

Nº 41
261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETECCION DE PORTADORES FARINGEOS
DE ENTEROBACTERIAS Y *Pseudomonas*
aeruginosa



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A:
PATRICIA DOMINGUEZ TAYLOR



México, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	2
GENERALIDADES ACERCA DE LAS ENTEROBACTERIAS Y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
I Taxonomía	3
ii. Características microscópicas	4
iii. Propiedades culturales	5
iv. Pruebas de identificación	10
v. Importancia clínica	17
PARTE EXPERIMENTAL	
i. Equipo, material reactivos y medios de cultivo	25
ii Metodología	26
iii. Resultados	27
iv. Discusión	34
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFIA	40

INTRODUCCION

En la actualidad, se considera que *P. aeruginosa* y varias enterobacterias figuran entre los más importantes agentes etiológicos de enfermedades infecciosas, independientemente de que continúa reconociéndose que buena parte de estos microorganismos desempeñan una incuestionable función benéfica a nivel del intestino humano.

Con base en lo anterior, algunas de las patologías asociadas a estas bacterias representan ejemplos clásicos de oportunismo, dado que se presentan cuando, por alguna razón, la colonización ocurre en otras regiones anatómicas; tal es el caso de las infecciones urinarias, cuyos responsables más importantes son *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus sp.*, o de la septicemia, en la que destacan las mismas especies, además de *P. aeruginosa*.

Cabe señalar que, en las entidades clínicas mencionadas, estos microorganismos suelen provenir del tracto gastrointestinal del individuo afectado; sin embargo, en las zonas geográficas en las que se practica el fecalismo al aire libre, la vía inhalatoria incorpora a numerosos hospedadores -nuevos-, quienes simplemente se transforman en portadores faríngeos de estas bacterias o bien, cuando se trata de personas inmunocomprometidas, adquieren padecimientos del tracto respiratorio

superior y/o inferior.

En este sentido, la detección de enterobacterias y/o de *P. aeruginosa* en las expectoraciones y exudados faríngeos, suelen provocar que el químico se enfrente a la disyuntiva de acreditarles la responsabilidad del cuadro a estas bacterias o, como sucede cuando aísla a los miembros de la flora habitual, ignorar su detección al elaborar el reporte correspondiente.

El presente trabajo pretende establecer la regularidad con la que dichos microorganismos forman parte de la flora faríngea en nuestro medio puesto que, con esta información, el laboratorio podría contar con más elementos de juicio para interpretar sus resultados, cada vez que detecte su presencia en las muestras que provienen de la faringe y en las que guardan alguna relación cercana con esta región anatómica.

OBJETIVO

Establecer la frecuencia con la que las enterobacterias y *P. aeruginosa* colonizan la faringe de las personas sanas que habitan en la Ciudad de México, considerando parámetros epidemiológicos tales como el sexo, tabaquismo, zona de residencia y susceptibilidad a la adquisición de cuadros patológicos en las vías respiratorias altas.

I. GENERALIDADES SOBRE LAS ENTEROBACTERIAS Y

Pseudomonas aeruginosa

i. Taxonomía

Las enterobacterias pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, cuyos principales géneros son: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* y *Serratia*. Adicionalmente, las especies de mayor relevancia en el humano son *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei* y *Serratia marcescens* (1).

El nombre de la familia mencionada proviene del latín Enterobacterium, que significa bacteria intestinal (2), aunque aquella solo agrupa a los bacilos Gram negativos cuya característica común más trascendente es su contenido guanina + citocina (G/C) en el DNA, y que varía entre 38 y 60 moles %

Dentro de cada género, las distintas especies solo difieren en 10 a 20 moles % de G/C, aunque existen algunas que, debiendo pertenecer a un mismo género, actualmente se encuentran clasificadas dentro de otro; tal es el caso de *Morganella morganii*, la cual anteriormente se denominaba *Proteus morganii*. Cabe señalar que estas situaciones son posibles hoy en

día, dado que desde hace apenas algunos años, el concepto taxonómico se fundamenta en nuevas técnicas como las de hibridación, las cuales incuestionablemente resultan más específicas (1, 4).

Por otra parte, la familia Enterobacteriaceae se encuentra extensamente distribuida, tanto en las plantas, el suelo y el medio ambiente, como en la flora habitual del humano, formando parte de los microorganismos que colonizan las mucosas en condiciones de salud (1, 2) y, aunque durante mucho tiempo se pensó que no manifestaba actividad de fosfatasa, lo cierto es que recientemente se detectó que la mayoría de sus miembros presenta esta característica (5).

Por lo que respecta a *Pseudomonas aeruginosa*, esta especie pertenece a la familia Pseudomonadaceae, la cual se integra por los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Frateria* y *Zoogloea* (3).

Dicha especie tiene un contenido G/C de 67.2 moles %, su habitat es muy variado y, aunque se considera saprofita -porque actúa sobre numerosos compuestos orgánicos-, es reconocida como una de los principales oportunistas en el humano y los animales (2, 3).

ii. Características microscópicas

Las enterobacterias y *P. aeruginosa* son bacilos rectos Gram negativos que miden 0.5 a 3 μ de ancho por 1.5 a 6 μ de largo, generalmente móviles (con

excepción de *Klebsiella*, *Shigella* y algunas cepas de *E. coli*), no esporulados y solo *Klebsiella*, *Enterobacter* y en ocasiones *E. coli* presentan cápsula (3, 4).

Cabe señalar que su movilidad la deben a la presencia de flagelos peritricos, exceptuando a *P. aeruginosa* que los posee polares (3, 4).

iii. Propiedades culturales

Aunque todos los microorganismos que constituyen el objeto de este trabajo son organotróficos, las enterobacterias degradan los carbohidratos mediante fermentación y *P. aeruginosa* lo hace vía oxidación. De cualquier manera, dependiendo de la composición de los medios en los que se les cultiva, la disminución del pH es el fenómeno que revela la utilización de los azúcares durante el crecimiento de cualquiera de estas bacterias (1, 3).

Medios de cultivo

La totalidad de los bacilos estudiados presenta requerimientos nutricionales similares: es decir, no son exigentes y pueden desarrollar hasta en los medios mínimos tales como la gelosa y el caldo nutritivo, si bien generalmente se les cultiva en medios que favorecen su crecimiento, al tiempo de que proporcionan mayor información sobre su presencia (6).

Dichos medios se consideran selectivos, porque inhiben eficazmente el desarrollo de numerosas bacterias Gram positivas, aunque también se clasifican como diferenciales, merced a que en ellos se puede observar si

los microorganismos fermentan o no la lactosa (6, 7).

