

ARTICULOS ORIGINALES

DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE COAGLUTINACION PARA EL DIAGNOSTICO DE FARINGITIS ESTREPTOCOCICA

CLAUDIA PATRICIA MARTINEZ*, OLGA MARINA OSPINA*, MIGUEL A. GUZMAN**, DIDIER FERNANDEZ***

Se estandarizó una prueba de coaglutinación para diagnóstico de faringitis estreptocócica, produciendo un reactivo específico mediante la conjugación de una cepa Cowan I de *Staphylococcus aureus*, rica en proteína A, con IgG obtenida de suero de conejos hiperinmunizados con una cepa de referencia de *Streptococcus pyogenes*. Se estudiaron 17 pacientes con cuadro compatible clínicamente con faringitis estreptocócica y 24 personas supuestamente sanas como grupo control. De los 17 pacientes se aisló e identificó *S. pyogenes*, en 16 de ellos la coaglutinación fue positiva; en los 24 controles el cultivo para *S. pyogenes* fue negativo e igualmente la coaglutinación

El análisis estadístico muestra que la prueba es sensible y específica pudiendo ser un buen recurso para el diagnóstico rápido de la entidad.

INTRODUCCION

El *Streptococcus pyogenes* ha sido causa constante de enfermedad en el hombre. Descripciones muy claras de las típicas entidades clínicas tales como escarlatina y erisipela aparecen en la literatura médica antes de Billroth (1874), las cuales se refieren a cadenas de microorganismos globulares en las lesiones; Phileisen (1982) reprodujo erisipela en voluntarios, con cultivos puros de *Streptococcus*: Ogston (1932) definió el papel de los *Streptococcus* en infecciones postquirúrgicas de heridas. Fueron también reconocidos como entidades clínicas hace más de un siglo la fiebre reumática y la glomerulonefritis como secuelas graves de la infección estreptocócica (1-3). El estudio de los *Streptococcus* en el laboratorio fue posibilitado por la introducción de medios de cultivo sólidos hacia fines del siglo XIX; a principios del siglo XX Schottmuller demostró las reacciones hemolíticas producidas por el *Streptococcus* en agar sangre. Años más tarde Brown describió las diferentes reacciones hemolíticas

producidas por microorganismos del género *Streptococcus* en agar sangre.

A principios de la década de 1930 Rebeca Lancefield identificó cinco distintos grupos antigénicos de *Streptococcus* con base en diferencias serológicas de los polisacáridos C de la pared celular.

Por las técnicas tradicionales de detección del *Streptococcus pyogenes* al menos transcurren 18 horas desde el recibo del espécimen hasta el informe del resultado.

Por más de 30 años el cultivo de hisopados de faringe ha sido la técnica ideal para el diagnóstico de faringitis causada por el *Streptococcus pyogenes*, sin embargo, hoy se prefiere el uso de técnicas rápidas de diagnóstico basadas en la detección del antígeno, tales como CIE (4), inmunofluorescencia (5), aglutinación de latex (6-11), extracción enzimática o ácida (10-12), técnicas de precipitación y test de color (13).

* Estudiantes de Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana.

** Jefe Grupo de Inmunología. Instituto Nacional de Salud, Bogotá-Colombia.

***Profesor de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana.

El cultivo en ocasiones puede no ser fiable pues una proporción de *Streptococcus* sensibles a la bacitracina, prueba comúnmente utilizada como prueba presuntiva, no pertenecen al grupo A. Igualmente algunos *Streptococcus* del grupo A pueden no ser sensibles a la bacitracina y por tanto dar resultados falsos negativos no estableciéndose el diagnóstico correcto, lo cual constituye un grave problema por las complicaciones que se pueden presentar como consecuencia de una faringitis estreptocócica (3, 14, 15, 16).

