



INFORME BREVE

Desarrollo de un medio simple para el aislamiento selectivo de bacterias del grupo *Streptococcus anginosus*

Elena M. Berardinelli^{a,b,*} y Horacio A. Lopardo^{b,c}

^a Hospital General de Agudos Dr. Abel Zubizarreta, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^b Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^c Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

Recibido el 12 de mayo de 2020; aceptado el 10 de diciembre de 2020

Disponible en Internet el 2 de marzo de 2021

PALABRAS CLAVE

Grupo *Streptococcus anginosus*;
Medio selectivo;
Fibrosis quística

KEYWORDS

Streptococcus anginosus group;
Selective medium;
Cystic fibrosis

Resumen Las bacterias del grupo *Streptococcus anginosus* (GSA) han sido reconocidas recientemente como contribuyentes de la enfermedad broncopulmonar en la fibrosis quística (FQ). La detección y la cuantificación de rutina están limitadas por los protocolos actuales de microbiología de la FQ. Se describe el desarrollo del medio cromogénico CHROMagar™ StrepB modificado por el agregado de plasma, ácido nalidíxico, colistina y sulfadiazina para hacerlo selectivo para bacterias del GSA. Este medio podría ser utilizado como una herramienta de diagnóstico para detectar GSA en muestras respiratorias de pacientes con trastornos pulmonares crónicos.

© 2021 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Development of a simple medium for the selective isolation of bacteria belonging to the *Streptococcus anginosus* group

Abstract Bacteria of the *Streptococcus anginosus* group (SAG) have recently been recognized as contributors of bronchopulmonary disease in cystic fibrosis (CF). Routine detection and quantification are limited by current CF microbiology protocols. The development of the CHROMagar™ StrepB chromogenic medium modified by the addition of plasma, nalidixic acid, colistin and sulfadiazine to make it selective for SAG bacteria is described. This medium could be used as a diagnostic tool to detect SAG in respiratory samples from patients suffering from chronic lung disease.

© 2021 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: eleberardinelli@hotmail.com (E.M. Berardinelli).

Las infecciones respiratorias en pacientes con trastornos pulmonares crónicos son una causa frecuente e importante de morbilidad. En pacientes con fibrosis quística (FQ) los episodios inflamatorios intermitentes recurrentes o las exacerbaciones pulmonares contribuyen a la disminución progresiva de la función pulmonar, que es característica de esta enfermedad^{3,5,6,10}.

Las vías respiratorias de pacientes con FQ albergan comunidades polimicrobianas complejas que incluyen muchas bacterias orales⁸. Entre los desencadenantes de las exacerbaciones pulmonares cada vez son más reconocidos como importantes los cambios en la microbiota comensal y colonizante⁴. Sin embargo, es escaso el conocimiento sobre la naturaleza y los resultados de estas interacciones y su importancia para la estabilidad del paciente o la progresión de la enfermedad⁹.

En la FQ se ha destacado el papel potencial de comensales orofaríngeos, como los estreptococos del grupo *Streptococcus anginosus* (GSA). Estos se consideran parte de la microbiota comensal normal en humanos y se los suele aislar de la cavidad oral, de la orofaringe y del tracto gastrointestinal y genitourinario. Sin embargo, estas bacterias poseen el potencial de causar una variedad de infecciones, tanto en los hospedadores humanos como en los animales. Los miembros del GSA suelen formar abscesos y causar infecciones piógenas invasivas, que incluyen infecciones de cabeza y cuello, abscesos cerebrales, infecciones intratorácicas e intraabdominales. Dentro de este grupo se describen tres especies: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius* y *Streptococcus constellatus*. En la literatura médica, estos microorganismos se asocian a ciertas localizaciones: *S. intermedius* a infecciones del sistema nervioso central e hígado, *S. constellatus* a infecciones pulmonares u otras localizaciones y *S. anginosus* a bacteriemia, colonización del tracto gastrointestinal e infecciones genitourinarias y de tejidos blandos. Estas caracterizaciones no han estado exentas de discrepancia, al igual que el rol patógeno de este grupo en distintos cuadros clínicos².