En este sentido, los bacilos contemplados en el presente trabajo se dividen de la siguiente manera:

Lactosa positiva: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*.

Lactosa negativa: *Pseudomonas*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*,
Salmonella y *Shigella*.

Cabe señalar que, de acuerdo a su grado de selectividad, los medios a los que se hace referencia se clasifican en alguno de los 3 grupos siguientes:

- a. Ligeramente selectivos: el agar desoxicolato lactosa (ADL), EMB, Endo y Mac Conkey (McC).
- b. Moderadamente selectivos: el agar desoxicolato citrato lactosa sacarosa (DCLS), SS y XLD.
- c. Altamente selectivos: el agar sulfito de bismuto (ASB) y el verde brillante (VB).

Aparte de sus inhibidores, los medios mencionados contienen peptonas, lactosa (o adicionalmente otro carbohidrato fermentable solo por los microorganismos lactosa positiva) y un indicador que virará de acuerdo al

pH asociado a la capacidad -o incapacidad- que presenta(n) la(s) bacteria(s) cuyo desarrollo sustentan; en este sentido, previa incubación de 24 h, las lactosa positiva habrán generado acidez, mientras que las lactosa negativa -al no haber podido emplear los carbohidratos presentes- producirán alcalinidad, derivada de la utilización de las peptonas para obtener su fuente de carbono. Además, algunos medios contienen tiosulfato sódico y sales ferrosas para detectar síntesis de ácido sulfhídrico, e inclusive, algún inhibidor de swarming (crecimiento en enjambre), para impedir que el género *Proteus* -en caso de estar presente en la muestra- contamine las colonias "aisladas" del resto de los bacilos que hayan desarrollado (8, 9).

Tabla 1. Características de los principales medios de cultivos diferenciales/selectivos, empleados para realizar el aislamiento de las enterobacterias y *P. aeruginosa* (9, 10).

MEDIO DE CULTIVO	INDICADOR	DETECCION DE AC. SULFURICO	INHIBICION DE SWARMING
Endo	fucsina	NO	NO
EMB	eosina	NO	NO
Mac Conkey	rojo neutro	NO	NO
Tergitol 7	Azul de bromo timol	NO	SI
Agar DLS	rojo neutro	NO	+/-
Agar DCLS	rojo neutro	NO	+/-
Agar SS	rojo neutro	SI	SI
Agar XLD	rojo de fenol	SI	+/-
Agar VB	rojo de fenol	NO	NO
Agar SB	-----	SI	+/-
Agar HK	Azul de bromotimol	NO	NO

claves:

- DLS = desoxicolato lactosa sacarosa
 DCLS = desoxicolato citrato lactosa sacarosa
 SS = Salmonella-Shigella
 XLD = xilosa-lisina-desoxicolato
 VB = verde brillante
 SB = sulfito de bismuto
 HK = Hecktoen entérico
 EMB = Eosina-azul de metileno
 +/- = variable, dependiendo de cada cepa.

Tabla 2. Comportamiento de los indicadores presentes en los diferentes medios de cultivo incluidos en la Tabla 1 (9).

INDICADOR	COLORACION A pH ACIDO	COLORACION A pH NEUTRO	COLORACION A pH ALCALINO
Fucsina	rojo magenta	rojo magenta	rosa claro
Eosina	vino oscuro	vino oscuro	vino claro
Rojo neutro	rojo intenso	rosa claro	amarillo
Azul de bromo timol	amarillo	verde	azul
Rojo de fenol	amarillo	rojo	rojo intenso o lila

Los medios incluidos en la tabla 1 presentan un pH neutro antes de la incubación correspondiente.

Condiciones de incubación

Dado que las enterobacterias son facultativas y *P. aeruginosa* es aerobia estricta, los cultivos en los que se sospecha su presencia deben incubarse en las condiciones clásicas de aerobiosis (6, 7).

Además, por el hecho de que todas estas bacterias son mesófilas, su

temperatura óptima de incubación es de 35°C resultando suficientes 24 h para el desarrollo de colonias visibles (4, 6, 7).

Morfología macroscópica

Esta depende en gran medida del medio de cultivo y de cada género, si bien la gran mayoría de estos microorganismos produce colonias circulares de 3 a 5 mm de diámetro, convexas, blancas o grisáceas, de bordes regulares, consistencia butirácea y aspecto húmedo. No obstante, debe considerarse que *Klebsiella* y *Enterobacter* generalmente dan lugar a colonias grandes y mucoides de desarrollo confluyente -debido a sus grandes cápsulas-, que *Serratia marcescens* puede producir un pigmento no hidrosoluble de color rosa intenso -característica constante en las cepas que no son patógenas para el humano-, que *Proteus* sp suele originar swarming (crecimiento en enjambre) y que solo *P. aeruginosa* y algunas cepas de *E. coli* manifiestan capacidad hemolítica (2, 8).

Adicionalmente, *P. aeruginosa* libera con regularidad pigmentos hidrosolubles, destacando uno de color azul-verdoso al que se le denomina plicianina, mismo que solo se observa con claridad en los medios que no presentan una coloración asociada a indicadores (1, 3, 6, 7).

iv. Pruebas de Identificación

Aunque existen numerosas pruebas para llevar a cabo la identificación de estas bacterias, prácticamente cada laboratorio selecciona las que

considera más confiables, tomando en cuenta también los costos y su disponibilidad. En general, los medios implicados suelen contener diferentes fuentes de carbón y algún revelador que permite poner de manifiesto el tipo de enzimas producido por cada microorganismo, obteniéndose finalmente un patrón de resultados que conduce a su detección (2, 4, 6, 7).

En otras palabras, dichas pruebas bioquímicas suelen diferenciar al género y, ocasionalmente, a la especie aislada, con base en su capacidad "específica" para utilizar o no los sustratos involucrados (4, 6).

Aunque es muy conveniente comparar la totalidad de los resultados con tablas elaboradas después de numerosos estudios experimentales (consultar la tabla 3), algunas pruebas representan verdaderos indicadores sobre la identidad de cada bacilo Gram negativo. Por ejemplo, entre los lactosa positiva, solo *E. coli* convierte al triptofano en indol y *C. freundii* es el único H₂S positivo; de la misma manera, las colonias grandes y mucoides de desarrollo confluyente únicamente se asocian a *Klebsiella* y *Enterobacter*, por lo cual la movilidad -que en la primera es negativa y en la segunda positiva- suele ser suficiente para diferenciarlas. Finalmente, con respecto a los lactosa negativa, la mayoría de las cepas de *Salmonella* sp es H₂S positivo, tal como sucede con *Proteus*, pero ambos géneros difieren en cuanto a la ureasa, la cual es positiva para este último; por su parte, *Shigella* sp es inmóvil y *P. aeruginosa* alcaliniza los medios en los que se determina fermentación de carbohidratos, desarrollando en forma de película en las formulas líquidas (10).

