo sólido agar soya tripticasa.
- Sangre de carnero desfibrinada al 5%.
- En el caso del presente estudio se emplearán cepas conocidas de *Streptococcus agalactiae* y cepas no compatibles con *Streptococcus agalactiae* que fueron aisladas de pacientes gestantes.

### **Preparación del medio ASC AL5%**

1. En un matraz disolver 40 gramos/litro de medio de cultivo solido agar soya tripticasa agua destilada y disolver completamente calentando en una hornilla.
  2. El medio de cultivo ya disuelto se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
  3. Una vez autoclavado trasladar el medio a una zona estéril para enfriarlo lentamente a temperatura que oscila entre los 45° C +/-2°C.
  4. Incorporar 5% de sangre de carnero desfibrinada, homogenizar y dispensar 10 ml de medio por placa Petri.
  5. Al solidificar, guardar los medios en refrigeración a 4 °C.
  6. Por cada lote preparado tomar una placa Petri e incubar de 35 a 37 °C por 24 horas, como control de esterilidad.
- **Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL)**  
**Medio en estudio.**

Es un medio nutritivo, que pretende facilitar el crecimiento de microorganismos exigentes, tales como: el género *Streptococcus*, bacterias gram positivas y todas las especies encontradas en muestras de origen clínico. Es un método alternativo que utiliza sangre humana con glóbulos rojos, que serán lavados con suero fisiológico, para poder eliminar todos los elementos presentes en el plasma (inmunoglobulinas, complementos, etc., o bien el anticoagulante utilizado al ser obtenida la sangre humana) que puedan interferir con el normal crecimiento de

los estreptococos  $\beta$  – hemolíticos y así poder evidenciar las reacciones hemolíticas.

### **Lavado de glóbulos rojos humanos:**

Materiales:

- Glóbulos rojos humanos.
- Suero fisiológico 0.9%

Procedimiento:

1. La sangre humana será obtenida en tubos BD Vacutainer® con EDTA K2 del donante que cumpla con las condiciones solicitadas para este estudio. (Anexo 3)
2. Todos los pasos del procedimiento se hacen bajo la protección de un mechero bunsen y con material estéril para evitar la contaminación de la sangre,
3. En un tubo estéril separar en alícuotas la cantidad necesaria de sangre humana para la preparación del medio. Los glóbulos rojos son lavados con solución fisiológica (0.9 % NaCl).
4. Añadir un volumen igual de solución fisiológica al tubo estéril, cerrar y mezclar por inversión 5 veces.
5. Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante con la ayuda de una pipeta, añadir nuevamente un volumen igual de solución fisiológica, mezclar por inversión y centrifugar 1500 rpm por 5 minutos.
7. Repetir el paso anterior hasta que la sangre tenga por lo menos 5 lavados.

8. Sembrar la sangre humana lavada en una placa de ASC al 5% de 35 a 37 °C por 24 horas, como control de esterilidad.

### **Preparación del medio ASHGL al 5%**

#### **Materiales:**

- Sangre humana con glóbulos rojos lavados.
- Medio de cultivo sólido agar soya tripticasa.

#### **Preparación del medio:**

1. En un matraz disolver 40 gramos/litro de medio de cultivo sólido agar soya tripticasa con agua destilada y disolver completamente calentando en hornilla.
2. Esterilizar el medio de cultivo ya disuelto en autoclave 15 minutos a 121 °C.
3. Una vez autoclavado trasladar el medio a una zona estéril para enfriarlo lentamente a temperatura que oscila entre los 45° C +/-2°C.
4. Incorporar 5 % de Sangre humana con glóbulos rojos lavados, homogenizar y dispensar 10 ml de medio por placa Petri.
5. Al solidificar, guardar los medios en refrigeración a 4 °C.
6. Por cada lote preparado tomar una placa Petri e incubar de 35 a 37 °C por 24 horas, como control de esterilidad.

Procedimiento:

1. La técnica de sembrado será por agotamiento haciendo cortes profundos en el ASC al 5% (Gold standard) y ASHGL al 5% (cultivo en estudio) para evidenciar las hemolisinas del *Streptococcus agalactiae*.
2. Incubar las placas de 35° a 37°C en condiciones de microaerofilia (método de la vela) durante 24 a 48 horas.
3. La primera lectura se hará a las 24 horas, de no observarse desarrollo de colonias, reincubar hasta las 48 horas.

### **Interpretación del tipo de hemólisis:**

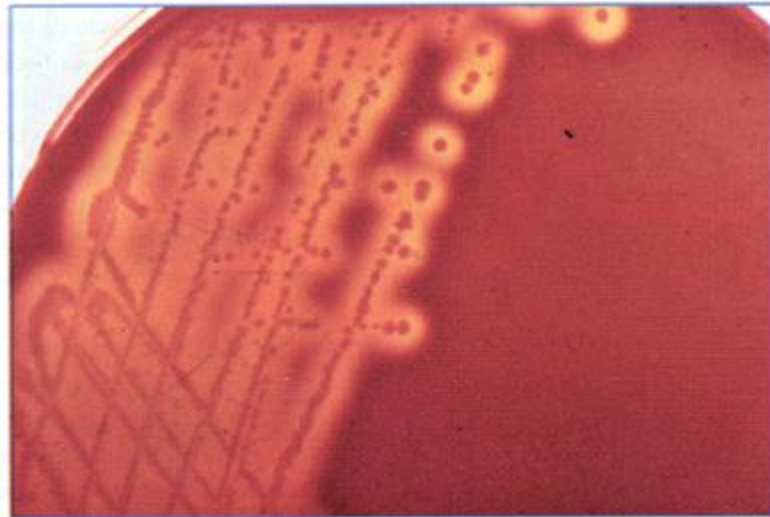
Se realiza mediante la observación del crecimiento de colonias y el tipo de hemólisis.

Los estreptococos pueden producir tres tipos de hemólisis:

- Alfa hemólisis ( $\alpha$ ): Zona de destrucción parcial de los glóbulos rojos alrededor de la colonia, a menudo seguida de una coloración verdosa o café en el medio.
- Beta hemólisis ( $\beta$ ): Zona de destrucción total de los glóbulos rojos alrededor y debajo de la colonia, de apariencia clara o incolora.
- Gama hemólisis ( $\gamma$ ): Sin actividad hemolítica ni aclaramiento alguno del medio<sup>22</sup>.

Los estreptococos del grupo B en el medio de cultivo ASC, presentan colonias de 2 a 3 mm de diámetro, lisas, de aspecto mantecoso y rodeado por un halo de  $\beta$ -hemólisis. Algunas cepas (1-2%) no son hemolíticas<sup>25</sup>.

### Gráfico N° 1. $\beta$ – hemólisis



Fuente: Koneman, Diag. Microbiológico. Medica panamericana 2006, 6ª ed. 1570<sup>18</sup>

Las colonias beta hemolíticas con características compatibles con *Streptococcus agalactiae* serán sometidas a la coloración GRAM y las pruebas de identificación.

- **Coloración GRAM**

Es una tinción diferencial muy utilizada en microbiología, por ser sencilla, económica y eficaz. Los principios de esta coloración están basados en las características de la pared celular de las bacterias. La pared celular de las GRAM negativas está constituida por una capa delgada de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que la pared celular de las GRAM positivas es gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuenta con una membrana celular externa<sup>25</sup>.

Por ello clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias GRAM positivas que retienen la tinción azul – violeta y bacterias GRAM negativas a las que se decoloran y después se tiñen con fucsina.

Materiales:

Batería GRAM

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol – acetona
- Fucsina básica

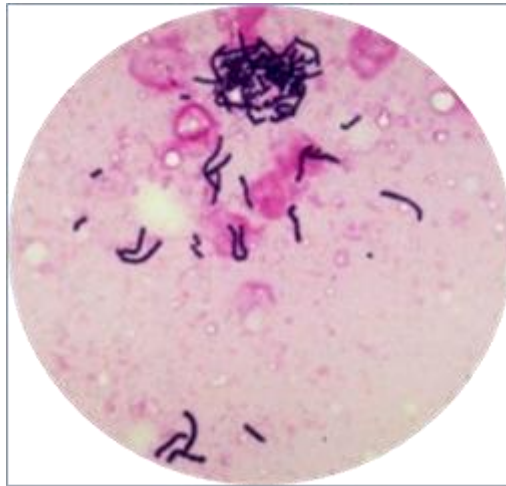
Procedimiento:

- Hacer el frotis de manera regular y fijarlo a la flama.
- Colocar el frotis sobre un soporte y cubrir la superficie con solución de cristal violeta durante 1 minuto, lavar ligeramente con agua corriente.
- Cubrir el frotis con lugol durante 1 minuto, lavar con agua corriente.
- Lavar con solución decolorante alcohol - acetona, de 5 – 30 segundos, lavar con agua corriente.
- Cubrir el frotis con fucsina básica durante 1 minuto, lavar con agua corriente.
- Dejar secar, observar al microscopio con objetivo de 1000X y aceite de inmersión.