Se ha demostrado que los estreptococos del GSA proliferan dentro del pulmón antes del inicio y durante las exacerbaciones pulmonares⁹. Además, se ha observado una mejor respuesta a la terapia antimicrobiana cuando se han utilizado los agentes dirigidos al GSA en lugar de aquellos dirigidos a los patógenos tradicionalmente reconocidos, como *Pseudomonas aeruginosa*, para tratar las exacerbaciones pulmonares^{6,8}.

Las pautas recomendadas para el estudio microbiológico de la FQ han sido desarrolladas para el aislamiento específico de gérmenes colonizantes/infecciosos asociados a las exacerbaciones pulmonares, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, complejo *Burkholderia cepacia* y, recientemente, *Aspergillus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* y *Achromobacter xylosoxidans*⁷.

Los GSA están subrepresentados en los medios sólidos recomendados para el diagnóstico microbiológico de los eventos respiratorios de pacientes con FQ. Además, las colonias de los miembros del GSA son fenotípicamente indistinguibles de las de otros estreptococos, tradicionalmente considerados con un potencial patogénico bajo o nulo. El reconocimiento de los GSA en la fisiopatología de las exacerbaciones pulmonares y la enfermedad pulmonar crónica resalta la necesidad de contar con métodos efectivos para

el aislamiento, la cuantificación y la identificación de rutina de estos agentes.

Para superar esta limitación, hemos desarrollado un medio cromogénico selectivo, en parte basado en la composición del agar McKay⁷. Se trata de un medio diferencial para el aislamiento de cepas de GSA que incluye ácido nalidíxico, colistina y sulfadiazina.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño de dicho medio para permitir el aislamiento de las bacterias del GSA de manera selectiva respecto de otros estreptococos comensales e inhibir el desarrollo de los patógenos habitualmente aislados en muestras respiratorias de pacientes con FQ.

Este medio podría ser utilizado como una herramienta diagnóstica para detectar bacterias del GSA en las muestras respiratorias de pacientes con trastornos pulmonares crónicos. Además, nos permitirá evaluar en el futuro la importancia del rol de los microorganismos del GSA en las exacerbaciones pulmonares de pacientes con FQ, mediante la comparación semicuantitativa de su aislamiento en muestras de esputos de pacientes colonizados y de pacientes con exacerbaciones agudas.

Se preparó un agar cromogénico comercial para el aislamiento de *Streptococcus agalactiae*, según recomendaciones del fabricante (CHROMagar™ StrepB): 44,7 g por litro de agua destilada (sin el agregado de los suplementos provistos por el fabricante). Se esterilizó a 121 °C durante 15 min. El medio esterilizado fue fraccionado en tres partes: a una parte solo se le suplementó plasma inactivado (56 °C 15 min) (CROSGANG); a otra parte se le adicionó plasma inactivado y soluciones de antibióticos: sulfadiazina (16 mg/ml en NaOH 0,1 M), sulfato de colistina (1 mg/ml en agua destilada) y ácido nalidíxico (0,5 mg/ml en NaOH 0,1 M) a concentraciones finales de 500, 10 y 5 µg/ml, respectivamente (CROSGANG-ATB), y la tercera fracción se mantuvo sin agregados.

Para evaluar el desempeño del medio se emplearon distintas bacterias aisladas de esputos de pacientes con FQ.

- Bacterias gram negativas: *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus parainfluenzae*; enterobacterias (EB): *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus* spp.; bacilos gram negativos no fermentadores (BNNF): *P. aeruginosa*, complejo *B. cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Acinetobacter baumannii* y *S. maltophilia*.
- Bacterias gram positivas: *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, estreptococos del grupo viridans (EGV): *S. constellatus*, *S. anginosus*, *S. intermedius*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus mitis/oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius*; *Streptococcus pneumoniae*; y estreptococos β-hemolíticos (EBH): *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Las bacterias fueron identificadas por el sistema automatizado VITEK® 2 Compact y por espectrometría de masas VITEK® MS (bioMérieux)¹.