Tabla 3. Resultados de las principales pruebas bioquímicas asociadas a la identificación de *P. aeruginosa* y las enterobacterias de mayor trascendencia para el humano (6, 8).

MICROORGANISMO	GLU	LAC	MAN	SAC	SUL	GAS	CIT	IND	MOV	UR
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	V	-	+	V
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>E. aerogenes</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>P. mirabilis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
<i>P. vulgaris</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>M. morgani</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. marcescens</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>Salmonella sp.</i>	+	-	+	-	+	V	V	-	+	-
<i>Shigella sp.</i>	+	-	+	-	-	-	V	V	-	-

CLAVES: GLU = GLUCOSA, LAC = LACTOSA, MAN = MANITOL, SAC = SACAROSA, SUL = AC. SULFHIDRICO, CIT = CITRATO, IND = INDOL, MOV = MOVILIDAD, UR = UREASA, V = VARIABLE.

Las pruebas bioquímicas elegidas en este trabajo se mencionan a continuación, describiendo brevemente sus respectivos fundamentos (6, 7):

Pruebas efectuadas en el agar hierro de Kligler

En este medio es posible determinar si los microorganismos fermentan o no glucosa y lactosa, así como su capacidad para producir gas ($H_2 + CO_2$) y/o ácido sulfhídrico. El fundamento correspondiente se asocia al hecho de que dicho medio se encuentra inclinado en "pico de flauta" y contiene peptonas, 1% de lactosa, 0.1% de glucosa y trazas de rojo de fenol, así como tiosulfato sódico y sales de hierro; la bacteria analizada se siembra por estría ondulada sobre el "pico de flauta" y por picadura en el fondo del tubo, procediéndose a incubar durante 24h a 35 °C, para realizar las lecturas correspondientes (10, 11).

Los resultados pueden ser los siguientes:

- 1) Glucosa positiva y lactosa positiva, cuando todo el medio de cultivo manifiesta coloración amarilla.
- 2) Glucosa positiva y lactosa negativa, cuando la porción inferior del medio es amarilla y la del "pico de flauta" aparece rojo intenso o lila.
- 3) Glucosa negativa y lactosa negativa, si todo el medio permanece rojo o esta coloración se intensifica, o inclusive, ocurre un vire a lila.

Cabe señalar que las coloraciones amarilla y roja intensa -o lila- de los 3 casos anteriores, se relacionan con el vire del rojo de fenol a pH ácido y alcalino, dependiendo de la fuente de carbón utilizada y de la concentración de esta última: un microorganismo glucosa positiva y lactosa negativa consumirá rápidamente la glucosa del "pico de flauta" originando inicialmente un pH ácido, pero a las 24 h se encontrará empleando las peptonas de esa porción y ésta manifestará alcalinidad -coloración roja intensa o lila-. Lo anterior no sucederá en el fondo del tubo, puesto que en ella existe mayor cantidad de glucosa y en ese lapso, la parte inferior continuará ácida (amarilla).

- 4) Producción de gas, cuando el agar manifiesta ruptura o se desplaza hacia la parte superior del tubo.

- 5) Síntesis de ácido sulfhídrico, cuando -independientemente de la coloración relacionada con el comportamiento del rojo de fenol- se observa un precipitado negro (11).

Capacidad para utilizar citrato

Esta prueba se realiza en el agar de Simmons cuya presentación es inclinada "en pico de flauta", y su contenido fundamental es: citrato como única fuente de carbón, fosfato dibásico de amonio como única fuente de nitrógeno e indicador azul de bromotimol.

La bacteria se siembra sobre la superficie del "pico de flauta" y el medio se incuba durante 24 h a 35 °C antes de realizar la lectura. La prueba se considera positiva si el indicador vira a azul -originalmente es verde- en la porción que circunda al desarrollo; el cambio se debe a la hidrólisis de la sal aminada -la cual reditúa hidróxido de amonio que alcaliniza el medio-, fenómeno que solo se presenta cuando el microorganismo es capaz de emplear el citrato. Es preciso recordar que las bacterias se procuran una fuente de nitrógeno, siempre y cuando dispongan de la de carbón (13).

Prueba de la manitolasa

El nombre de manitolasa se refiere a todo un conjunto o complejo de enzimas encargadas de llevar a cabo la transformación del manitol, un azúcar-alcohol, en fructosa 6-fosfato, con lo cual es posible incorporar al sustrato dentro del ciclo Embden-Meyerhoff, redituando ácidos orgánicos cuya presencia se puede detectar con base en el viraje de un indicador ácido-base (12).

El medio más utilizado para realizar esta prueba es el caldo manitol rojo de fenol, que contiene principalmente manitol, peptonas y rojo de fenol.

Previo incubación a 35°C durante 24 h, la lectura se efectúa considerando que la prueba es positiva cuando el indicador ha virado a amarillo o, en su defecto, negativa si dicha coloración es roja intenso o lila.

Pruebas de la ureasa y de fermentación de sacarosa

El medio utilizado en el presente trabajo fue el caldo sacarosa-urea, que contiene principalmente urea, sacarosa, rojo de fenol y azul de bromotimol.

En esta prueba, la urea es o no hidrolizada dependiendo de que el microorganismo produzca ureasa, la cual se considera una enzima constitutiva. En caso positivo, esta última catalizará la reacción produciéndose dióxido de carbono, amoníaco y agua y, con ello, se generará carbonato de amonio -cuyo pH es alcalino-. De esta manera, el viraje de los indicadores rojo de fenol y azul de bromotimol conferirán una coloración morada o lila al medio.

Por otra parte, si la bacteria posee capacidad para fermentar sacarosa -lo cual generalmente no sucede cuando produce ureasa-, los ácidos originados vía Embden-Meyerhof disminuirán el pH del medio, apareciendo una coloración amarilla.

Cabe señalar que, una vez que se ha llevado a cabo la inoculación correspondiente, la lectura se efectúa previo período de incubación de 24 h a 35°C.

