

Hospital Universitario «Dr. Gustavo Aldereguía Lima»
Centro Provincial de Higiene y Epidemiología, Cienfuegos

ENSAYO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE ESTREPTOCOCCO

Lic. Carlos Dauval Borges,¹ Dra. María O. Urdanivia Cruz,² y Lic. Francisco Herrera Alonso³

RESUMEN

Para contribuir al aislamiento y diagnóstico eficiente del *Streptococcus* beta hemolítico, causante de escarlatina en algunos círculos infantiles de la ciudad de Cienfuegos, se decidió obtener un medio de cultivo diferente al convencional que garantizara la viabilidad de las cepas para estudios ulteriores, por lo que se realizó una investigación con el objetivo de determinar la efectividad de un medio de cultivo sencillo, de bajo costo y fácil preparación para la conservación y transporte de cepas de *Streptococcus* en los laboratorios de Microbiología del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología del Hospital «Gustavo Aldereguía Lima» de la provincia de Cienfuegos, en el período comprendido entre los meses de enero a abril del 2000. Se ensayó una modificación del caldo Todd-Hewitt con 0,1 % de extracto de levadura y agar para obtener este medio. De 52 cepas estudiadas, 50 mostraron viabilidad al cabo de 30 días (96 %) y de 10 cepas conservadas por 100 días, 9 (90 %) demostraron crecimiento y hemólisis. El sustrato mostró también su eficacia como medio de transporte al trasladarse 16 cepas a un Centro de Referencia distante y mantenerse el 100 % viables y útiles para su estudio.

DeCS: STREPTOCOCCUS/aislamiento & purificación; STREPTOCOCCUS PYOGENES/aislamiento & purificación; ESCARLATINA/etiología; ESCARLATINA/microbiología; TECNICAS BACTERIOLOGICAS; MEDIOS DE CULTIVO.

La infección por microorganismos del género *Streptococcus* es una de las entidades bacterianas más comunes; estudiadas por Koch y Pasteur desde el siglo XIX, son los causantes de numerosas enfermedades entre las cuales tiene una alta incidencia, la faringitis estreptocócica.¹ Madani y

otros² encontraron en un estudio realizado en 1998 que el 24 % de las mujeres embarazadas presentaban en vagina y recto *Streptococcus* del grupo B, los cuales pueden ser letales a los neonatos y a las propias madres.^{3,4} Además estos microorganismos son los responsables de

¹ Licenciado en Ciencias Químicas. Instructor Adjunto de Bioquímica Universidad "Carlos Rafael Rodríguez", de Cienfuegos.

² Especialista de I Grado en Microbiología. Instructora de la Facultad de Ciencias Médicas «Dr. Raúl Dorticós», de Cienfuegos.

³ Licenciado en Microbiología.

abscesos, otitis, septicemia y fiebre reumática, entre otras afecciones.

En el Centro Provincial de Higiene y Epidemiología (CPHE) se había estado realizando un trabajo de aislamiento y diagnóstico de *Streptococos* beta hemolíticos causantes de escarlatina en algunos círculos infantiles de la ciudad de Cienfuegos, y se necesitaba un medio donde conservar y transportar las cepas con garantía para su viabilidad en estudios posteriores.

Para la conservación de una cepa estreptocócica en el laboratorio por varios días, el mejor procedimiento es la congelación en caldo suero a menos 20 grados centígrados, pero en la mayoría de los laboratorios provinciales no hay equipos capaces de alcanzar esta temperatura, por lo que no existía esta posibilidad. Otra variante consiste en cultivar en placas de agar, sangre de carnero al 5 % y sellar convenientemente las placas para evitar la desecación y el riesgo de roturas y contaminación o, en cuñas de agar, sangre o chocolate por breve tiempo, y subcultivar periódicamente en todos los casos para mantener la viabilidad necesaria.⁵

Internacionalmente se recomienda como medio general para la conservación de cepas el Cistina Trypticase Agar (CTA), pero no está disponible, su preparación por componentes se dificulta por la carencia de algunos reactivos en determinados momentos y su costo es más elevado que el medio propuesto en este trabajo.

Ante la situación planteada se hacía necesario la presencia de un medio de conservación y transporte que mantuviera la adecuada viabilidad de las cepas de *estreptococos* y que fuera de fácil preparación, manipulación y bajo costo.

El medio de Todd-Hewitt es un caldo que se emplea para la producción de hemolisina estreptocócica y el cultivo de *estreptococos* para el tipaje serológico.⁶ Este

sustrato se encuentra a nuestro alcance y además posee óptimas condiciones para la viabilidad, por su carga de nutrientes y excelente amortiguamiento. A pesar de contener glucosa en su formulación, ésta no debe constituir un impedimento para la viabilidad de las cepas a mediano plazo.