Existen otras técnicas para el diagnóstico de *Streptococcus pyogenes* como por ejemplo el "rapid Strep System Kit" (17). La ventaja de estos nuevos sistemas es que el diagnóstico de la faringitis estreptocócica es confirmado con un alto grado de especificidad y por la prontitud del resultado el paciente recibe la antibióticoterapia adecuada. La desventaja de ellas es el costo; por este motivo, no se utilizan como técnicas de rutina en la mayoría de los laboratorios (10).

Cerca del 90% de las cepas de *Staphylococcus aureus* producen una, compuesto conocido como proteína A, el cual tiene la propiedad de combinarse en el extremo Fc de la molécula de IgG de varias especies, al interactuar con éste, deja libre los fragmentos Fab quedando la IgG en capacidad de reaccionar con su antígeno específico, fenómeno que, produce la coaglutinación de *S. aureus* que se utiliza como indicador de una reacción antígeno-anticuerpo (18).

La técnica de coaglutinación ha sido usada en los últimos años con gran éxito para identificar diferentes antígenos debido a su gran sensibilidad y especificidad. Ha sido utilizada para la identificación de antígeno de *Salmonella* A, D, VI (19, 20, 21, 22) *Haemophilus influenzae* tipo b (23, 24, 25); *Streptococcus pneumoniae* (26, 27) *Neisseria meningitidis* (28); antígeno común de enterobacterias (17, 18); *Neisseria gonorrhoeae* (29, 30, 31); *Mycobacterias* (32); *Criptomococcus neoformans* (33); *Streptococcus* del grupo B (34) y *E. coli* (35).

Por lo anterior se decidió estandarizar un procedimiento para investigar en forma directa la presencia de *S. pyogenes* en cuadros de faringitis mediante un procedimiento de coaglutinación, y en esta forma establecer un diagnóstico rápido de faringitis estreptocócica.

MATERIALES Y METODOS

***Streptococcus pyogenes*:** se utilizó una cepa tipo proveniente del Instituto Nacional de Salud, la cual se cultivó en caldo BHI (Difco), (Detroit, Michigan, USA) por 12 horas, para su enriquecimiento, posteriormente se hizo un pase a caldo de Todd Hewitt (Oxoid, Basingstokc, Hants, England) por 18 horas; luego se procedió a hacer las pruebas pertinentes de identificación.

Preparación del antígeno: la masa celular se recolectó de cultivos puros de 18 horas, se centrifugó a 7.520 xg por 15 minutos, a 4°C, se lavó tres veces en solución PBS 0.15 M pH 7.2 a 7.520 xg por 15 minutos, se suspendió luego en solución salina formalinizada al 0.4% y se incubó a 4°C por 72 horas; pasado este tiempo, se lavó tres veces con PBS 0.1 M pH 7.2; la prueba de esterilidad e inactivación se realizó en agar nutritivo, incubando a 37°C por 48 horas, finalmente se suspendió en PBS para obtener una concentración similar al tubo número 5 de la escala de McFarland (15x10 UFC/ml).

Antisueros Anti-*Streptococcus*: se obtuvieron por inoculación en conejos machos, previo examen, para comprobar su buen estado de salud. El esquema de inoculación utilizado fue el recomendado por el CDC, para lo cual, se hizo una titulación inicial del suero por medio de una prueba de aglutinación para comprobar la ausencia de anticuerpos anti-*Streptococcus*; luego de lo cual, se inocularon los conejos por vía intravenosa por cinco días sucesivos con 1 ml de antígeno, en la primera semana, 2 ml en la tercera semana y 4 ml en la quinta semana. La concentración del antígeno fue la anteriormente determinada. La titulación de los anticuerpos se hizo por aglutinación, para lo cual se realizaron diluciones del suero con solución salina 0.85% en múltiplos de dos hasta la dilución 1:64 dejando un volumen de 0.2 ml en todos los tubos, se agregó posteriormente una gota del antígeno en cada tubo y se incubó por dos horas a 37°C y por 24 horas a 4°C, tiempo necesario para que la reacción ocurra; posteriormente se colocaron refuerzos de 4 ml con intervalo de 2 semanas hasta obtener títulos satisfactorios. Los conejos fueron sangrados a muerte y los sueros obtenidos se guardaron asépticamente.