En la actualidad existen métodos rápidos y precisos para identificar a las enterobacterias y *P. aeruginosa*, algunos de los cuales son: Autoscan-4 - para leer al sistema microscan-; ATB 32E semiautomatizado que dura 4

horas siendo un sistema similar al microscan, pero con más pruebas bioquímicas: y BACTEC Plus 26 -botellas de cultivo de sangre- (13, 14, 15)

v. Importancia clínica

Las enterobacterias y *P. aeruginosa* se encuentran formando parte de la flora habitual del humano en diversas regiones anatómicas, destacando la boca y la placa dentobacteriana, el tracto respiratorio superior, los genitales inferiores femeninos y, principalmente, el tracto intestinal (16, 17).

Por lo que se refiere a la faringe -que fué la región muestreada en el presente trabajo-, ésta corresponde a un conducto músculo-membranoso situado en posición vertical -por detrás de las fosas nasales y la boca-, que termina antes de la laringe y la tráquea. Su epitelio es cilíndrico pseudoestratificado, y se encuentra recubierto por numerosos vellos y cilios relacionados con la excreción del moco (18).

Las bacterias faríngeas de la flora habitual desempeñan varios papeles relevantes, entre los cuales figura el de impedir el libre establecimiento de microorganismos patógenos, a través de establecer con ellos una clara competencia por los sitios de unión, por los nutrimentos y, en el caso de las aerobias o facultativas, por el oxígeno, al margen de que existen algunas que también liberan sustancias antagónicas que pueden inhibir a los parásitos perjudiciales. Sin embargo, para que dicha función pueda cumplirse en forma efectiva, es necesario que la flora se encuentre en equilibrio, tanto con el hospedero como consigo misma; por dicha razón, debe ser numerosa y variada, pero sin que ocurra predominio de alguna(s)

de las especies en particular (19).

Entre las bacterias de la flora habitual de la faringe destacan: los estreptococos del grupo Viridans, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus* coagulasa negativa, varias especies de *Neisseria*, *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*, *Haemophilus haemolyticus*, *Veillonella* sp, corinebacterias no diftéricas y varias especies de enterobacterias, así como *P. aeruginosa*, aunque estas últimas solo aparecen de manera consistente en los individuos que habitan en los países en vías de desarrollo, dado que en éstos aún se practica con regularidad el fecalismo al aire libre. No obstante, también se pueden detectar especies patógenas que actúan como comensales en las personas portadoras, sobresaliendo los estreptococos B hemolíticos, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella* sp y *Neisseria meningitidis*.

Logicamente, la faringe y todo el tracto respiratorio superior contienen gran cantidad de microorganismos debido a que guardan un contacto muy estrecho con el medio ambiente; empero, la laringe, tráquea, bronquios y pulmones se caracterizan por ser órganos estériles, puesto que cuentan con diversos mecanismos que impiden el establecimiento de parásitos, destacando los asociados a las células macrológicas las cuales, sin embargo, son susceptibles a situaciones metabólicas tales como hipoxia, acidosis, etc. (18).

Algunos estudios han revelado que aproximadamente el 18 % de las

personas sanas contiene enterobacterias y/o a *P. aeruginosa* en la faringe y que, por lo tanto, la detección de estas bacterias en el sitio mencionado no siempre las acredita como responsables de los eventuales cuadros patológicos (21). De cualquier manera, está comprobado que el tracto respiratorio superior posee receptores para sus adhesinas, mismos que se bloquean fácilmente con manosa y se potencian en presencia de tripsina (20).

Por lo que respecta a la importancia clínica de estos microorganismos, se puede afirmar que tanto las enterobacterias como *P. aeruginosa* figuran entre los principales agentes causales de numerosos padecimientos humanos; la tabla 4 resume a los más frecuentes. Empero, por motivos obvios, es preciso subrayar a los que tienen su origen en la vía inhalatoria, si bien es preciso puntualizar que, en la mayoría de ellos, la participación de estas bacterias se limita a los individuos inmunocomprometidos; en este sentido, destacan la faringitis o faringoamigdalitis, la sinusitis -aguda o crónica-, otitis media, epiglotitis, laringitis, traqueítis, bronquitis, neumonía, septicemia, endocarditis, artritis purulenta y meningitis séptica; cabe mencionar que algunas de las entidades clínicas señaladas también pueden ocurrir -algunas de ellas con mayor frecuencia- cuando estos microorganismos penetran al hospedero por otras vías.

Tabla 4. Enfermedades más frecuentes ocasionadas por las principales enterobacterias y *P. aeruginosa* (1, 7, 17, 40, 41).

ESPECIE	ENFERMEDADES
<i>P. aeruginosa</i>	Infecciones intrahospitalarias, septicemia, meningitis, neumonía, fibrosis quística, ulceración de la córnea, infecciones urinarias en ancianos, colonización en quemaduras y en pacientes recién operados.
<i>E. coli</i>	Septicemia, infecciones urinarias, neumonía, meningitis, enteritis epidémica en lactantes, contaminación de heridas, etc.
<i>K. pneumoniae</i>	Septicemia, infecciones urinarias, neumonía, infecciones intrahospitalarias, contaminación de heridas, meningitis, etc.
<i>E. aerogenes</i>	Septicemia, infecciones urinarias, neumonía, infecciones intrahospitalarias, contaminación de heridas, meningitis, etc.
<i>C. freundii</i>	Infecciones urinarias, septicemia, contaminación de heridas, etc.,
<i>S. marcescens</i>	Infecciones intrahospitalarias, contaminación de heridas, infecciones urinarias, meningitis, etc.
<i>Proteus sp</i>	Infecciones urinarias, septicemia, oftalmías, otitis media, meningitis, neumonía, contaminación de heridas, etc.
<i>M. morgani</i>	Infecciones urinarias, septicemia, contaminación de heridas, etc.
<i>Salmonella sp</i>	Fiebres entéricas, gastroenteritis, septicemia, infecciones urinarias, etc.
<i>Shigella sp</i>	Disentería bacilar.

De cualquier manera, la colonización de la faringe por enterobacterias y/o *P. aeruginosa* puede representar el fenómeno desencadenante. En los casos de las afecciones respiratorias de los tractos superior -incluyendo al oído medio-, medio e inferior, las bacterias suelen llegar a partir de la faringe y/o la mucosa nasal, formando parte de las secreciones que, habiéndose generado en estos sitios, se desplazan verticalmente -hacia abajo- u obedeciendo a presiones negativas que se originan en senos paranasales u oído medio. Por su parte, la septicemia y sus consecuencias, tienen lugar cuando en el tracto respiratorio ocurre un proceso inflamatorio muy severo, cuyas placas hemorrágicas permiten el acceso de los microorganismos hacia el torrente circulatorio (22, 23).