Los estreptococos del grupo B son cocos grampositivos (0,6 a 1,2  $\mu$ m) que forman cadenas de longitud variable, cortas en las muestras clínicas y cadenas más largas en cultivo<sup>25</sup>.



## Gráfico N° 2. *Streptococcus agalactiae*



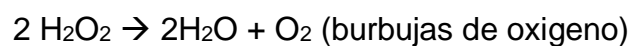
Fuente: Brizuela M. *S. agalactiae* Grupo B. (EAB) Rev.Bioanál. 2007: 8-10<sup>28</sup>

### Identificación:

- **Prueba de catalasa**

Es una enzima presente en la mayoría de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que poseen citocromos excepto las especies de *Streptococcus*, que carecen de catalasa.

El peróxido de hidrogeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aeróbico de los hidratos de carbono, si se permite que se acumule sería fatal para las células bacterianas. La catalasa transforma el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno. Actúa según la siguiente reacción<sup>18,28</sup>.



Principalmente utilizada para diferenciar entre los géneros *Streptococcus* (–) de *Micrococcus* (+) y/o de *Staphylococcus* (V+)<sup>18,28</sup>.

#### Materiales:

- Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) al 3%
- Microorganismos por probar de un cultivo de 18 a 24 horas.

#### Control de calidad:

Probar el  $H_2O_2$  de hidrogeno con microorganismos control positivo y negativos antes de probarlo en bacteria desconocidas.

- A. Control positivo: *Staphylococcus aureus*.
- B. Control negativo: especies de *Streptococcus*.

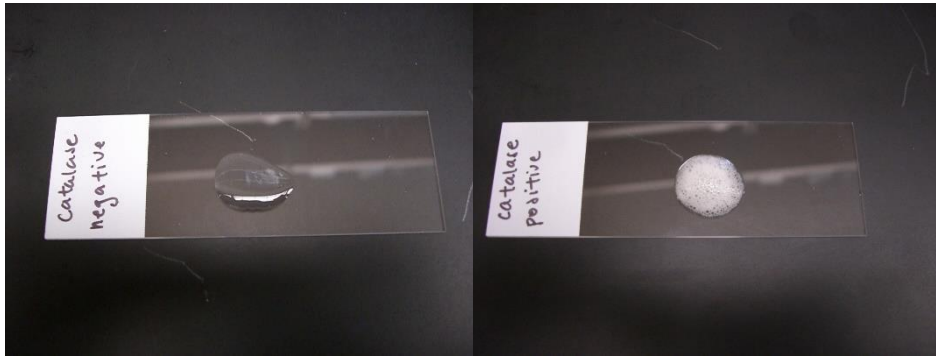
#### Procedimiento:

1. Con un gotero añadir una gota de  $H_2O_2$  al 3% sobre un portaobjetos limpio.
2. Con una aguja de inoculación recoger el centro de dos a tres colonias puras de un medio de 18 a 24 horas y colocarlo sobre un portaobjetos limpio.
3. Los eritrocitos presentes en el agar tienen catalasa, por ello debe tenerse cuidado tomarlos junto con el material de la colonia ya que ello nos dará como resultado un falso positivo.

#### Interpretación:

- Positivo (+): burbujeo inmediato observado con facilidad, formación de  $O_2$ .
- Negativo (-): ausencia de burbujas, ausencia de  $O_2$ <sup>26</sup>.

### Gráfico N° 3. Prueba de catalasa



Fuente: Flickr. Medical Microbiology. 2008<sup>23</sup> <https://www.flickr.com/photos/medmicro/2414769831/>

- **Prueba de sensibilidad a la Bacitracina**

La prueba de la sensibilidad a la bacitracina se emplea para la diferenciación del género *Staphylococcus* (sensible) de *Micrococcus* (resistente) y diferenciación de especies en caso del *Streptococcus pyogenes*, siendo el único estreptococo  $\beta$  – hemolítico sensible a la Bacitracina. La prueba se realiza en un medio de agar sangre con un disco diferencial de Bacitracina Taxo A, 0.04 U.

Esta técnica tiene 5% de falsos negativos y entre 10 y 20 % de falsos positivos ya que otros estreptococos (grupo C y G), muestran sensibilidad variable a la bacitracina<sup>18,29</sup>.

Cualquier zona de inhibición alrededor del disco de Bacitracina se considera sensible.

#### Gráfico N° 4. Prueba de sensibilidad a la bacitracina



Estreptococo  $\beta$  – hemolítico del grupo A (izquierda), estreptococo  $\beta$  – hemolítico del grupo B (derecha). Fuente: Koneman, Diag. Microbiológico. Medica panamericana 2006, 6ª ed. 1572<sup>18</sup>

- **Prueba de sensibilidad de Trimetoprim – sulfametoxazol (SXT)**

La prueba de sensibilidad a trimetoprim–sulfametoxazol presuntivamente distingue los *estreptococos* del grupo A y B de otros *estreptococos*  $\beta$  – hemolíticos, ya que los *estreptococos* del grupo C y G suelen ser sensibles mientras que los *estreptococos* del grupo A y B son resistentes. La prueba se realiza en un medio de agar sangre con un disco de SXT (trimetoprim – sulfametoxazol, 1.25 ug/23.75 ug).

Algunos *estreptococos*  $\beta$  – hemolíticos no pertenecientes al grupo A son sensibles a la bacitracina, pero también son sensibles al SXT, este aislamiento es denominado “*estreptococo*  $\beta$  – hemolítico presuntivo, no grupos A ni B por bacitracina/SXT” (Ilustración n° 5). Por lo tanto, la ejecución de la prueba para SXT se realiza a menudo a la par con la prueba de la bacitracina ya que incrementa la sensibilidad y el valor pronóstico de la prueba de la bacitracina<sup>18,29</sup>.

#### Materiales:

- Placa de agar sangre de carnero al 5%.
- Discos de bacitracina Taxo "A" (0.04 unidades/disco).
- Disco de SXT trimetoprim – sulfametoxazol 1.25ug/23.75ug.

#### Control de calidad:

- A. Bacitracina S, SXT R: estreptococo del grupo A.
- B. Bacitracina R, SXT R: estreptococo del grupo B.
- C. Bacitracina S o R, SXT S: estreptococo  $\beta$ -hemolítico, grupos C F o G.

#### Procedimiento de la sensibilidad a la bacitracina y SXT:

1. Con un asa estéril tomar de 3 a 4 colonias aisladas del estreptococo  $\beta$  – hemolítico y sembrar en estría en el centro de la placa de ASC al 5 %.
2. Con un hisopo estéril diseminar el inóculo formando una capa sobre toda la placa.
3. Colocar un disco de bacitracina Taxo "A" y un disco de SXT sobre la zona sembrada, asegurándose que los discos estén equidistantes.
4. Con pinzas flameadas hacer una ligera presión para lograr un buen contacto con el agar.
5. Incubar las placas de 18 a 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia.
6. Interpretación:
7. Sensible (S): cualquier diámetro de halo alrededor de cualquiera de los discos.
8. Resistente (R): crecimiento hasta el borde del disco.

**TABLA N°03 Interpretación de la bacitracina y STX**

Bacitracina	STX	Identificación
S	R	Presumiblemente grupo A
R	R	Presumiblemente grupo B
S/R	S	Ni A ni B

Fuente: Koneman, Diag. Microbiológico. Medica panamericana 2006, 6ª ed. 1412<sup>18</sup>

Solo debe probarse para estreptococos  $\beta$  – hemolíticos, ya que muchos estreptococos  $\alpha$  – hemolíticos son sensibles a las bajas concentraciones de bacitracina<sup>18</sup>.

**Gráfico N° 5. Sensibilidad a la bacitracina y el SXT**



Estreptococo  $\beta$  – hemolítico no grupo A ni B (p.ej. C, F Y G) sensible a la bacitracina (derecha), pero también muestra una zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco de SXT (izquierda).

Fuente: Koneman, Diag. Microbiológico. Medica panamericana 2006, 6ª ed. 1572<sup>18</sup>

- **Prueba de CAMP**

Diferenciación e identificación presuntiva del estreptococo  $\beta$  – hemolítico del grupo B, de otras especies de estreptococos. Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo para producir y elaborar el factor CAMP, un producto del estreptococo del grupo B, que actúa de manera sinérgica con la  $\beta$  – hemolisina del *Staphylococcus aureus* ( $\beta$  – lisina) sobre los hematíes produciendo un fenómeno lítico con forma de punta de flecha en el área de intersección, donde el factor CAMP y la  $\beta$  – hemolisina se han diseminado en el medio tras la unión de los dos microorganismos.

Las variantes no hemolíticas de estreptococos del grupo B, también son CAMP positivas<sup>18,26</sup>.