La purificación de la IgG de los sueros inmunes se realizó por concentración progresiva de ácido octanoí-

co, con esta técnica algunos grupos de proteínas no solubles se precipitan y pueden ser removidos por centrifugación, dejando en solución aquellas proteínas poco solubles como la IgG. La solución de IgG se dializó contra PBS 0.01M pH 7.6 durante 48 horas a 4°C, haciendo varios cambios del buffer, esto con el fin de remover el exceso de ácido presente, posteriormente se realizó una electroforesis en acetato de celulosa (37) y una inmunoelectroforesis en agarosa al 1% para comprobar la pureza de la fracción IgG (37). Finalmente la solución de IgG se alicuotó y se le agregó azida de sodio (1mg de azida por cada ml de suero) para prevenir contaminación y se conservó a 4° hasta el momento de su uso.

Staphylococcus aureus: para sensibilizar y estabilizar la cepa de *S. aureus*, ésta se cultivo en agar tripticasa soya durante 18 horas a 37°C, luego se realizaron las pruebas de identificación: catalasa, coagulasa y coloración de Gram. La masa celular se recolectó y se lavó tres veces con PBS 0.15 M pH 7.2, centrifugando cada vez a 7.520 xg por 15 minutos, se suspendió finalmente en formaldehído al 0.5% en solución salina isotónica y se dejó en reposo por dos horas a temperatura ambiente, luego se centrifugó y se lavó tres veces con PBS 0.15 M pH 7.2 y se suspendió en la misma solución amortiguadora en proporción de 10:100 la suspensión se calentó a 80°C con agitación continua durante 60 minutos; las bacterias formalizadas y calentadas se lavaron 3 veces con PBS 0.15 M pH 7.2 y se resuspendieron al 10% v/v con PBS. Luego se guardaron a 4°C hasta el momento de su uso.

Para producir el conjugado se mezcló la suspensión de *S. aureus* con la fracción IgG obtenida en los conejos, para ello se ensayaron diferentes esquemas tal como aparece en el cuadro No. 1.

Una vez obtenido el complejo *S. aureus* - IgG se realizaron inicialmente pruebas haciendo controles positivos y negativos de la siguiente forma: una gota *S. aureus* sensibilizado + una gota *S. pyogenes* en solución, como control positivo. Una gota de *S. aureus* sin sensibilizar + una gota de *S. aureus* sensibilizado + una gota PBS, como control de aglutinación inespecífica.

La especificidad de la coaglutinación se probó mediante la reacción con dos microorganismos que se

Cuadro 1

CONDICIONES DE CONJUGACION DE *S. aureus* e IgG anti-*S. pyogenes*

| Volumen Antisuero | Volumen <i>S. aureus</i> Estabilizado | Temperatura | Tiempo de Incubación |
|-------------------|---------------------------------------|-------------|----------------------|
| 0.1 ml | 1 ml | 4°C | 2 horas |
| | | 37°C | |
| | | 17-22°C | |
| 0.2 ml | 1 ml | 4°C | 2 horas |
| | | 37°C | |
| | | 17-22°C | |
| 0.3 ml | 1 ml | 4°C | 2 horas |
| | | 37°C | |
| | | 17-22°C | |
| 0.5 ml | 1 ml | 4°C | 2 horas |
| | | 37°C | |
| | | 17-22°C | |
| 1 ml | 1 ml | 4°C | 2 horas |
| | | 37°C | |
| | | 17-22°C | |

encuentran frecuentemente en la faringe, como lo son el *Streptococcus viridans* y el *Streptococcus agalactiae*, los cuales se cultivaron en agar sangre y posteriormente en caldo de Todd-Hewitt por 18 horas a 37°C. Para la realización de estas pruebas se colocó en láminas de aglutinación una gota de *S. aureus* sensibilizado + una gota de *S. viridans* en caldo de Todd-Hewitt y una gota de *S. aureus* sensibilizado + una gota de *S. agalactiae* en caldo de Todd-Hewitt. La lámina se agitó manualmente por dos minutos y su resultado se leyó por aglutinación macroscópica.