Dentro de los hospitales, las enterobacterias y *P. aeruginosa* figuran entre las especies que persisten en el ambiente, el equipo, la ropa de cama y el personal, debido fundamentalmente a que destacan entre los contaminantes más resistentes a los antimicrobianos. Por tal motivo, en esos lugares representan -incluyendo a *Staphylococcus aureus*- los principales agentes etiológicos de infecciones post-quirúrgicas, contaminación de quemaduras y llagas, padecimientos respiratorios, septicemia e invasión de órganos internos (24, 25).

Mientras más tiempo permanezca el enfermo dentro del hospital, mayor es el predominio de *P. aeruginosa*, enterobacterias y *S. aureus* en su faringe; este fenómeno se potencia cuando el individuo es inmunodeprimido, e inclusive, son muy frecuentes los casos de bronquitis y neumonía por *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter* sp. Algunos

estudios mostraron que la faringe del 45 % de las personas hospitalizadas es colonizado por enterobacterias, ocurriendo dicha infección en el 22 % de ellas, durante el día de su ingreso a las instituciones (22, 25, 26). Incuestionablemente, la especie más importante dentro de los hospitales es *P. aeruginosa*, cuya frecuencia rebasa en dos veces la de las demás en los individuos intervenidos quirúrgicamente. Este microorganismo produce glicocálices, una capa limosa antifagocitaria, hemolisinas, proteasas, lipasa y exotoxinas que contribuyen a que los tejidos sean invadidos espectacularmente. En este contexto, el sistema broncopulmonar es uno de los más afectados y figura entre los que posteriormente actúan como focos metastásicos a partir de los cuales se origina la septicemia (27, 28).

En muchas ocasiones, el compromiso de los bronquios y pulmones también se presenta cuando el paciente ha recibido dosis importantes de antibióticos que eliminan a la flora habitual de la faringe, ya que ello favorece que los microorganismos multi-resistentes se reproduzcan a niveles predominantes (33). Se calcula que 2 de cada 3 decesos asociados a neumonía se deben a especies estudiadas en el presente trabajo (30, 31), sin considerar a los numerosos casos de fibrosis quística, en los cuales *P. aeruginosa* funge como el agente exacerbador de las manifestaciones graves (40, 41).

En otro orden de ideas, las enterobacterias colonizan la faringe del 59 % de las personas alcohólicas, aumentando el riesgo de que éstas padezcan una severa neumonía asociada al hallazgo de 100 UFC/ml en el esputo. Otros factores que promueven situaciones similares son el tabaquismo y las

enfermedades altamente debilitantes como la diabetes (29, 30).

En los pacientes con leucemia aguda, la flora faríngea también se ve alterada hasta el grado de que, dependiendo de la gravedad del padecimiento, los únicos microorganismos que se encuentran en ese sitio son las enterobacterias, *P. aeruginosa* y algunas especies de hongos contaminantes. Las neumonías resultantes en estos casos, suelen deberse a *P. aeruginosa* y/o *Enterobacter*, principalmente (31, 32).

En resumen, son muy diversos los factores que predisponen a que las personas adquieran neumonías graves por enterobacterias y/o *P. aeruginosa*. Sin embargo, llama la atención el hecho de que esta entidad se encuentre alcanzando mayores incidencias dentro de las grandes ciudades, por efecto de los humos industriales y la contaminación ambiental en general. Logicamente, ello se debe a 2 razones fundamentales: la colonización del tracto respiratorio superior por microorganismos más virulentos y el deterioro de las barreras primarias -incluyendo la destrucción de los macrófagos y la paralización permanente de los vellos y cilios- por inhalación de gases y partículas perjudiciales (34, 35).

Las enfermedades respiratorias ocasionadas por estas especies responden muy lentamente a la terapia antimicrobiana y, en ausencia de los antibióticos apropiados, la mortalidad puede llegar hasta el 80 %. Dicha cifra también depende del grado de daño en el pulmón, de la debilidad del enfermo y de la difusión del fármaco empleado. Los aminoglucósidos suelen ser los de mayor utilización, pero solo el 10 a 45 % de su

concentración en sangre difunde hasta los pulmones; así, no se alcanzan niveles terapéuticos con frecuencia, al margen de que el pH ácido de los pulmones afectados inhibe la actividad de los antimicrobianos mencionados (36).

En el laboratorio clínico, las neumonías se diagnostican considerando muestras tales como el esputo expectorado, la aspiración transtraqueal, el cepillado con broncoscopio y las biopsias de pulmón (37, 38, 39).

Sin embargo, el primero de ellos representa el espécimen más utilizado, dada su mayor facilidad en la recolección. No obstante, es preciso señalar que este tipo de muestra no resulta muy significativa, debido a que es imposible asegurar si los microorganismos detectados provienen del pulmón o de la faringe o la boca. En este sentido, pueden realizarse estudios cuantitativos, realizando diluciones de la muestra, dado que al parecer aportan mayor confiabilidad al diagnóstico (43).

Por lo que se refiere a los restantes métodos de recolección de las muestras, éstos resultan más significativos -puesto que no se contaminan con flora bucofaríngea-, pero requieren de ser practicados por personal altamente especializado y resultan muy traumáticos para el paciente; de hecho, se les clasifica genéricamente como técnicas invasivas, dado que llegan a lesionar los tejidos internos del organismo (44, 45, 46).

II. PARTE EXPERIMENTAL

I. Equipo, material, reactivos y medios de cultivo

Autoclave

Balanza analítica

Balanza granataria

Campana de flujo laminar

Incubadora ajustada a 35°C

Microscopio estereoscópico

Microscopio óptico

Refrigerador (4°C)

Abatelenguas

Asa Bacteriológica

Cajas de Petri estériles

Espátulas

Hisopos estériles

Matraces Erlenmayer de 500 y 1000 ml

Mechero Bunsen

Mechero tipo Fisher

Portaobjetos

Probeta 1000 ml

Tripié con tela de alambre

Tubos de ensaye

Agar citrato de Simmons

Agar hierro de Klígler

Agar Mac Conkey
Azul de bromo-tímol
Caldo infusión cerebro corazón
Caldo manitol rojo de fenol
Caldo sacarosa rojo de fenol
Colorantes y reactivos de Gram
Medio SIM
N,N dimetil p-amino benzaldehído
Urea

II. Metodología

En este trabajo se realizaron los análisis microbiológicos de 150 exudados faríngeos practicados a otras tantas personas sin patologías aparentes en el tracto respiratorio: 36 varones y 114 mujeres, todos ellos entre los 18 y 25 años de edad.