**Materiales:**

- Placa de agar sangre de carnero al 5%
- Cepa de *Staphylococcus aureus* productora de  $\beta$  – hemolisina.
- Microorganismo de prueba; crecimiento proveniente de un cultivo puro de 18 a 24 horas de especies conocidas de *Streptococcus*.

**Control de calidad:**

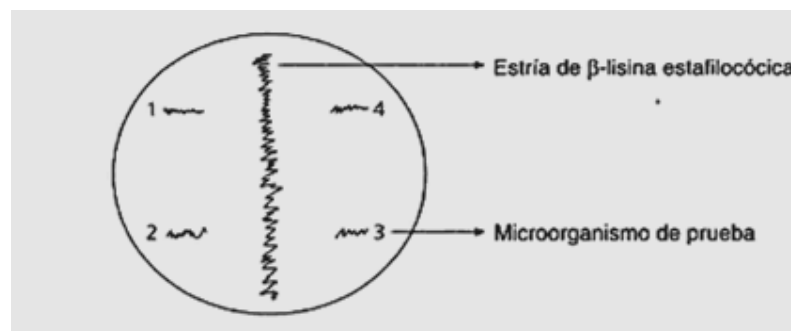
En la misma placa de forma simultanea sembrar cepas conocidas como control positivo y negativo.

- A. Control positivo: estreptococo del grupo B.
- B. Control negativo: estreptococo de grupo A.

Procedimiento:

1. Con una aguja de inoculación hacer una sola estría en línea recta en el centro de la placa ASC al 5% con *S. aureus* productor de  $\beta$  – hemolisina.
2. Hacer una estría con los estreptococos  $\beta$  – hemolíticos por identificar (se pueden estriar 4 microorganismos por placa) en línea recta de 2 a 3 cm de largo y perpendicular al inóculo de estafilococo, teniendo cuidado de no tocar el mismo.
3. Incubar las placas a 35°C en aerobiosis de 18 a 24 horas.

Gráfico N° 6. Prueba de CAMP



Fuente: Mc Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana, 3ª ed. 42<sup>26</sup>

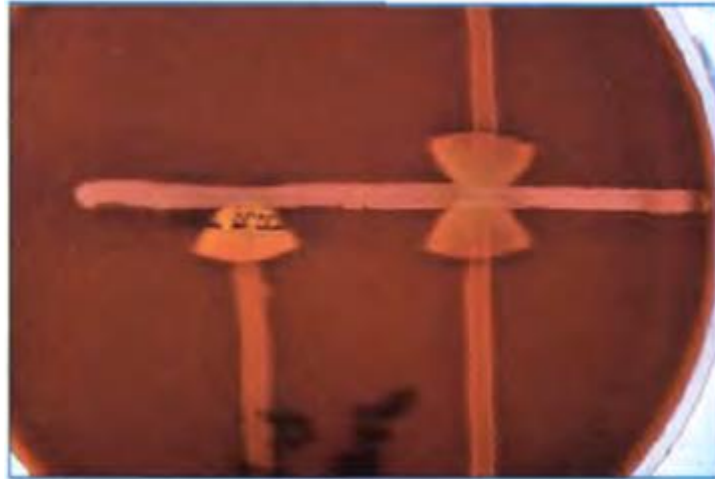
Interpretación:

Un resultado positivo se evidencia por la presencia de una zona de potenciación de la hemólisis en forma de punta de flecha entre el área de intersección de las dos estrías debido a la  $\beta$  – hemolisina secretado por el estafilococo y el factor CAMP secretado el estreptococo de grupo B.



Algunos estreptococos de grupo A serán positivos en la prueba de CAMP, si la placa se incuba en condiciones de anaerobiosis, por ello la incubación debe realizarse en aire atmosférico<sup>18</sup>.

### Gráfico N° 7. Prueba de CAMP positivo



Tres pruebas de CAMP positivas. Fuente: Koneman, Diag. Microbiológico. Medica panamericana 2006, 6ª ed. 1572<sup>18</sup>.

- **Validez de una prueba**

En una prueba dicotómica, como es la del presente estudio, que clasifica a cada paciente como sano o enfermo en función del resultado de la prueba, ya sea positivo o negativo. En casos como éste, por lo general un resultado positivo se asocia con la presencia de enfermedad y un resultado negativo con la ausencia de la misma<sup>27</sup>. Cuando se estudia una muestra de pacientes, los datos obtenidos permiten clasificar a los individuos en cuatro grupos según muestra la siguiente tabla de 2x2:

**TABLA N°04 Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.**

Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico	
	Enfermo	Sano
Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

Fuente: Fistera. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. 2010 <sup>30</sup>

En ella, se enfrenta el resultado de la prueba (en filas) con el estado real de los pacientes (en columnas) o, en su defecto, el resultado de la prueba de referencia o “Gold standard” que vayamos a utilizar. El resultado de la prueba puede ser correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo). El análisis puede realizar calculando los valores de sensibilidad y especificidad.

Sensibilidad: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga un resultado positivo en el test. Los datos obtenidos a partir de una muestra de pacientes se clasifican en una tabla como la que se muestra en la Tabla 04, es sencillo estimar a partir de ella la sensibilidad como la proporción de pacientes enfermos que produjeron un resultado positivo en la prueba diagnóstica<sup>30</sup>.

Es decir:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Especificidad: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano obtenga un resultado negativo en el test. A partir de una tabla como la Tabla 04, la especificidad se estimaría como:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

- **Seguridad de una prueba diagnóstica: valores predictivos**

Tanto la sensibilidad como la especificidad facilitan información acerca de la probabilidad de obtener un determinado resultado (positivo o negativo) en función de la verdadera condición del enfermo con relación a la enfermedad. No obstante, cuando a un paciente se le realiza alguna prueba, el médico carece de información previa acerca de su verdadero diagnóstico, y más bien la pregunta se plantea en sentido contrario: ante un resultado positivo (negativo) en la prueba, ¿cuál es la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo (sano)?<sup>30</sup>, por medio de los valores predictivos completaremos esta información:

Valor predictivo positivo (VPP): Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. Ello se estima a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos<sup>30</sup>:

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}}$$

Valor predictivo negativo: Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en el test esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba<sup>30</sup>:

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

### 3.3. Terminología básica

- **Beta-hemólisis:** Es la evidencia una lisis total de los glóbulos rojos, formando un halo transparente alrededor de la colonia<sup>21</sup>.
- **Streptococcus:** Son bacterias gram positivas, están dispuestas en cadenas o en pares, poseen una forma esférica y miden menos de 2  $\mu\text{m}$ <sup>18,19</sup>.
- **Glóbulos rojos:** Es una célula con forma de disco bicóncavo, no presenta núcleo, posee un diámetro de 7,5  $\mu\text{m}$ . Tiene una vida media en la circulación de 120 a 140 días<sup>31</sup>.
- **Sensibilidad:** Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga un resultado positivo en el test<sup>30</sup>.
- **Especificidad:** Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano obtenga un resultado negativo en el test<sup>30</sup>.

- **Valor predictivo positivo:** Es la probabilidad de padecer la enfermedad si el resultado del examen diagnóstico es positivo<sup>30</sup>.
- **Valor predictivo negativo:** Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano<sup>30</sup>.

### 3.4. Hipótesis

No aplica.

### 3.5. Variables e indicadores

Variable	Tipo de variable	Indicadores	Escala de medición	Valor
Crecimiento de colonias	Cualitativa	Colonias blancas brillantes de 2 a 3 mm de diámetro.	Nominal	a) Ausencia b) Presencia
Betahemólisis	Cualitativa	Lisis completa de los eritrocitos, halo totalmente transparente que rodea a las colonias.	Nominal	a) Ausencia b) Presencia 24/48horas
Tinción GRAM	Cualitativa	Tinción diferencial, las bacterias GRAM positivas se tiñen de azul y las GRAM negativas de rojo, esto se debe a la estructura de la pared celular.	Nominal	a) CGP b) Otros
Catalasa	Cualitativa	Producción de burbujas al añadir el peróxido de hidrogeno, indicador de la actividad catalasa.	Nominal	a) Negativo b) Positivo
Bacitracina	Cualitativa	Cualquier zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco se considera sensible.	Nominal	a) Sensible b) Resistente
Trimetoprim – sulfametoxazol	Cualitativa	Cualquier zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco se considera sensible.	Nominal	a) Sensible b) Resistente
Prueba de CAMP	Cualitativa	En presencia del factor CAMP, al interactuar con la $\beta$ -hemolisina secretada por la cepa <i>S. aureus</i> , provocará sinergismo de la hemólisis (punta de flecha).	Nominal	a) Negativo b) Positivo

## CAPÍTULO III

### DISEÑO METODOLÓGICO

#### 4.1. Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo observacional descriptivo con corte transversal debido a que observa, evalúa y registra características específicas del rendimiento del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados para el desarrollo de cepas de *Streptococcus agalactiae*. en un único momento<sup>34</sup>

#### 4.2. Ámbito de la investigación

El desarrollo de la investigación se realizó en las instalaciones del servicio de Microbiología del Instituto Nacional de salud del Niño (INSN), dicho laboratorio cuenta con una infraestructura de calidad y un nivel III de bioseguridad. Ubicada en la avenida Brasil N° 600 Distrito de Breña.