Las bacterias se cultivaron e incubaron a 37 °C por 24 h en atmósfera normal, excepto EGV, *S. pneumoniae* y *Haemop-*

hilus spp., que se incubaron en atmósfera con 5% de CO₂. Luego se subcultivaron en las tres fracciones del medio cromogénico: sin suplementos, CROSGANG y CROSGANG-ATB. Para corroborar el crecimiento positivo de las bacterias, se las subcultivó paralelamente en agar sangre (AS) y en agar chocolate (ACH) (*H. influenzae* y *H. parainfluenzae*). Se incubaron a 37 °C por 24 h, en atmósfera normal, con excepción de EGV, *S. pneumoniae* y *Haemophilus* spp., las que fueron incubadas en atmósfera con 5% de CO₂.

Tanto en los medios de control de crecimiento como en el agar cromogénico sin suplementos crecieron todos los aislamientos estudiados, con excepción de *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* y *S. pneumoniae*, que no desarrollaron en el medio cromogénico.

Los aislamientos de bacilos gram negativos, con excepción de *Burkholderia* spp. y *M. catarrhalis*, presentaron un crecimiento masivo, al igual que *S. aureus* y *Enterococcus* spp.; los aislamientos de EGV y EBH crecieron de manera tenue, casi imperceptible, en el medio cromogénico. Los colores de las colonias variaron: fue azul intenso en *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. aerogenes*, *M. catarrhalis* y *Enterococcus* spp.; verde en *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*; blanco en *Burkholderia* spp., *A. baumannii* y *S. aureus*; y celeste muy tenue en *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*, *S. salivarius*, *S. mitis/oralis*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. infantarius*, *S. gordonii*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Para salvar el inconveniente del magro desarrollo de los estreptococos, se adicionó al medio cromogénico 10% de plasma inactivado a 56 °C. Al medio se lo llamó CROSGANG.

En CROSGANG no creció *Haemophilus* spp., pero sí lo hicieron todos los otros aislamientos estudiados, incluidos los de *S. pneumoniae*. Los aislamientos de EB, BNNF (con excepción de *Burkholderia* spp.) y *M. catarrhalis* volvieron a presentar un crecimiento masivo, al igual que *S. aureus* y *Enterococcus* spp. Los aislamientos de EGV y de EBH mostraron un crecimiento más perceptible con el agregado del plasma. Las colonias de EGV presentaron colores que permitieron diferenciar los distintos grupos; estos variaron entre azul, celeste y verde claro. Los EBH se diferenciaron por el color blanco de las colonias. Los integrantes del grupo GSA presentaron colonias de distintos colores: las de *S. anginosus* y *S. constellatus* fueron color verde claro y las de *S. intermedius* color azul, pero no se diferenciaron de las de otros aislamientos de EGV, que exhibieron colores similares.

Para seleccionar los GSA e inhibir el desarrollo de las otras bacterias, al agar cromogénico con plasma se agregaron las soluciones de los antibióticos sulfadiazina, sulfato de colistina y ácido nalidíxico (CROSGANG-ATB).

Se realizaron suspensiones en solución salina estéril de los aislamientos (aproximadamente 10⁴ UFC/ml). Se sembraron 5 µl de estas suspensiones en CROSGANG, CROSGANG-ATB y en AS/ACH. Los resultados se muestran en la [tabla 1](#).

El medio CROSGANG-ATB presenta una serie de ventajas con respecto a otros medios selectivos descritos para el aislamiento de GSA, como el agar McKay y el NAS (agar sangre adicionado de ácido nalidíxico y sulfametazina)⁹.