Recolección y cultivo de las muestras

Los especímenes se recolectaron con hisopos de algodón estériles a partir de la faringe, tomándose en consideración las precauciones recomendadas para no incrementar la carga microbiana con microorganismos presentes en boca y úvula. Posteriormente, se procedió a descargar el contenido de los hisopos en placas de agar Mac Conkey y a estriar la superficie de las mismas con asas esterilizadas a la flama. Las incubaciones correspondientes se llevaron a cabo a 35°C durante 24 a 48 h.

Identificación de las colonias aisladas,

Las colonias que sugerían la presencia de enterobacterias y/o *P. aeruginosa* -redondas, rosa intenso o amarillentas, convexas y de bordes regulares- se observaron a inmersión -previo frotis al Gram- y se inocularon apropiadamente en los medios Kligler, citrato de Simmons, SIM, caldo manitol rojo de fenol y caldo sacarosa-urea, para efectuar su identificación.

Las lecturas se llevaron a cabo después de una incubación de 24 h a 35 C, y los resultados se compararon con los patrones señalados en la tabla 3 del capítulo anterior.

iii. Resultados

De las 150 muestras analizadas, sólo 44 contenían enterobacterias y/o *P. aeruginosa* en la faringe, una de ellas con 2 microorganismos diferentes: *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Las especies encontradas y sus respectivas frecuencias se señalan en la tabla 5.

Tabla 5. Frecuencia de las especies detectadas en la faringe de personas sin patología respiratoria aparente.

MICROORGANISMO	# DE POSITIVOS	% DEL TOTAL DE MUESTRAS	% ENTRE LOS μ ODETECTADOS
<i>E. aerogenes</i>	14	9.34	31.1
<i>P. aeruginosa</i>	9	6.00	20.0
<i>K. pneumoniae</i>	8	5.33	17.7
<i>E. coli</i>	6	4.00	13.3
<i>P. mirabilis</i>	3	2.00	6.7
<i>S. marcescens</i>	3	2.00	6.7
<i>C. freundii</i>	2	1.33	4.5
TOTAL	45	30.00	100.0

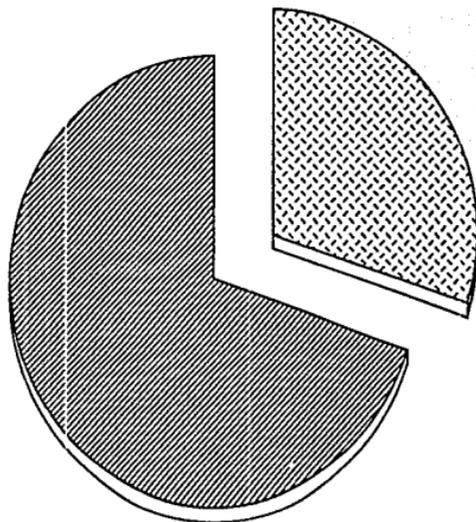
Con respecto a las características epidemiológicas analizadas en el trabajo, la tabla 6 resume la distribución de casos positivos, considerando sexo, tabaquismo, habitación y frecuencia de cuadros faríngeos en las personas sometidas a estudio.

Tabla 6. Número de personas sanas en cuya faringe se detectaron
P. aeruginosa y/o enterobacterias.

VARIABLE	# DE PERSONAS MUESTEADAS	# DE POSITIVOS	% DE POSITIVOS
Mujeres	114	33	28.9
Hombres	36	12	33.3
Fumadores	30	12	40.0
No fumadores	120	33	27.5
Noroeste*	10	2	20.0
Noreste*	21	5	23.8
Centro*	9	5	55.6
Suroeste*	71	20	28.2
Sureste*	39	13	33.3
Faring. frec.	77	11	14.3
No faring.	73	21	28.8

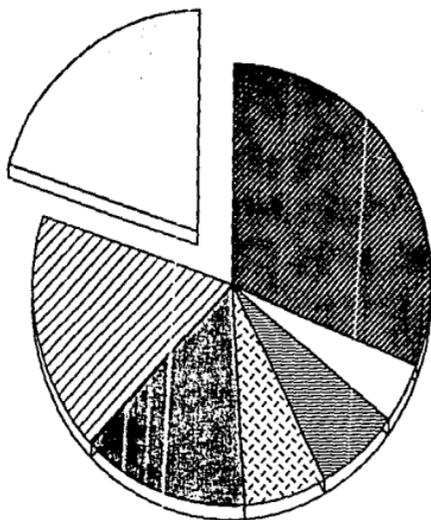
CLAVE: * = parte de la ciudad en la que tienen su domicilio, Faring. frec. = que padecieron 2 ó más cuadros faríngeos anuales durante los 3 últimos años, No faring. = que padecieron 1 ó ningún cuadro faríngeo anual durante los últimos 3 años.

RESULTADOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS



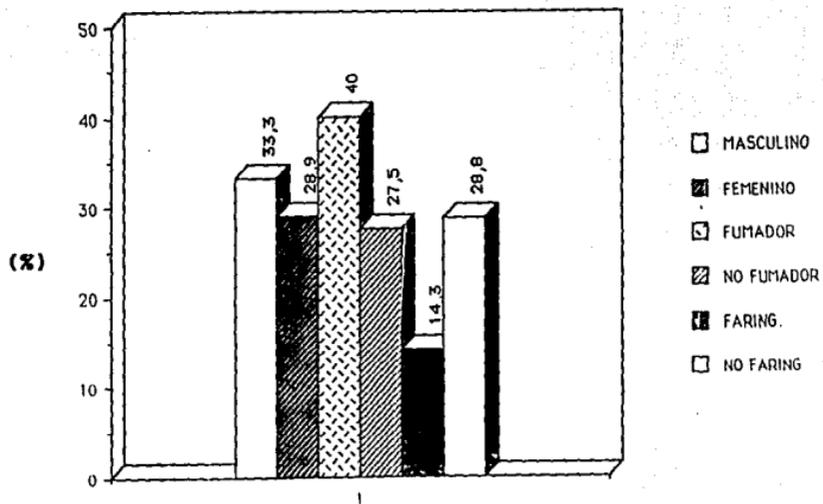
☑ 1	POSITIVOS	45
☑ 2	NEGATIVOS	105

FRECUENCIA (%) DE LAS ESPECIES ENCONTRADAS

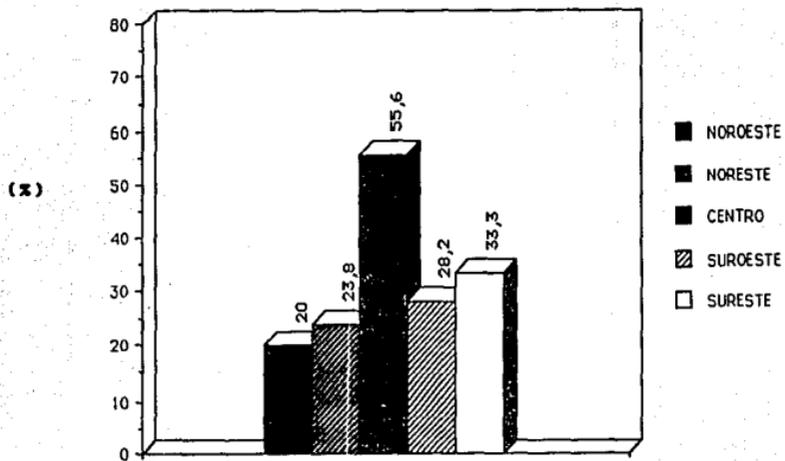


■ 1	<i>E. aerogenes</i>	31.1
□ 2	<i>C. freundii</i>	4.5
▨ 3	<i>S. marcescens</i>	6.7
▤ 4	<i>P. mirabilis</i>	6.7
▥ 5	<i>E. coli</i>	13.3
▧ 6	<i>K. pneumoniae</i>	17.7
□ 7	<i>P. aeruginosa</i>	20

% DE MUESTRAS CON ENTEROBACTERIAS
Y/O *P. aeruginosa*



**% DE MUESTRAS POSITIVAS POR ZONA
DOMICILIARIA EN EL D.F.**



iv. Discusión

De acuerdo a los datos obtenidos, el 29.33 % de los habitantes de la Ciudad de México presenta *P. aeruginosa* y/o enterobacterias, entre los múltiples microorganismos que conforman su flora habitual en dicha región anatómica. Aunque esta cifra no parece elevada -considerando que en nuestro medio abundan las fosas sépticas y se practica en gran medida el fecalismo al aire libre-, sí revela la enorme dificultad que enfrenta el laboratorio clínico para interpretar correctamente la presencia de estas bacterias en los exudados faríngeos y las expectoraciones provenientes de individuos que padecen cuadros respiratorios, ya que habiéndose comprobado el potencial patógeno de estas especies en el tracto respiratorio y adicionalmente, su estimable ocurrencia en la garganta y amígdalas de personas sanas, resulta muy complicado decidir entre acreditarles o no responsabilidad en la afección del enfermo.

En este sentido, el dato obtenido establece que, cuando se aíslan enterobacterias y/o *P. aeruginosa* en un exudado faríngeo del paciente, la probabilidad de que dichas especies se encuentren formando parte de la flora habitual es de 0.2933; desde el punto de vista estadístico, dicho guarismo sugiere que la detección de estas bacterias debe reportarse para que se instituya el tratamiento correspondiente, sin embargo, desde una perspectiva más profesional -lograda al incorporarse el componente biológico-, es conveniente que el químico también considere, entre algunos otros factores, si la persona involucrada presenta antecedentes de inmunodepresión y desde luego, si la presencia de otros microorganismos

con mayor significado clínico se comprobó durante el análisis.

En cuanto a las expectoraciones, la propuesta resultaría similar, aunque el argumento de mayor peso surgiría de la revisión del frotis al Gram que debe realizarse directamente de aquéllas ya que, como se ha demostrado en numerosos estudios, dicha observación determina la calidad y representatividad de los hallazgos logrados.

Por lo que se refiere a las especies detectadas con mayor frecuencia, resulta relativamente sorprendente el hecho de *E. aerogenes* haya alcanzado las cifras principales dado que, aunque no se puede soslayar su enorme distribución en el aire, el suelo, el agua, las plantas y el tracto intestinal del ser humano y los animales superiores, no se esperaba que su presencia en la faringe y amígdalas de las personas aparentemente sanas rebasara a la de microorganismos tales como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. No obstante, lo anterior es prácticamente intrascendente, en el sentido de que no se contrapone a lo que se ha comprobado ampliamente: estas últimas 3 especies figuran entre las que poseen mayor significado clínico en los individuos inmunocomprometidos, a quienes provocan graves neumonías en cuanto acceden al tracto respiratorio inferior. Simplemente, en cualquier enfermedad infecciosa, la incidencia de una especie -respecto a la de otras- depende en mayor grado de su virulencia que de su propia distribución en el medio ambiente.

Por otra parte, las variables epidemiológicas analizadas en el presente trabajo también redituaron indicadores muy interesantes, si bien debe

considerarse que el número de personas muestreadas dentro de cada rubro carece de regularidad. No obstante, puede observarse que los casos positivos alcanzaron mayores proporciones en el varón (33.3 %) que en la mujer (28.9 %), en los fumadores (40 %) que en quienes no tienen el hábito del tabaquismo (27.5 %) y finalmente, en las personas que habitan en las partes centro (55.6 %), sureste (33.3 %) y suroeste (28.2 %) que en aquellas cuyo domicilio se ubica en el noreste (23.8 %) o noroeste (20 %) de la Ciudad.

En este contexto, debe reconocerse que las cifras de los diferentes sexos no variaron de manera significativa y que, de hecho, la pequeña diferencia que se observó puede atribuirse a que la cantidad de mujeres muestreadas (114) fue notablemente mayor a la de los varones -36-. Algo similar podría comentarse sobre los fumadores y no fumadores, ya que se analizaron 30 y 120 de ellos, respectivamente; sin embargo, puede mencionarse que las cifras de 40 y 27.5 % aparentan ser representativas, puesto que se ha demostrado categóricamente que el tabaquismo paraliza la movilidad de vellos y cilios del tracto respiratorio, y ello permite el establecimiento de una mayor cantidad y variedad de microorganismos en las mucosas involucradas.

Por último, en cuanto se refiere a los datos asociados al domicilio de las personas estudiadas, es muy claro que la gran mayoría reside en el Sur de la Ciudad y ésto resta significado a los índices obtenidos para las zonas centro y norte. No obstante, resultaría interesante determinar si este parámetro se relaciona con incidencias de enfermedades infecciosas o

frecuencias de portadores dado que, como se ha comprobado recientemente, la contaminación ambiental es variable en las diversas regiones de la Ciudad.