#### 4.3. Población y Muestra

##### 3.1.1. Población

Constituida por 36 cepas de *Streptococcus agalactiae*.

##### Muestra

Se trabajó con la totalidad de cepas.

##### 3.1.2. Muestreo

No aplica.

### **3.1.3. Criterios de selección**

#### **a) Criterios de inclusión:**

Cepas de *Streptococcus agalactiae*, debidamente identificadas con el sistema automatizado Vitek 2 compact y la realización de la prueba de CAMP en el Servicio de Microbiología del Hospital Docente Madre-Niño San Bartolomé.

#### **b) Criterios de exclusión:**

- No aplica.

### **4.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos**

**Técnica:** Observación.

**Instrumento:** Ficha de recolección de datos. (Ver anexo 2)

#### **Procedimiento:**

1. Se solicitó autorización del Servicio de Microbiología del INSN, para poder acceder a las instalaciones y realizar el estudio.
2. Se determinó el número de cepas que cumplieron con los criterios de selección.
3. Se enumeró las cepas para ser transferidas a la ficha de recolección de datos.
4. Se emplearon cepas ATCC 12403 de *Streptococcus agalactiae* para el control de calidad de los medios de cultivo ASHGL al 5%, ASC al 5% y de las pruebas de identificación complementarias.
5. Las cepas en estudio fueron preservadas y transportadas en el medio TSA, para posteriormente ser recuperadas en el medio ASC al 5% para evaluar su viabilidad.



6. Las cepas recuperadas fueron sembradas a la par en agar sangre de carnero al 5% (ASC) y agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL), se incubaron las placas de 35° a 37°C en condiciones de microaerofilia (método de la vela) durante 24 a 48 horas. Se identificó cada par de placas según la cepa correspondiente. La primera lectura se realizó a las 24 horas, observándose el desarrollo y la beta hemólisis de las colonias. A las 48 horas se realizó la segunda lectura evidenciándose el mantenimiento de la morfología y beta hemólisis de las mismas.
7. Las colonias beta hemolíticas, con características morfológicas compatibles con *Streptococcus agalactiae* y presencia evidente de beta hemólisis en los medios de cultivo, fueron sometidas a la coloración GRAM y las pruebas de identificación.
8. Coloración GRAM: En una lámina portaobjetos se realizó un frotis delgado en solución fisiológica estéril, secándolo y fijándolo con la ayuda del mechero, utilizando la batería para tinción GRAM. Microscópicamente las colonias de *Streptococcus agalactiae* se observan como cocos GRAM positivos de 0.6 a 1.0 um de diámetro, agrupadas formando cocos en cadena de longitud variable.
9. Prueba de la Catalasa: Sobre un portaobjeto se colocó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. Con un asa tomamos de 2 a 3 colonias del cultivo y colocamos sobre la gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Si no se observa la formación de burbujas será negativo (corresponde al género *Streptococcus*).
10. Prueba de sensibilidad a la Bacitracina y SXT: Con un asa estéril se tomó de 3 a 4 colonias aisladas del estreptococo β – hemolítico, se sembró en estría en el centro de la placa de ASC al 5 %. Con un hisopo estéril se diseminó el inóculo formando una capa sobre toda la placa. Se colocó de forma aséptica un disco de

bacitracina Taxo "A" y un disco de SXT sobre la zona sembrada, asegurándose que los discos estén equidistantes. Con pinzas flameadas se realizó una ligera presión para lograr un buen contacto con el agar. Se incubó las placas de 18 a 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Si presenta crecimiento del microorganismo hasta el borde del disco de bacitracina Taxo "A" y SXT, se considerará resistente (corresponde a una prueba presuntiva de *Streptococcus agalactiae*).

11. Prueba de CAMP: se inoculó una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, formando una línea vertical en la placa de ASC al 5%. Posteriormente se inoculó la colonia a identificar, formando una línea perpendicular a la cepa ATCC sin tocarla. Se incubó de 35° a 37°C en condiciones de microaerofilia durante 18 a 24 horas. Un resultado positivo se evidencia por la presencia de una zona de potenciación de hemólisis en forma de punta de flecha entre el área de intersección de las dos estrías (corresponde a una prueba presuntiva de *Streptococcus agalactiae*).

12. Se trasladó la información obtenida a la ficha de recolección de datos.

13. Se elaboró la base de datos correspondiente para el posterior análisis.

14. Se desarrolló el control de calidad de base de datos, verificando que todos los registros de datos necesarios para la investigación estén completos.

#### 4.5. Plan de procesamiento y análisis estadístico

Se hizo uso de una computadora i7. Los datos fueron almacenados haciendo uso del programa de Microsoft Excel (office 2010). Para la presentación de resultados se hizo uso de estadística descriptiva.

##### Estadística descriptiva

Se utilizó tablas de doble entrada (2x2) para expresar los resultados del análisis estadístico del agar sangre humana con glóbulos rojos lavados, usamos pruebas de validez diagnóstica como:

Sensibilidad:

$$\textit{sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

Especificidad:

$$\textit{especificidad} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

Además, pruebas de seguridad diagnóstica tales como:

Valor predictivo positivo:

$$\textit{VPP} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

Valor predictivo negativo:

$$\textit{VPN} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

#### **4.6. Aspectos éticos**

El presente estudio, por su tipo y diseño, no se contrapone con aspectos éticos de la investigación científica, se respetará estrictamente los principios bioéticos de autonomía. Beneficencia. No maleficencia y justicia.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. Resultados

El estudio se llevó a cabo con 36 cepas a partir de muestras clínicas debidamente identificadas con el sistema automatizado Vitek 2 compact. De las 36 muestras cultivadas en agar sangre de carnero (ASC) al 5% y en agar sangre humana con glóbulos rojos lavados (ASHGL) al 5%, 30 cepas fueron positivas para el aislamiento de *Streptococcus agalactiae* tanto en ASC 5% como en ASHGL 5%. En 6 cultivos no se evidenció crecimiento en ambos medios. Para descartar la posibilidad de fallas del operador, repetimos el sembrado en ambas placas obteniendo el mismo resultado, esto se debió probablemente a la antigüedad de las cepas ya que es una bacteria altamente lábil.

Para obtener las tasas de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del medio de cultivo evaluado, se utilizó el cultivo de agar sangre de carnero al 5%, como prueba de referencia.

**Tabla N° 5. Tasas de evaluación del ASHGL a las 24 horas de incubación**

**Para el desarrollo de cepas de *Streptococcus agalactiae*.**

		Verdadero diagnóstico ASC			Tasas	ASHGL	Intervalo de confianza 95%
		Cultivo (+)	Cultivo (-)	Total			
Prueba ASHGL	Cultivo (+)	30	0	30	Sensibilidad	100%	(100-100%)
	Cultivo (-)	0	6	6	Especificidad	100%	(100-100%)
Total		30	6	36	VPP	100%	(100-100%)
					VPN	100%	(100-100%)

ASC: Agar sangre de carnero

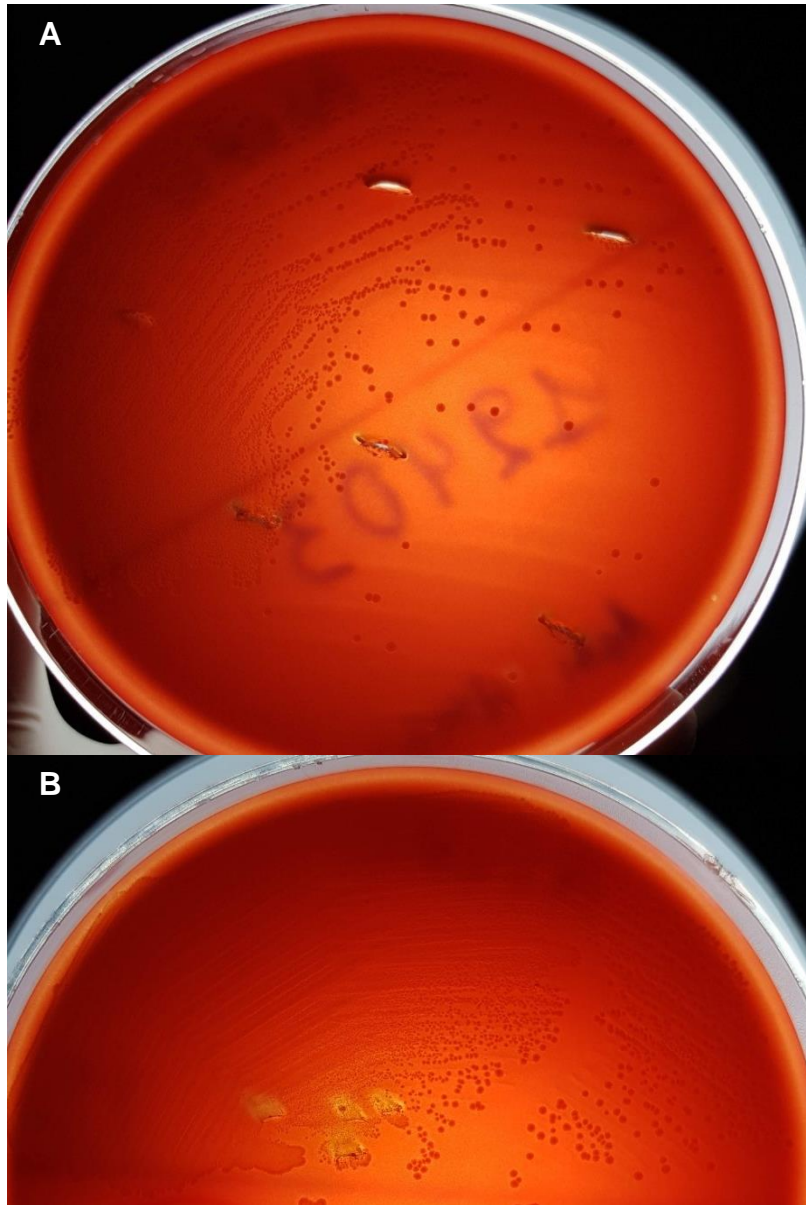
ASHGL: Agar sangre humana con glóbulos rojos lavados