Por otra parte, se ha descrito que la adición de agar al medio de Todd-Hewitt facilita el encapsulamiento de los *estreptococos* y por lo tanto el aumento de su capacidad de supervivencia.⁷ También existen reportes de estudios realizados en los que se ha comprobado cómo la acción hemolítica de los *Streptococos* beta hemolíticos de todos los grupos es fuertemente promovida por los ácidos nucleicos presentes en el extracto de levadura.^{8,9}

Sayahtaheri y otros¹⁰ en 1994 emplearon con éxito el medio de Todd-Hewitt suplementado con 1 % de extracto de levadura y 2 antibióticos (colimicina y ácido nalidíxico) para el enriquecimiento y posterior siembra de exudados vaginales en busca de *estreptococos* del grupo B.

Por lo antes expuesto, se decidió ensayar una variante del caldo Todd-Hewitt con agar añadido y suplementado con una pequeña cantidad de extracto de levadura (0,1 %), con el objetivo de obtener un medio sólido con buena amortiguación y moderada activación de crecimiento, capaz de mantener con vida los cultivos puros de *estreptococos* en un período suficiente para su estudio y transporte a centros de referencia así como de fácil preparación y segura manipulación, con la posibilidad de almacenamiento y traslado a temperatura ambiente y sobre todo con un costo menor.

MÉTODOS

Se trabajó con un total de 52 cepas de *estreptococos*, de las cuales 38 fueron aisladas en el laboratorio de Microbiología del

CPHE de Cienfuegos, procedentes de exudados faríngeos realizados en círculos infantiles de la ciudad en el primer cuatrimestre del año 2000. Otras 10 cepas fueron aisladas a pacientes en el laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario «Gustavo Aldereguía Lima» de Cienfuegos y otras 4 fueron réplicas de la cepa de referencia *Streptococcus faecalis* ATCC 19433 de la Sección de Control de la Calidad del CPHE de Cienfuegos.

Cada cepa se inoculó por punción profunda en el Medio de Transporte y Conservación de Estreptococos Agar (TCEA), se incubó durante 24 horas a 37 grados centígrados y luego se almacenó a temperatura ambiente al resguardo de la luz solar. Además, se enviaron 16 cepas en este medio al Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí» de Ciudad de La Habana, Centro de Referencia Nacional.

MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

- Para el aislamiento de cepas se empleó agar sangre, preparado a partir de base agar sangre (BIOCEN) y sangre de carnero estéril al 5 %.
- Medio de transporte y conservación de Estreptococos, Agar (TCEA).

Caldo Todd - Hewitt (OXOID)	10,9 g
Extracto de levadura (OXOID)	0,3 g
Agar bacteriológico (BIOCEN)	3,6 g
Agua destilada	300 mL
PH =	7,4

El medio se hirvió hasta su completa disolución, se distribuyó en tubos 13 por 100 con tapa de rosca a razón de 4 mL cada uno. Se mantuvo en autoclave a 121 grados centígrados, durante 15 minutos y se dejó solidificar en posición vertical.

La inoculación se realizó con aguja de nicrón y se tomó del cultivo en placa de agar sangre. Se realizó punción profunda en el medio TCEA. Se identificó correctamente el tubo y se incubó a 37 grados centígrados durante 24 horas; luego se almacenó en lugar fresco y seco a temperatura ambiente y resguardado de la luz solar.

Las cepas de estreptococos así conservadas fueron ensayadas a los 3, 5, 7, 15, 21 y 30 días por estriado en agar sangre carnero al 5 % e incubadas a 37 grados centígrados durante 24 a 48 horas e inspeccionadas para comprobar su viabilidad y su capacidad de hemólisis. Se ensayaron 10 cepas que permanecieron por 100 días bajo estas condiciones.

RESULTADOS

Según la clasificación por grupos de estreptococos se observó un predominio del grupo A (tabla 1) a causa de su probable mayor incidencia en los exudados faríngeos de los círculos infantiles.

TABLA 1. Distribución de las 52 cepas estudiadas por grupos y tipos de hemólisis

Cepas según grupo de estreptococo	No. de Cepas ensayadas	Tipos de hemólisis
Grupo A	12	Beta
Grupo C	2	Beta
Grupo D (ATCC)	4	Alfa
Grupo G	2	Beta
Sin clasificar	32	Beta

Fuente: Laboratorio de Microbiología CPHE, enero-abril, 2000.

Todas las cepas presentaron correcta viabilidad en los diferentes intervalos, excepto una que no creció en agar sangre de carnero al 5 % a los 15 días de conservada

en el medio TCEA y otra, que no resultó útil porque se contaminó a los 21 días (tabla 2).