Estudio de pacientes: la prueba se realizó en 17 pacientes con síntomas de faringitis provenientes del Hospital Vecinal de Suba San Pedro Claver; la mayoría de ellos eran de bajos recursos económicos, todos fueron estudiados por el médico general y por el otorrinolaringólogo.

La edad estaba comprendida entre los dos años y los 36 años; la edad promedio fue de 15 años. Los controles fueron 24 personas supuestamente sanas, de condiciones similares al grupo de pacientes.

La muestra se tomó con hisopo, este se emulsionó sobre una lámina de aglutinación con una gota de solución salina estéril, luego se agregó una gota del reactivo de coaglutinación, se mezcló y agitó por dos minutos y se observó el resultado, simultáneamente se sembró en caldo de Todd-Hewitt, se incubó a 37°C por 18-24 horas, luego se hizo un pase en agar sangre y agar nutritivo incubando a 37°C por 18-24 horas y se procedió a su identificación final.

RESULTADOS

El cuadro No. 2 muestra los títulos obtenidos en los sueros de los conejos inmunizados, la comprobación de la pureza de IgG obtenida a partir de estos, se pueden observar en la Fig. No. 1.

Se demostró que las condiciones óptimas para producir el conjugado se obtenían al mezclar 0.2 ml de la solución IgG y 1 ml de la suspensión de *S. aureus*, incubando a 4°C ó 17-22°C. En estas condiciones, se presentó la coaglutinación más fuerte entre el complejo IgG proteína A y el *Streptococcus pyogenes* en suspensión, la temperatura de incubación fue la óptima pues la reacción se veía con mayor claridad que cuando se incubaba a temperatura ambiente.

Los controles demostraron la especificidad de la prueba de coaglutinación, ya que no se presentaron

Cuadro No. 2.

TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA *S. pyogenes*

| CONEJO No. | TITULO |
|------------|-----------------------------|
| 1 | 1:32 |
| 2 | Murió durante la incubación |
| 3 | 1:32 |
| 4 | 1:16 |
| 5 | 1:16 |
| 6 | 1:32 |

reacciones falsas positivas, falsas negativas, ni cruzadas con otros microorganismos que se encuentran también en faringe (Fig. No. 2).

Se pudo establecer que, los 17 pacientes estudiados fueron positivos para *Streptococcus pyogenes* por cultivo, uno de éstos no fue detectado por la técnica de coaglutinación. Los 24 controles fueron negativos tanto en el cultivo como en la prueba de coaglutinación.

La validez diagnóstica de la prueba puede verse en el cuadro No. 3.