VPP: Valor predictivo positivo.

VPN: Valor predictivo negativo.

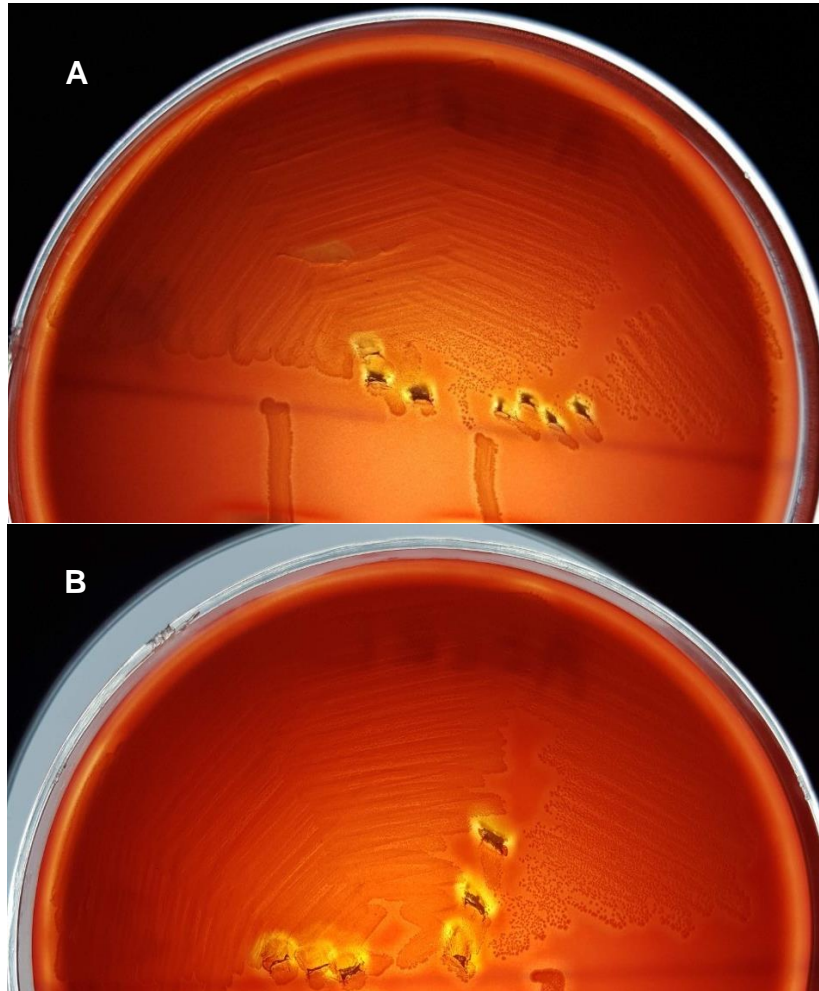
Este mismo valor se vio reflejado a las 48 horas de incubación.

**Cepas ATCC de *Streptococcus agalactiae* en ASC al 5% (A)  
y ASHG al 5%(B)**



Colonias 2 a 3 mm lisas, aspecto mantecoso ASC al 5% (A) y ASHGL al 5% (B)

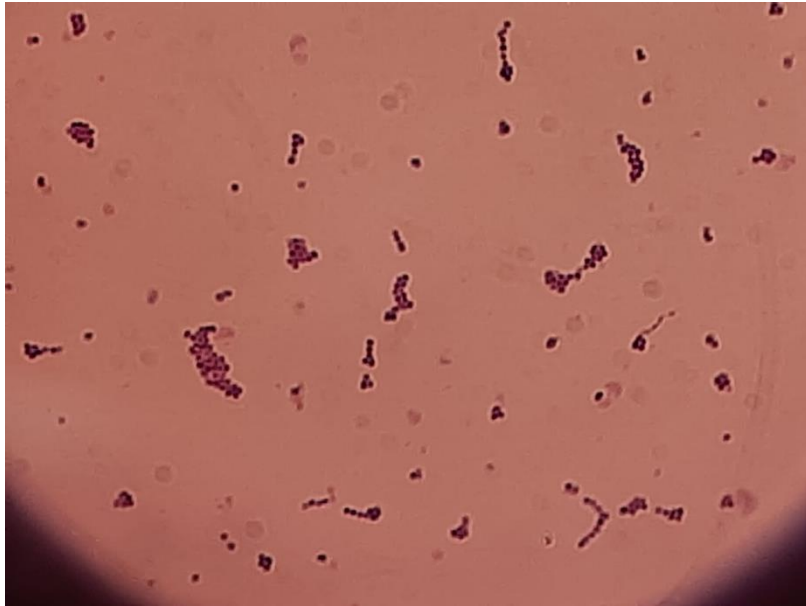
**Gráfico N°9 Betahemólisis y colonias en ASC al 5% (A) y  
ASHGL al 5% (B)**



Colonias de 2 a 3 mm de diámetro, lisas, de aspecto mantecoso y rodeado por un halo de  $\beta$ -hemólisis de cepas de *Streptococcus agalactiae* en ASC al 5% (A) y ASHGL al 5%(B)



### Gráfico N°10 Coloración GRAM



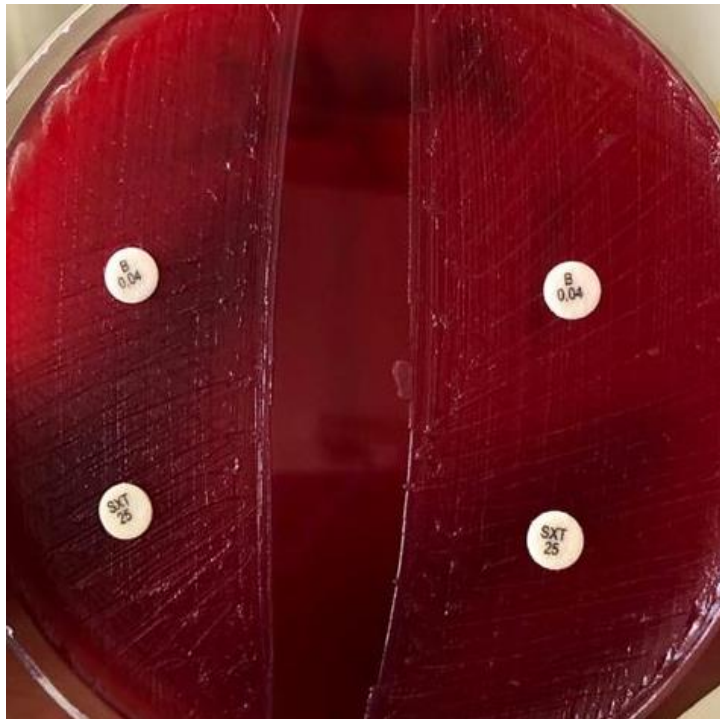
*Streptococcus agalactiae*: Cocos grampositivos (0,6 a 1,2  $\mu$ m) que forman cadenas de longitud variable.