El agar McKay es un medio de preparación engorrosa al que se le adicionan los antibióticos colistina y ácido oxolínico para inhibir el crecimiento de los principales patógenos de la FQ y se complementa con sulfadiazina, para seleccionar las bacterias del GSA respecto de la mayor parte de otros EGV. El púrpura de bromocresol se incluye como un indicador de pH colorimétrico para identificar los aislamientos que producen un ambiente ácido en este medio, una característica distintiva adicional de las colonias GSA. Si bien los GSA son los microorganismos más abundantes detectados por el agar McKay, se recuperan también al menos 18 especies diferentes de otros grupos de EGV. El 70% de EGV tienen la capacidad de virar el indicador de pH en agar McKay de púrpura a amarillo. Por lo tanto, el cambio de color no es específico para GSA. Por todo esto, el agar McKay requiere numerosas pruebas de confirmación para verificar la identidad de los GSA. Además, no inhibe el crecimiento de un pequeño número de patógenos de la FQ, como *S. aureus* y otros miembros de la microbiota orofaríngea⁶. A diferencia de este medio, el CROSGANG-ATB es un medio cromogénico que permite diferenciar a las bacterias del GSA por el color característico de sus colonias, verde claro en el caso de *S. anginosus* y de *S. constellatus* y azul en el de *S. intermedius*. Solo estas últimas colonias deberían ser identificadas para su confirmación, dado que, como se expuso anteriormente, los enterococos, *S. mitis/oralis* y *S. infantarius* crecen formando colonias azules. De todos modos, tanto los enterococos como *S. infantarius* solo excepcionalmente se encuentran en secreciones respiratorias de pacientes con FQ.

Waite et al.¹⁰ describieron un medio semiselectivo para el aislamiento anaeróbico de estreptococos del GSA, que consiste en un agar sangre adicionado de ácido nalidíxico y sulfametazina (NAS). Todos los aislamientos de GSA crecieron en NAS en atmósfera anaeróbica y con 5% de CO₂ incubados durante 72 h. Otros EGV que crecieron en este medio, como *Streptococcus mutans*, se pueden diferenciar de GSA por la morfología colonial distintiva. La ventaja de CROSGANG-ATB con respecto al medio NAS es que a las 24–48 h de incubación crecen las colonias típicas de GSA, que se pueden diferenciar de otros EGV por su color característico.

De acuerdo a los resultados obtenidos, observamos que CROSGANG-ATB inhibe a la mayoría de EGV y a otros comensales de la orofaringe, así como también a patógenos habituales de FQ.

Si bien no se ha podido inhibir a los enterococos, a *S. mitis/oralis* ni a *S. infantarius*, que dan colonias azules (al igual que *S. intermedius*) y estas deberían ser subcultivadas para su posterior identificación, pueden ser diferenciadas de las colonias verdes de *S. anginosus* y *S. constellatus*. En suma, consideramos que obtuvimos un medio cromogénico semiselectivo y diferencial que permite reconocer a las tres especies de GSA. Creemos que el cultivo en CROSGANG-ATB podría representar una importante herramienta de diagnóstico adicional a los protocolos de microbiología de la FQ, y los microbiólogos clínicos podrían utilizarlo para monitorear la participación de GSA en la enfermedad respiratoria y para investigar la dinámica microbiana de las infecciones en los pacientes con trastornos pulmonares crónicos, mediante la comparación semicuantitativa de su aislamiento en mues-

Tabla 1 Crecimiento de los aislamientos en CROSGANG, CROSGANG-ATB y en agar sangre y/o agar chocolate (AS/ACH)