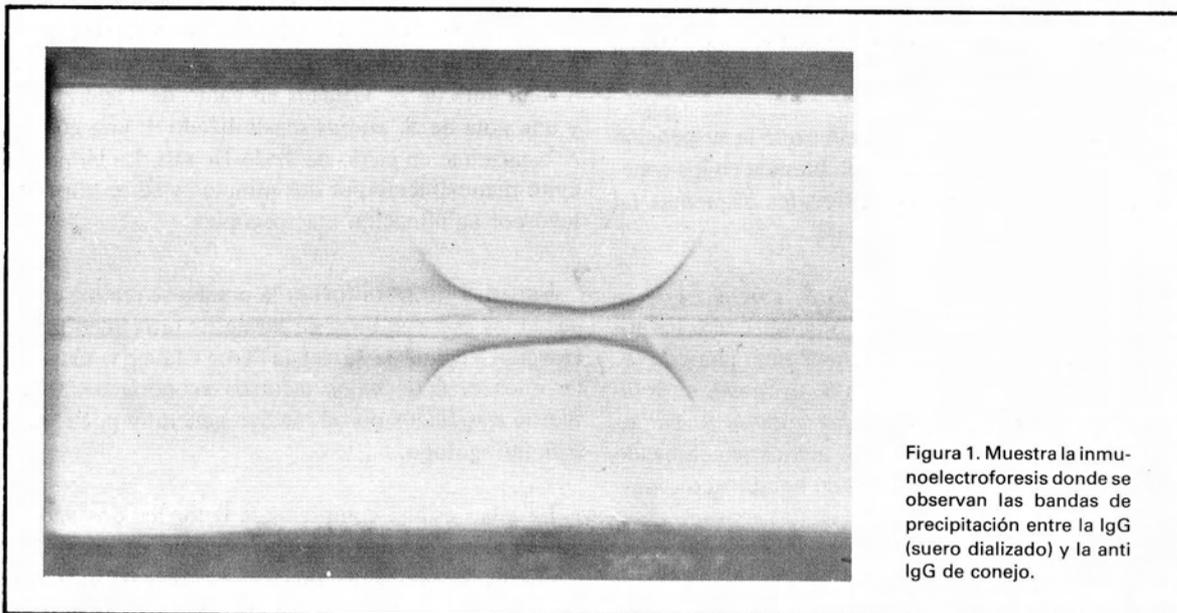
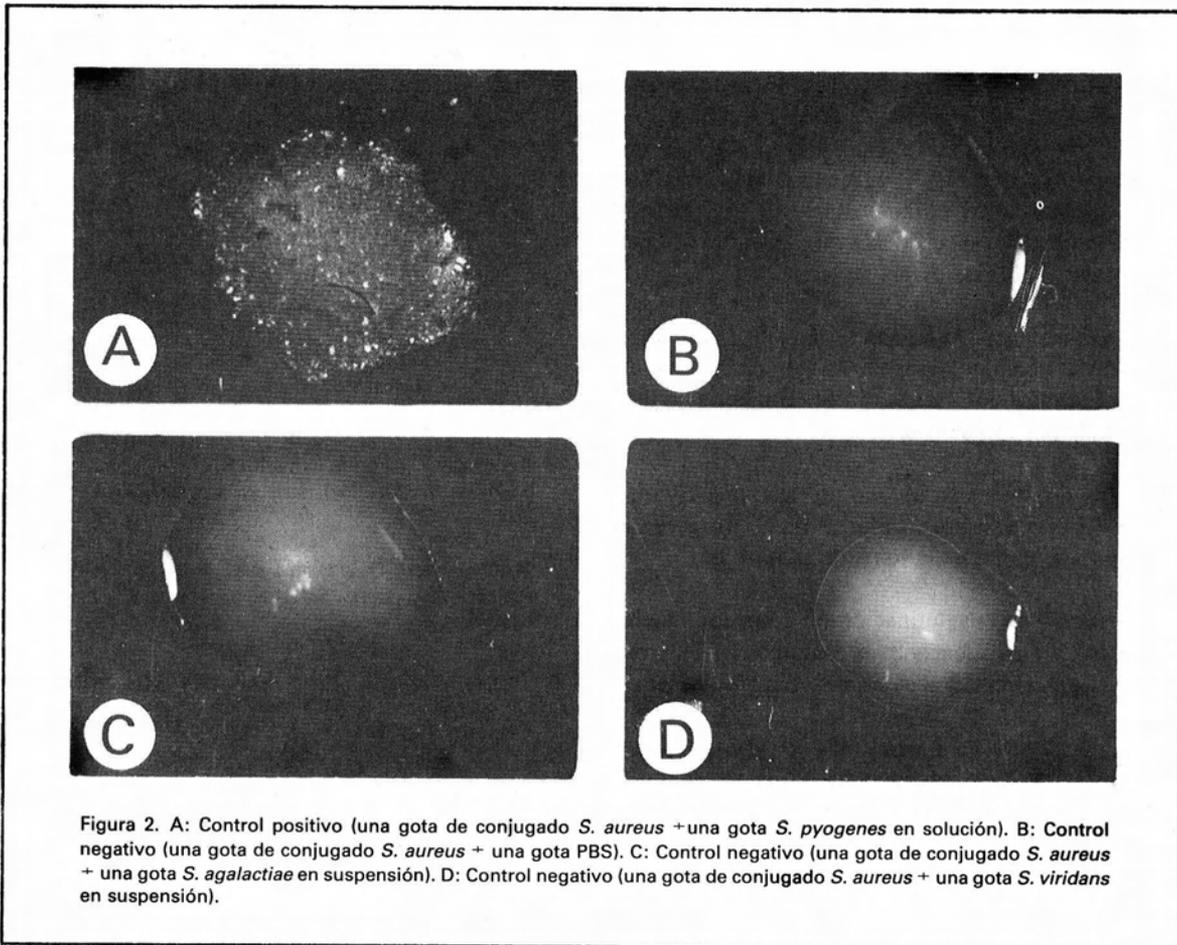