### Gráfico N°11 Prueba de CATALASA



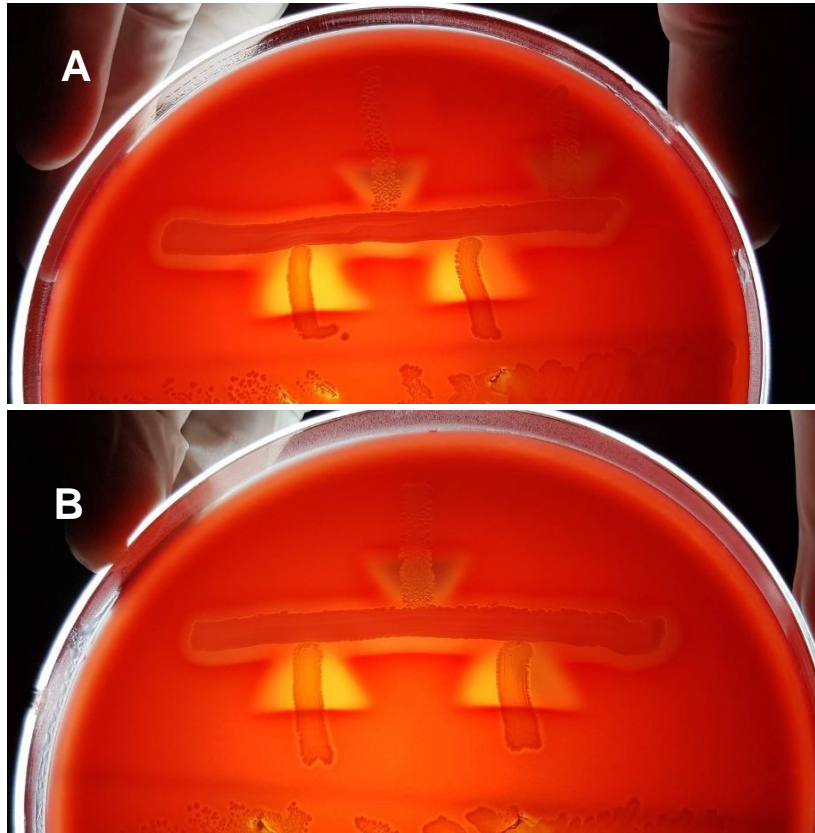
Catalasa negativo especies de *Streptococcus* (izquierda), Catalasa positivo  
*Staphylococcus aureus* (derecha)

**Gráfico N°12 BACITRACINA Y STX en ASHGL al 5%**



*Streptococcus agalactiae*: Resistente a la bacitracina (superior) y resistente al SXT (inferior).

Gráfico N°13 CAMP en ASHGL al 5%(A) y ASC al 5%(B)



CAMP positivo: Cepa control ATCC *Streptococcus agalactiae* (A), Cepa de *Streptococcus agalactiae* (B).

Gráfico N°14 Ficha de recolección de datos

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS															
CEPA: 01										FECHA: 05 de enero 2020					
	Crecimiento de colonias		Beta hemólisis			Tinción GRAM		Catalasa		Prueba de CAMP		TMS 1.25 ug/23.75ug		Bacitracina 0.04u	
	A	P	A	P/24	P/48	CGP	Otros	(-)	(+)	(-)	(+)	S	R	S	R
Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% <b>CEPA ATCC 12403</b>		X		X	X	X		X			X		X		X
Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% <b>CEPA ESTUDIO</b>		X		X	X	X		X			X		X		X
Cultivo en agar sangre de carnero al 5%(Gold Stándard) <b>CEPA ATCC 12403</b>		X		X	X	X		X			X		X		X
Cultivo en agar sangre de carnero (Gold standard) <b>CEPA ESTUDIO</b>		X		X	X	X		X			X		X		X

TMS: Trimetoprim/sulfametoxazol  
 (-): negativo (+): Positivo  
 S: sensible R: resistente  
 A: ausencia P: presencia  
 P/24: presencia a las 24 horas.  
 P/48: presencia a las 48 horas.  
 CGP: cocos gram positivos.  
 Otros: crecimiento no compatible con *Streptococcus agalactiae*.

**CEPA01**

CEPA02

CEPA03

CEPA04

CEPA05

CEPA06

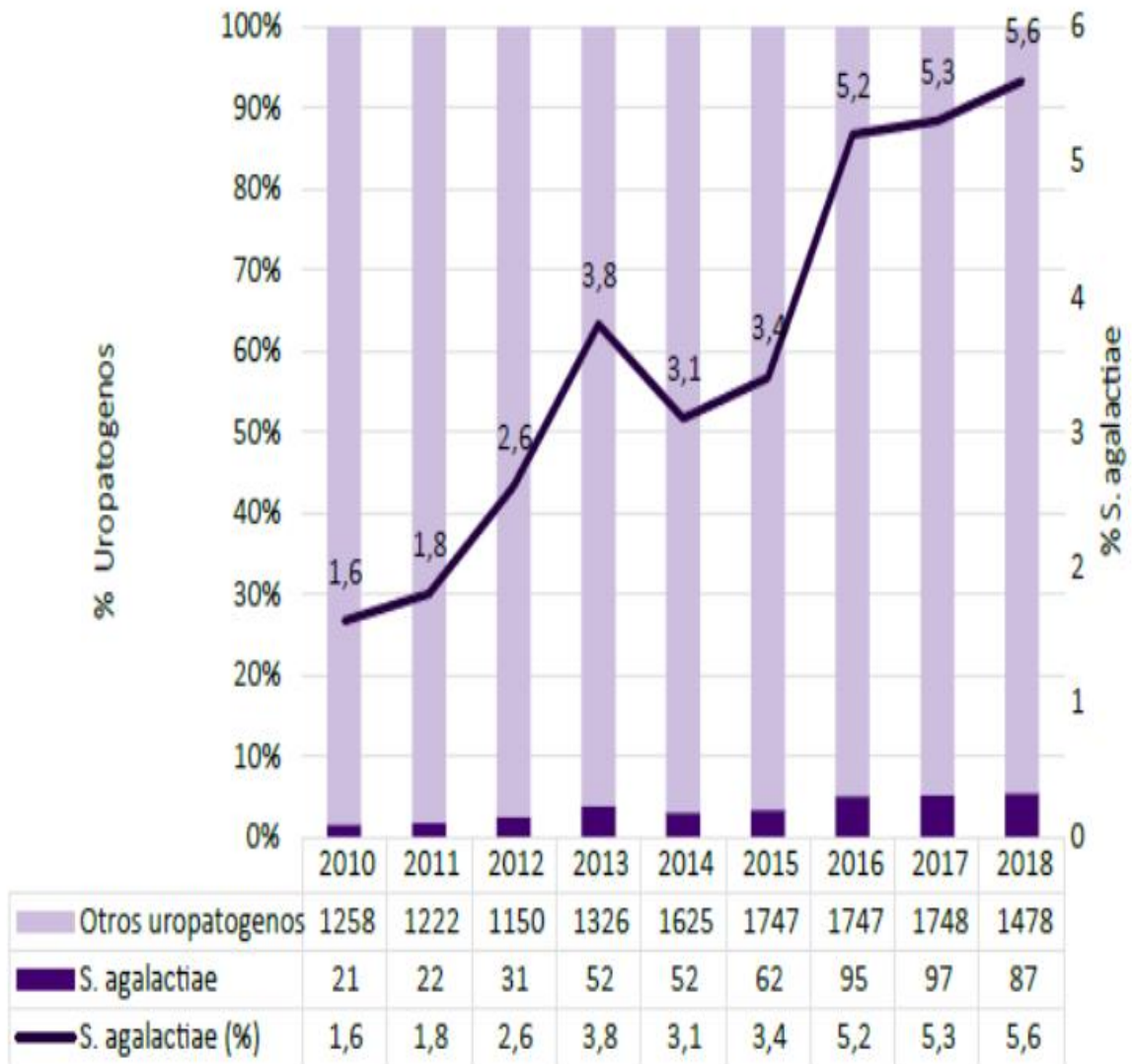
CEPA07

CEPA08

CEPA09

C ... (+)

Gráfico N° 15 Uropatógenos y línea de tendencia del aumento de *Streptococcus agalactiae* durante los años 2010 a 2018 recuperados en muestras de orina en el Hospital San Bartolomé<sup>33</sup>



## 5.2. Discusión

En nuestro país observamos un aumento significativo en la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* en pacientes gestantes<sup>2,33</sup>, por ello se debe realizar un diagnóstico preciso, correcto y oportuno. Para poder brindar un tratamiento temprano y adecuado como forma de prevención, para evitar la transmisión de este patógeno. Debido a que es una bacteria muy exigente, es muy importante cumplir con las medidas y condiciones necesarias para su aislamiento, reduciendo así, la posibilidad de falsos negativos. El medio considerado como gold estándar para el aislamiento de *Streptococcus agalactiae* es el agar sangre con sangre de carnero al 5%.