Bacterias	N° de cepas	AS/ACH (control de crecimiento)	CROSGANG	CROSGANG-ATB
Enterobacterias ^a	24	(+) ^b	(+) azul o blanca	(-) ^b
BNNF ^c	24	(+)	(+) verde o blanca	(-)
<i>M. catarrhalis</i>	6	(+)	(+) azul	(-)
<i>Haemophilus</i> spp. ^d	8	(+)	(-)	(-)
<i>S. aureus</i>	8	(+)	(+) blanca	(-)
<i>Enterococcus</i> spp.	6	(+)	(+) azul	(+) azul
<i>S. pneumoniae</i>	3	(+)	(+) celeste	(-)
<i>S. anginosus</i>	6	(+)	(+) verde clara	(+) verde clara
<i>S. constellatus</i>	4	(+)	(+) verde clara	(+) verde clara
<i>S. intermedius</i>	2	(+)	(+) azul	(+) azul
<i>S. salivarius</i>	4	(+)	(+) azul	(-)
<i>S. mitis/oralis</i>	4	(+)	(+) azul	(+) azul
<i>S. sanguinis</i>	4	(+)	(+) verde clara	(-)
<i>S. parasanguinis</i>	2	(+)	(+) verde clara	(-)
<i>S. infantarius</i>	4	(+)	(+) azul	(+) azul
<i>S. gordonii</i>	2	(+)	(+) verde	(-)
EBH ^e	16	(+)	(+) blanca	(+) blanca

^a Enterobacterias: *E. coli* (8), *K. pneumoniae* (6), *Enterobacter* spp. (5), *Proteus* spp. (5).

^b (+) crecimiento; (-) sin crecimiento.

^c BNNF: *P. aeruginosa* (8), *S. maltophilia* (4), *A. baumannii* (6), complejo *B. cepacia* (4), *B. vietnamiensis* (2).

^d *Haemophilus* spp: *H. influenzae* (6), *H. parainfluenzae* (2).

^e EBH (estreptococos beta-hemolíticos): *S. pyogenes* (6), *S. agalactiae* (6), *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (4).

tras de esputos de pacientes colonizados y de pacientes con exacerbaciones agudas.

Financiación

La presente investigación no ha recibido ayudas específicas provenientes de agencias del sector público, sector comercial o entidades sin ánimo de lucro.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Arinto-Garcia R, Pinho MD, Carriço JA, Melo-Cristino J, Ramirez M. Comparing matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and phenotypic and molecular methods for identification of species within the *Streptococcus anginosus* group. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3580–8.
- Caro DG, Riedel KI, García CP. Caracterización clínica y microbiológica de las infecciones causadas por *Streptococcus* grupo *anginosus*. *Rev Chil Infect*. 2004;21:254–60.
- Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol*. 2003;50:1477–91.
- Filkins LM, Hampton TH, Gifford AH, Gross MJ, Hogan DA, Sogin ML, et al. Prevalence of streptococci and increased polymicrobial diversity associated with cystic fibrosis patient stability. *J Bacteriol*. 2012;194:4709–17.
- Grimwood K. Airway microbiology and host defences in paediatric non-CF bronchiectasis. *Paediatr Respir Rev*. 2011;12:111–8.
- Mojon P. Oral health and respiratory infection. *J Can Dent Assoc*. 2002;68:340–5.
- Sibley CD, Grinwis ME, Field TR, Parkins MD, Norgaard JC, Gregson DB, Rabin HR, Surette MG. McKay agar enables routine quantification the *Streptococcus milleri* group in cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol*. 2010;59:534–40.
- Sibley CD, Parkins MD, Duan K, Norgaard JC, Rabin HR, Surette MG. A polymicrobial perspective of pulmonary exacerbations exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15070–5.
- Waite RD, Qureshi MR, Whitley RA. Modulation of behaviour and virulence of a high alginate expressing *Pseudomonas aeruginosa* strain from cystic fibrosis by oral commensal bacterium *Streptococcus anginosus*. *Plos One*. 2017;12:e0176577.
- Waite RD, Wareham DW, Gardiner S, Whitley RA. A simple, semiselective medium for anaerobic isolation of *Streptococcus anginosus* group from patients with chronic lung disease. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1430–2.