Figura 1. Muestra la inmuno-electroforesis donde se observan las bandas de precipitación entre la IgG (suero dializado) y la anti IgG de conejo.

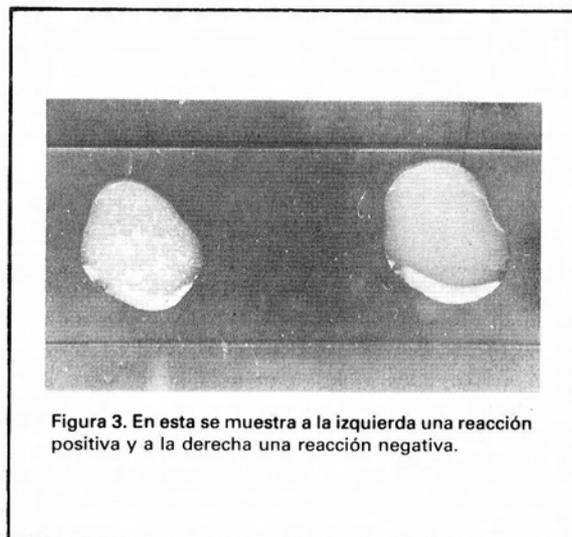


Cuadro No. 3

VALIDEZ DE LA PRUEBA DE COAGLUTINACION

| DIAGNOSTICO POR COAGLUTINACION | ENFERMEDAD PRESENTE | ENFERMEDAD AUSENTE |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| Positivo | 16 | 0 |
| Negativo | 1 | 24 |
| TOTAL | 17 | 24 |

Se comprobó que la sensibilidad de la prueba era del 94.11%, la especificidad del 100% y el valor predictivo positivo y negativo eran 100%.



DISCUSION

Mediante los resultados obtenidos se comprobó que el reactivo analizado *Staphylococcus aureus* cepa Cowan I rico en proteína A, sensibilizado con IgG anti-*Streptococcus pyogenes* se puede utilizar para el diagnóstico de faringitis estreptocócica, ya que presentó la sensibilidad y especificidad que la califican como una prueba válida de diagnóstico.

Se encontró que los resultados hallados por cultivo confirmaban los obtenidos por la técnica de coagulación y en algunos casos coincidieron con la clínica presentada por el paciente.

En los resultados se obtuvo un falso negativo que puede deberse a la poca cantidad de *S. pyogenes* en la muestra por una mala toma de la misma.

La técnica de coagulación no demanda muchos costos en términos de reactivos o equipos y la interpretación de los resultados es rápida, sencilla y clara.

Esta técnica al ser mucho más económica, podría ser de gran ayuda si se utiliza de rutina en un laboratorio, debido a que en muchas ocasiones, por la falta de recursos económicos por parte del laboratorio o del paciente, este último no se beneficia con un tratamiento adecuado y oportuno exponiéndose a la posibilidad de las graves secuelas de una infección estreptocócica.