El presente estudio evaluó el medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL), frente al agar sangre de carnero como patrón de referencia para el aislamiento de *Streptococcus agalactiae*, presentando un crecimiento y hemólisis visible a las 24 horas de incubación, difiriendo con el estudio de Valencia y colaboradores<sup>17</sup>, quienes obtuvieron un crecimiento con mayor número de colonias y la hemólisis marcadamente visible en condiciones de aerobiosis . A diferencia de ello, nuestro medio objeto de estudio fue incubado en una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

El medio evaluado fue incubado en una atmósfera de microaerofilia, es decir, con 5% de CO<sub>2</sub> beneficiando el desarrollo de los microorganismos, observándose el crecimiento de colonias las 24 horas de incubación. Coincidiendo así, con el estudio de Chávez y colaboradores<sup>3</sup>, ellos utilizaron una

atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, pero no lavaron los glóbulos rojos. En nuestro estudio utilizamos glóbulos rojos lavados para eliminar anticuerpos, complemento y anticoagulante, mejorando así el rendimiento del medio para el desarrollo del *Streptococcus agalactiae*.

Con respecto al grado de hemolisis, en nuestro medio de estudio ASHGL, se evidenció un grado de hemolisis idéntica al del agar sangre de carnero al 5% a las 24 horas de incubación. Diferiendo con el estudio de Regali y colaboradores<sup>5</sup>, quienes utilizaron sangre humana obteniendo como resultado colonias más pequeñas con un grado de hemolisis difuso. Cabe mencionar que ellos usaron glóbulos rojos sin lavar.

Niederstebruch N y sus colaboradores<sup>7</sup> obtuvieron mejor resultado de hemólisis en los agares que contenían sangre humana citratada al 2.5 %, esto se debe probablemente a que al reducir el porcentaje de glóbulos rojos también redujeron el porcentaje de plasma y con ello las interferentes presentes en el mismo. Por el contrario, en nuestro estudio utilizamos glóbulos rojos lavados al 5% y con ello eliminamos todos los interferentes que contiene el plasma permitiendo un mejor crecimiento del microorganismo en estudio.

Nuestro medio evaluado ASHGL al 5% presentó a las 24 y 48 horas de incubación una sensibilidad de 100%, especificidad 100% y valores predictivos de 100%. Indicándonos así que este medio no reporto resultados falsos negativos y aisló a *Streptococcus agalactiae*, dando el mismo resultado con el medio de referencia ASC al 5%.

Por los resultados obtenidos en sensibilidad, especificidad y valores predictivos de 100%. Nuestro estudio revela que el medio evaluado; agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL); para el aislamiento de *Streptococcus agalactiae* es tan eficaz como el agar sangre de carnero al 5% (ASC).



## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1. Conclusiones

1. Al evaluar la sensibilidad del medio alternativo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados, se observó un crecimiento eficaz de las colonias, así como también, una visible beta hemólisis a las 24 horas de incubación en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>, presentando una sensibilidad de 100%.
  
2. En relación a la especificidad y valores predictivos, el medio alternativo evaluado; agar sangre humana con glóbulos rojos lavados; presenta una especificidad de 100 %, y valores predictivos del 100%, a las 24 horas de incubación.
  
3. Debido a que estadísticamente no existe diferencia significativa entre el medio alternativo evaluado y el medio de referencia. Se concluye que el medio agar sangre con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL), es tan eficaz para el aislamiento de *Streptococcus agalactiae*, como el agar sangre de carnero al 5% utilizado como Gold estándar.

## 6.2. Recomendaciones

1. Se recomienda el uso del agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL), en aquellos laboratorios que no tengan acceso al uso de rutina de sangre de carnero para la preparación de sus medios de cultivo.
2. Por los datos obtenidos el medio agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL) resulta una alternativa de fácil acceso y muy económica.
3. De preferencia, se sugiere utilizar sangre humana fresca ya que se comprobó en el presente estudio que el uso de la misma permite evidenciar la beta hemólisis con mayor intensidad.
4. Se recomienda el uso de ASHGL al 5% para la prueba de CAMP, al evidenciarse la zona de potenciación de hemólisis en forma de punta de flecha (véase gráfico N° 13) con mayor intensidad, demostrando así, ser tan eficaz como el agar sangre de carnero al 5% (Gold estándar).
5. Se sugiere la realización de estudios que evalúen la eficacia y validez del medio agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5 % (ASHGL), para el aislamiento de otras bacterias exigentes que requieren enriquecimiento nutricional para su desarrollo.

6. Se recomienda incubar el medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% (ASHGL) en una atmosfera de microaerofilia, es decir con 5% de CO<sub>2</sub>, permitiendo su desarrollo y una visible beta hemólisis a las 24 horas de incubación.

## REFERENCIAS

1. Alarcón P. Diagnóstico Microbiológico del Género *Streptococcus* (diapositiva). Santiago: ISP; 2011. 59 diapositivas. Disponible en: [http://www.sochinf.cl/documentos/presentaciones\\_microbiologia\\_cli\\_2011/9\\_sr\\_Alarcon.pdf](http://www.sochinf.cl/documentos/presentaciones_microbiologia_cli_2011/9_sr_Alarcon.pdf)
2. Sotomayor F. Prevalencia de estreptococo beta hemolito del grupo B en gestantes con amenaza de parto pretermino Hospital Nacional Daniel Alcides Carrion .Agosto-Noviembre 2015 [Tesis Pre grado]. Lima: Universidad Ricardo Palma; 2016 .
3. Chavez M, Livia G, Muñoz E. 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. Rev. M. V [Internet]. 2006 [citado 20 may 2019];4(2):148-154. Disponible en : <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/rmv/v04n2/pdf/a07v4n2.pdf>
4. Díaz TM, Nieves BM. Comparación de medios de cultivos y procedimientos para detectar colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas. Rev Chil infectología [Internet]. 2008 [citado 20 may 2019];25(2):108–13. Disponible en : [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182008000200003](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000200003)

5. Regali N, Pegels E, Oviedo P, Quiroga M, Vergara M. Estudio comparativo de sangre de diversos orígenes para el aislamiento e identificación de *Streptococcus agalactiae* .Rev. Cienc.Tecnol. [Internet].2010 Ene.[citado 2020 Ago 09] ;14 :14-18.Disponible en : [https://www.researchgate.net/publication/262659489\\_Streptococcus\\_agalactiae\\_comparacion\\_de\\_diversas\\_sangres\\_para\\_su\\_estudio](https://www.researchgate.net/publication/262659489_Streptococcus_agalactiae_comparacion_de_diversas_sangres_para_su_estudio)
6. Satzke C, Seduadua A, Chandra R, Ccarapetis J, Mulholland K, Russell F. Comparison of Citrated human blood, Citrated Sheep Blood, and Defibrinated Sheep Blood Mueller-Hinton Agar Preparations for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Streptococcus pneumoniae* Isolates .J. Clin . Microbiol.[Internet].2010 Oct [citado 2020 Ago 09];48(10): 3770-3772. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.02357-09>
7. Niederstebruch N, Sixt D, Benda B, Banboye N. A suitable blood agar containing human blood especially for the use in laboratories of developing countries. J. Infect. Dev. Ctries. [Internet]2017[citado 2019 Octu 24];11(5):399-406. Disponible en: <https://www.globolab.de/JInfectDevCtriesDOI103855jdc8957.pdf>
8. 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. [internet].2000 Febr[citado 2020 Ago 09]; 38(2):591-594.Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.2.591-594.2000>
9. Briceño C. Prevalencia de colonización por Estreptococo Hemolítico del grupo B en pacientes hospitalizadas en el servicio de alto riesgo obstétrico con embarazos de 35 a 37 semanas durante el mes de enero del año 2018. [Tesis de Sub especialidad]. Managua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2018.

10. Alva J. Frecuencia de streptococcus agalactiae en mujeres de tercer trimestre de gestación del centro materno infantil el milagro en los meses de setiembre – Noviembre, Trujillo, Perú, 2017. [Tesis Pre grado]. Trujillo: universidad Nacional de Trujillo; 2017.
11. Rubio M, Sánchez G. Frecuencia de Streptococcus agalactiae en secreción vaginal y zona ano-rectal en gestantes atendidas en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, en el periodo de enero a mayo del 2016. Tesis Pre grado]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016.
12. Brañez J, Hauman M. Prevalencia de Streptococcus agalactiae en gestantes del tercer trimestre en el C.S de Ocopilla-Huancayo 2015 [Tesis Pre grado]. Huancayo: Universidad Peruana los Andes; 2016.
13. Guisha D. Identificación de Estreptococo beta hemolítico del grupo B y su relación con infecciones vaginales en embarazadas de 35 a 37 semanas de gestación que asisten al control prenatal al centro de salud tipo A Pujulí. [Tesis Pre grado]. Ambato: Universidad Técnica de Ambato; 2015.
14. Gonzaga G. Identificación del Estreptococo beta hemolítico del grupo B (agalactiae) en las semanas 28 a 37 de gestación para prevenir sepsis neonatal en el periodo abril/mayo del 2014. [Tesis Pre grado]. Loja: Universidad de Loja; 2015.
15. Salgado R. Prevalencia de la colonización vaginal y anorrectal por streptococcus beta Hemolitico grupo B en embarazadas a partir de las 35 semanas de gestación en el Hospital Escuela Aleman Nicaragüense Diciembre del 2014 a Enero 2015. [Tesis de Especialidad]. Managua: Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua; 2016.