TABLA 2. Viabilidad de cepas de estreptococo según tiempo de conservación en TCEA

Días	No. siembras	Cepas viables	Cepas inviables	Observaciones
3	52	52	0	-
5	52	52	0	-
7	52	52	0	-
15	52	51	1	-
21	51	50	1	Contaminada
30	50	50	0	-
100	10	9	1	-

Fuente: Laboratorio de Microbiología CPHE, enero-abril, 2000.

Todos los grupos clasificados mostraron supervivencia a los 30 días.

Las 16 cepas enviadas al Centro de Referencia en el medio obtenido como sustrato de transporte resultaron útiles.

Por último, 10 cepas que se mantuvieron conservadas durante 100 días, presentaron una excelente viabilidad (90 %), solamente 1 no creció.

DISCUSIÓN

El Medio de Conservación y Transporte de Estreptococos Agar (TCEA) derivado de una modificación del caldo Todd-Hewitt, demostró tener la capacidad de mantener

la viabilidad de los microorganismos durante un período de 30 días con plena seguridad y hasta 100 días con el 90 % de probabilidad de supervivencia, además de servir como medio de transporte de cepas de estreptococos hasta laboratorios distantes y mantenerlas útiles para posteriores investigaciones.

Para mantener viable una cepa de estreptococo en el laboratorio por el método de cultivo y subcultivo en agar sangre de carnero al 5 % durante 30 días se necesitan aproximadamente 15 placas de medio. En cambio, con el medio TCEA solamente se necesita un tubo de 13 por 100 mm con 4 mL del medio y realizar la incubación por 24 horas; el resto del tiempo se mantiene a temperatura ambiente.

Además de las ventajas enumeradas se eliminan los siguientes riesgos e inconvenientes:

- Desecación
- Contaminación
- Probabilidad de roturas
- Espacio ocupado en incubadoras
- Mayor manipulación
- Fondo de tiempo de personal técnico para realizar los subcultivos de las cepas

Por lo antes expuesto, se recomienda el uso del medio de cultivo TCEA para la conservación y transporte de cepas de estreptococos, por su fácil preparación, sencilla manipulación, efectividad y seguridad.

SUMMARY

To contribute to the isolation and efficient diagnosis of the b-haemolytic Streptococcus, which has caused scarlet fever in some day care centers of the city of Cienfuegos, it was decided to obtain a culture medium different from the conventional one that will guarantee the viability of the strains for future studies. To this end, a research was done to determine the effectiveness of a single culture medium, of low cost and easy preparation for the conservation and transport of Streptococcus strains in the laboratories of Microbiology of the Provincial Center of Hygiene and Epidemiology of "Gustavo Aldereguía Lima" Hospital of Cienfuegos province, from January to April, 2000. A modification of the Todd-Hewitt broth was assayed with 0.1 % of extract of yeast and agar to

obtain this medium. Of 52 studied strains, 50 showed viability after 30 days (96 %), whereas growth and hemolysis were observed in 9 (90 %) of 10 strains conserved for 100 days. The substrate also proved its efficiency as a means of transport when 16 strains were transferred to a distant Reference Center and 100 % kept viable and useful for their study.

Subject headings: STREPTOCOCCUS/isolation & purification; STREPTOCOCCUS PYOGENES/isolation & purification; SCARLET FEVER/etiology; SCARLET FEVER/microbiology; BACTERIOLOGICAL TECHNIQUES; CULTURE MEDIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zinseer H. Microbiología. 17 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1983:527.
2. Madani T, Harding GK, Alfa MJ. Screening pregnant women for group B streptococcal colonization. *Infection* 1998;26(5):288-91.
3. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Medical microbiology. 20 ed. New York: Semion and Shuster, 1995:232.
4. Bridsen E. The development, manufacture and control of microbiological culture media. Londres: Unipath, 1994:86.
5. Dwight RJ, Kaplan EL. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones estreptocócicas del grupo A. Ginebra: Oriental Press; 1997:23.
6. Bridson E. The oxoid manual. 8va. ed. Basingstoke: Oxoid Limited, 1998: 202.
7. Sancho J. Medios de cultivo para microbiología. 4 ed. Barcelona: Romargraf, 1996:227.
8. Berheimer AW, Rodbart M. The effect of nucleic acids and carbohydrates on the formation of stretolysin. *J Exp Med* 1948;88:149.
9. Merck E. Culture Handbook. Darmstadt: Overgas, 1991:193.
10. Sayahtheri S, Dryja S. Detection of Group B Streptococcus. Comparison of solid and liquid culture media; with and without selective antibiotics: *Diag Microbiol Infect Dis* 1994;18:141.

Recibido: 11 de marzo de 2001. Aprobado: 1 de julio de 2001.

Lic. *Carlos Dauval Borges*. Centro Provincial de Higiene y Epidemiología, Cienfuegos, Cuba.