El reactivo una vez preparado se conserva estable aproximadamente seis meses a 4°C.

De acuerdo a los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo, la prueba puede ser de gran utilidad diagnóstica.

SUMMARY

A coagglutination test intended to be used as a diagnostic test for streptococcal pharyngitis was standardized by means of a specific conjugate prepared coupling a *Staphylococcus aureus* Cowan I strain with anti-*Streptococcus pyogenes* IgG produced in rabbits. In seventeen patients with proven streptococcal pharyngitis by clinical and bacteriological findings, the coagglutination test was positive in sixteen, meaning 94.11% agreement. In twenty four healthy persons the

coagglutination test was negative, the specificity was proved using two of the most common encountered microorganisms in normal oropharyngeal flora: *S. viridans* and *S. agalactiae*. The statistical analysis showed the potentiality of this test as a diagnostic tool.

BIBLIOGRAFIA

1. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Microbiología Médica. Editorial el Manual Moderno, S.A. de C.J. México D.F. 1983; 196.
2. Koneman E, Allen S, Dowell VR, et al. Diagnóstico microbiológico. Ed Med Panamericana S.A. Buenos Aires. 1983; 296.
3. Todd-Sanford-Davidsohn. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Salvat editores, octava edición. 1988; 948 y 1330.
4. Thirumoorthi MC, Dajani AS. Comparison of Staphylococcal coagglutination, latex agglutination antigen detection. J Clin Microbiol. 1979; 9: 28.
5. Cars O, Forsum U, Hjelm E. New Immunofluorescence method for the identification of group A, B, C, E, F, and G Streptococci. Act Path Microbiol Scand Sect B. 1975; 83: 145.
6. Chang MJ, Mottla C. Ten minute Detection of Group A Streptococci in Pediatric Throat Swabs. J Clin Microbiol. 1985; 21: 258.
7. Gerber MA, Spadaccini LJ, Wright LI. Latex agglutination test for rapid identification of group A Streptococci directly from throat swabs. J Pediatric. 1984; 105: 702.
8. Graham L, Meier F, Centor R, et al. Effect of medium and cultivation conditions on comparisons between latex agglutination and culture detection of Group A Streptococci. J Clin Microbiol. 1986; 24: 644.
9. Petts DN. Early detection of streptococci in swabs by latex agglutination before culture. J Clin Microbiol. 1984; 19: 432.
10. Rapid Office Diagnosis Test for Streptococcal pharyngitis. Med Lett Drugs Ther. 1985; 27: 49.
11. Storm W. Rapid detection of streptococcal antigens by latex agglutination test in neonatal body fluids. Acta Paediatr scand. 1983; 71: 145.
12. El Kholy A, Facklam R, Sabri G, et al. Serological identification of Group A Streptococci from throat scrapings before culture J Clin Microbiol. 1978; 8: 725.