16. Álvarez A, Toraño G, Llanes R. Colonización vaginal/rectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de Melena del Sur, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.*[internet].2014 sep. [citado 20 may 2019];66 (3): 415-423. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602014000300009&lang=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602014000300009&lang=pt)
17. Valencia IK. Evaluacion de medios de cultivo para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* en pacientes con diagnostico clinico de faringoamigdalitis que acuden al laboratorio del seladis durante los meses de julio a diciembre del 2008. [Tesis Pre grado]. La paz: Universidad Mayor de San Andres; 2009 .
18. Koneman WE, Stephen A, Giovanniello O, Klajn D, Pertierra A, Preciado M, Rondione S. Diagnóstico microbiológico. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
19. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica. 7a ed. Barcelona. Elsevier; 2014.
20. Laczesky M, Vergara M, Pegels E, Oviedo P, Novosak M, Soto P, et al. Estudios Moleculares de Cepas Invasivas de *Streptococcus agalactiae* (SGB). SEMI [en línea].2014 diciembre. [13 de junio 2019]; N°.58. Disponible en : [https://www.semicrobiologia.org/storage/secciones/publicaciones/semaforo/58/articulos/31\\_MM10\\_Laczesky.pdf](https://www.semicrobiologia.org/storage/secciones/publicaciones/semaforo/58/articulos/31_MM10_Laczesky.pdf)
21. Pumarola A. Bacteriología Sistémica. Rodríguez A. Microbiología y Parasitología médica. 2ª ed. España: Salvat; 1999. p.343-356.

22. Gonzales G. Manual electrónico para la identificación de *Streptococcus* por grupos de Lancefield y su importancia clínica. [Tesis de pre grado]. México D.F : Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
23. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B Streptococcal disease. MMWR. Revised guidelines from CDC. 2002; 51:1-18.
24. Duque C, Gómez B. Comparación de métodos para la recuperación y determinación de la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes de Medellín. Infectio [Internet]. 2014 . [citado 20 may 2019]: 14(2):105–11. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70098-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70098-9)
25. Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, J. Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2005.
26. Mc Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003.
27. Brizuela M. *Streptococcus agalactiae* Grupo B (EGB). Patógeno emergente de infección grave en neonatos y niño. Rev Bioanál. 2007:8-10. Disponible en URL: [http://www.revistabioanálisis.com/arxiu/notas/Nota2\\_13.pdf](http://www.revistabioanálisis.com/arxiu/notas/Nota2_13.pdf)



28. Flickr. Medical Microbiology. 2008. Disponible en URL: <https://www.flickr.com/photos/medmicro/page2>
29. G. Prats. Microbiología Clínica. 1ª ed. Bueno Aires: Médica Panamericana; 2006.
30. Fistera. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. 2010 Disponible en URL: [https://www.fistera.com/mbe/investiga/pruebas\\_diagnosticas/pruebas\\_diagnosticas.asp#Tabla%201](https://www.fistera.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp#Tabla%201)
31. Moraleda J.M. Pregrado de Hematología. 4ª ed. Madrid: Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia; 2017. p.25.
32. Laczeski M, Raúl P, Oviedo P, Quiroga M, Vergara M. Streptococcus agalactiae, medios de conservación accesibles a laboratorios de diagnóstico de baja y mediana complejidad. Rev Cubana Hig Epidemiol [internet].2013 Ago [citado 2019 Oct 24];51(2):129-139. Disponibles en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032013000200002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032013000200002)
33. Pulido A, Soto J. Incremento de aislamientos de *Streptococcus agalactiae* en cultivos de orina en un hospital materno –infantil de Lima, Perú. An. Fac. med.[Internet].2019 Abr[citado 2020 Ago 09]; 80(2):266-267. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-55832019000200023](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832019000200023)
34. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 6a Edi. México: McGraw-Hill / Interamerican Editores; 2016. 355 p.

# ANEXO

## Anexo 01. Matriz de consistencia.

TÍTULO	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HP	VARIABLES	INDICADORES	TIPO DE INVESTIGACIÓN Y POBLACIÓN
EVALUACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR SANGRE HUMANA CON GLÓBULOS ROJOS LAVADOS PARA EL DESARROLLO DE CEPAS DE <i>Streptococcus agalactiae</i> .	<p><b>General:</b> ¿Cuál es el rendimiento del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados para el desarrollo de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>?</p> <p><b>Específicos:</b> ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados para el desarrollo de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>?</p> <p>¿Cuál es el valor predictivo positivo y negativo del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados para el desarrollo de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>?</p>	<p><b>General:</b> Evaluar el rendimiento del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados, para el desarrollo de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>.</p> <p><b>Específicos:</b> -Determinar la sensibilidad y especificidad del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados.  -Determinar el valor predictivo positivo y negativo del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados.</p>	No	<p>Crecimiento de colonias</p> <p>Betahemólisis</p> <p>Tinción GRAM</p> <p>Catalasa</p> <p>Bacitracina</p> <p>Trimetoprim-sulfametoxazol 1.25ug/23.75ug</p> <p>Prueba de CAMP</p>	<p>Colonias blancas brillantes de 2 a 3 mm de diámetro.</p> <p>Lisis completa de los eritrocitos, halo totalmente transparente que rodea a las colonias.</p> <p>Tinción diferencial, las bacterias GRAM positivas se tiñen de azul y las GRAM negativas de rojo, esto se debe a la estructura de la pared celular.</p> <p>Producción de burbujas al añadir el peróxido de hidrogeno, indicador de la actividad catalasa.</p> <p>Cualquier zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco se considera sensible.</p> <p>Cualquier zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco se considera sensible.</p> <p>En presencia del factor CAMP, al interactuar con la <math>\beta</math>-hemolisina secretada por la cepa <i>S. aureus</i>, provocará sinergismo de la hemólisis (punta de flecha).</p>	<p>Estudio de tipo observacional, Descriptivo con corte transversal.</p> <p><b>Población muestra</b> <b>Población:</b> Constituida por 36 cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>. <b>Muestra:</b> Se trabajó con la totalidad de cepas. <b>Muestreo:</b> No aplica.</p> <p><b>Criterios de selección</b></p> <p><b>Criterios de inclusión:</b> Cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i>, debidamente identificadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Docente Madre-Niño san Bartolomé. <b>Criterios de exclusión:</b> No aplica.</p>

Anexo 02. Instrumento

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

CEPA:

FECHA:

	Crecimiento de colonias		Beta hemólisis			Tinción GRAM		Catalasa		Prueba de CAMP		TMS 1.25 ug/23.75ug		Bacitracina 0.04u	
	A	P	A	P/24	P/48	CGP	Otros	(-)	(+)	(-)	(+)	S	R	S	R
Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% <b>CEPA ATCC 12403</b>															
Cultivo en agar sangre humana con glóbulos rojos lavados al 5% <b>CEPA ESTUDIO</b>															
cultivo en agar sangre de carnero al 5% (Gold estándar) <b>CEPA ATCC 12403</b>															
Cultivo en agar sangre de carnero (Gold standard). <b>CEPA ESTUDIO</b>															

TMS: Trimetoprim/sulfametoxazol

(-): negativo (+): Positivo

S: sensible R: resistente

A: ausencia P: presencia

P/24: presencia a las 24 horas.

P/48: presencia a las 48 horas.

CGP: cocos gram positivos.

Otros: crecimiento no compatible con *Streptococcus agalactiae*.

**Anexo 03.**

**CUESTIONARIO PARA LA SELECCIÓN DEL DONANTE**

**Nombre:**

**Edad:**

**Fecha:**

**Hb: \_\_\_\_\_  $\geq$  13 g/dl**

**Hto: \_\_\_\_\_  $\geq$  39%**

<b>Marque con una cruz la respuesta correcta</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>
Doy consentimiento para el uso de mi sangre para la elaboración del medio de cultivo agar sangre humana con glóbulos rojos lavados 5%		
<b>Condiciones básicas para la donación:</b>		
¿Goza de buena salud?		
¿Ha recibido vacuna contra la hepatitis B?		
<b>Donaciones anteriores:</b>		
¿Fue rechazado alguna vez?		
<b>Medicación:</b>		
¿Está tomando o ha tomado en los últimos días algún medicamento?		
<b>En las últimas dos semanas:</b>		
¿Ha presentado fiebre, acompañada de dolor de cabeza y malestar?		
<b>En los últimos 6 meses:</b>		
¿Ha estado hospitalizado?		
<b>En los últimos 12 meses:</b>		
¿Se realizó tatuajes, piercing o acupuntura?		
¿Ha mantenido relaciones sexuales con más de 3 personas?		
Declaro no padecer ninguna enfermedad infectocontagiosa tales como hepatitis B, hepatitis C y VIH		

\_\_\_\_\_  
Personal del laboratorio

DNI:

HUELLA

\_\_\_\_\_  
Donante voluntario

DNI:

HUELLA