13. Hadfield SJ, Pettes DN, Kennedy P. Novel color test for rapid detection of Group A Streptococci. *J Clin Microbiol.* 1987; 25: 1151.
14. Vajkd Dm, Lawrence J, Nassas P, et al. Clinical trial comparing Bacitracin with Strep - A - Chek for accuracy and turnaround time in the presumptive identification of *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol.* 1986; 24: 431.
15. Appelbaum P, Chaurushiya PS, Jacobs RM, et al. Evaluation of the rapid strep system for species identification of streptococci. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 588.
16. García TF, Drago E. Demostraciones de antígenos en productos biológicos por coaglutinación de estafilococcus que contienen proteína A. *Bol Med Hosp Inf Mex.* 1982; 39: 321.
17. Carrillo J, Grave PM, García F. Demostración del antígeno común de enterobacterias (ECA) por la reacción de coaglutinación. *Bol Med Hosp Inf Mex.* 1982; 39: 725.
18. Carrillo J, Grave PM, García F. Coaglutinación de *Staphylococcus aureus* con antígeno común de enterobacterias. *Arch Invest Med. (Mex.)* 1983; 14: 221.
19. Edwards EA, Hilderbrand RL. Method for identifying Salmonella and Shigella directly from the primary isolation plate by coagglutination of protein A containing staphylococci sensitized with specific antibody. *J Clin Microbiol.* 1976; 3: 339.
20. Michail IA, Sanborn WR, Sippel JE. Rapid economical diagnosis of enteric fever by a blood clot culture coagglutination procedure. *J Clin Microbiol.* 1983. 17: 564.
21. Rockhill RC, Rumman LW, Lesmana M, et al. Detection of *Salmonella typhi* D, vi and d antigens by slide coagglutination in urine from patients with Typhoid fever. *J Clin Microbiol.* 1980; 11: 213.
22. Sanborn UR, Leasmana M, Edward EA. Enrichment culture coagglutination test for rapid, lowcost, diagnosis of salmonellosis. *J Clin Microbiol,* 1980; 12: 151.
23. Collins JK, Kelley MT. Comparison of phadebact coagglutination, Bactogen latex agglutination and counterimmunoelectrophoresis for detection of *Haemophilus influenzae* type b antigens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1983; 17: 1005.
24. Riera L. Detection of *Haemophilus influenzae* type b antigenuria by bactigen and phadebact kits. *J Clin Microbiol.* 1985; 21: 638.
25. Sukganong M, Dajani H. Detection of *Haemophilus influenzae* type b antigen in body fluids, using specific antibody-coated staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1977; 5: 81.
26. Edwards, EA, Kilpatrick ME, Hooper D. Rapid detection of pneumococcal antigens in sputum and blood serum using a coagglutination test. *Mild Med.* 1980; 145: 256.
27. Kronvall GA. Rapid slide agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody. *J Med. Microbiol.* 1973; 6: 187.
28. Olsen P, Danielsson D, Kjellander J. The use of protein A containing staphylococci sensitized with anti meningococcal antibodies for grouping *Neisseria meningitidis* and demonstration of meningococcal antigen in cerebrospinal fluid. *Act Pathol Microbiol Scand Sect B* 1975; 83: 387.
29. Danielson ST, Kronvall G. Slide agglutination method for the serological identification of *Neisseria gonorrhoeae* with antigenococcal, antibodies adsorbed to protein A. containing staphylococci. *Appl Microbiol.* 1974; 27: 368.
30. Helstad GA, Bruns KM. Rapid Laboratory Identification of *Neisseria gonorrhoeae* by coagglutination. *J Clin Microbiol.* 1980; 11: 753.
31. Lewis JS, Martin JE. Evaluation of the Phadebact Gonococcus test a coagglutination procedure for confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 1980; 11: 153.
32. Juhlin I, Winblad S. Sero-typing of mycobacteria by a new technique using antibody globulin adsorbed to staphylococcal protein A. *Act Pathol Microbiol. Scand Sect B* 1973; 81: 179.
33. Maccani J. Rapid presumptive identification of *Cryptococcus neoformans* by staphylococcal coagglutination. *J Clin Microbiol.* 1981; 13: 828.
34. Szilagyí G, Mayer E, Eidelman AI. Rapid isolation and identification of group B, streptococci from selective broth medium by slide coagglutination test. *J Clin Microbiol.* 1978; 8: 410.
35. Brill J, Wasilauskas E. Adaptation of the staphylococcal coagglutination technique for detection of heat labile enterotoxin of *Escherichia coli* *J Clin Microbiol.* 1979; 9: 49.
36. Steibuch M, Audrnan. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. 1969. *Arch Biochem Biophys.* 134: 279.
37. Hudson L, Hay FC. *Inmunología Práctica.* 1979. Editorial JIMS. Barcelona. 130, 135 p.