Mención aparte merece lo observado entre los individuos que padecen regularmente cuadros faríngeos y los que, hasta el momento de realizar el trabajo, tenían la fortuna de no verse afectados en este aspecto: las cifras indican que las enterobacterias y/o *P. aeruginosa* colonizan con mayor frecuencia la faringe de estos últimos (28.8 % contra 14.3 %), y conducen a formular las siguientes hipótesis: 1). El tratamiento antimicrobiano, al que probablemente se sometieron los primeros, impidió que sus vías respiratorias superiores fueran colonizadas con regularidad por estas especies. 2) En los casos de que las personas analizadas sufran inmunodepresiones futuras, el riesgo de que ocurran neumonías por las bacterias de este grupo será mayor en quienes no han padecido constantemente de cuadros faríngeos.

Indudablemente, dichas propuestas resultan contradictorias por las siguientes razones: por lo que hace al primer inciso, la incongruencia radica en que estos microorganismos destacan entre los más resistentes a los antimicrobianos y, en consecuencia, es difícil aceptar que los fármacos administrados a las personas que padecen numerosas afecciones del tracto respiratorio superior impidan que las enterobacterias y/o *P. aeruginosa* se establezcan en la mucosa faríngea antes de que se regenere la flora residente. Esto último viene a colación, considerando que, cuando la flora se encuentra constituida en forma adecuada, resulta aún

menos lógico que la faringe pueda ser colonizada por componentes atípicos.

Por su parte, lo mencionado en el punto 2 tampoco resulta convincente ya que, por un lado, sería más lógico establecer que los individuos resistentes a las condiciones climatológicas extremas y a otros factores que promueven la ocurrencia de los cuadros faríngeos, resulten menos susceptibles de padecer episodios de inmunodepresión y por el otro, debe recordarse que éstos pueden presentarse en cualquier persona que adquiera enfermedades debilitantes -tales como diabetes melitus, SIDA, leucemia u otros tipos de neoplasia- o se someta a tratamientos con corticoesteroides - que abaten sensiblemente la inmunidad celular-, entre algunos otros motivos.

En todo caso, es necesario reconocer que las enterobacterias y *P. aeruginosa* destacan entre los microorganismos de mayor importancia para el ser humano, tanto por su extensa distribución y su capacidad para colonizar diversos tejidos, cuanto por la frecuencia con la que participan como agentes etiológicos de numerosos padecimientos. Lógicamente, como la enfermedad es -en numerosas ocasiones- producto de un fenómeno más cuantitativo que cualitativo, resultaría conveniente tratar de implementar estudios microbiológicos de recuento para determinar si sus resultados correlacionan con el significado de cada especie en las muestras analizadas dentro del laboratorio clínico.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

39

CONCLUSIONES

1. De cada 10 personas aparentemente sanas, 3 presentan enterobacterias o *P. aeruginosa* en la faringe, siendo muy raros los casos en los que se detecta a más de una especie de este grupo.
2. Entre las bacterias cuya frecuencia se determinó, *E. aerogenas*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli* resultaron las de mayor prevalencia.
- 3..La ocurrencia de enterobacterias y *P. aeruginosa* en garganta y amígdalas de personas sanas, no depende del sexo de los individuos pero sí de la practica del tabaquismo y muy probablemente, de la región domiciliaria.
4. Dada la considerable frecuencia (29.33 %) de personas sanas que presentan colonización faríngea por estos microorganismos, sería conveniente diseñar métodos microbiológicos que permitan diferenciar los casos en los que *P. aeruginosa* y/o las enterobacterias participan en la afección, para discriminar confiablemente aquéllos en los que su presencia no posee significado clínico.

BIBLIOGRAFIA

1. Cowan S.: Gram negative facultative anaerobic rods, In Bergey's manual of determinative bacteriology, The Williams and Wilkins Co., 8th edition., Baltimore, 1984; 290 - 296.
2. Davis B., Dulbeco R., Eisen H., Ginsberg H.:
TRATADO DE MICROBIOLOGIA.
Ed. Salvat, 4a. edición
Barcelona, 1990.
3. Palleroni N.: Gram negative aerobic rods and cocci, In Bergey's manual of sistematic bacteriology, The Williams and Wilkins Co., 1st edition, Baltimore, 1975; 140 - 165.
4. Framer J., Kelly M.: Enterobacteriaceae, Manual of Clinical Microbioly., American Society for Microbiology, 5th edition, Washington, 1991; 360 - 367.
5. Satta G., Pompei R., Grazia G., Cornaglia G.: Phosphatase, activity is a constant feature of all isolates of all major species of the family Enterobacteriaceae, . Clin. Microbiol., 1988; 26 (12): 2637 - 2641.

6. Finegold S. M. and Baron E. J.:
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO Bailey and Scott.
Ed. Médica Panamericana, 7a. edición.
Buenos Aires, 1989.

7. Davidson I., Bernard J.:
DIAGNOSTICO CLINICO POR EL LABORATORIO TODD-SANFORD
Ed. Salvat, 6a. edición.
Barcelona, 1983.

8. Gallardo-Viola G.: Enzyme polymorphism, prodigiosin production,
and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of
Serratia marcescens, J. Clin. Microbiol., 1989; 27 (5): 860 - 868.

9. **BBL MANUAL OF PRODUCTS AND LABORATORY PROCEDURES,**
Division of Becton, Dickinson and Co., 5th edition.
Maryland, 1973.

10. Mac Faddin J.:
**PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE
BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA.**
Ed. Médica Panamericana, 2a edición.
México, 1984.

11. **Lehninger, A.:**
BIOQUIMICA LEHNINGER.
Ed. Omega, 2a. edición
Barcelona, 1978.

12. **Schlegel, H.:**
MICROBIOLOGIA GENERAL
Ed. Omega, 3a. edición,
Barcelona, 1988.

13. **Gavini F., Husson M. O., Izard D., Bernigaud A., Quiviger B.:**
Evaluation of Autoscan-4 for identification of members of the family
Enterobacteriaceae, J. Clin. Microbiol., 1988; 26 (8): 1586 - 1588.

14. **Freney J., Herve C., Desmonceaux M., Allard F., Boeufgras J., Monget
D., Fleurettd J.:** Description and evaluation of the semiautomated 4-
hour ATB 32E method for identification of members of the family
Enterobacteriaceae, J. Clin. Microbiol., 1991; 29 (1): 138 - 140.

15. **Stratton C., Reller B.:** Controlled Evaluation of BACTEC Plus 26 and
Roche Septi-Chek aerobic blood culture bottles. J. Clin. Microbiol,
1991; 29 (5): 879 - 882.

16. Joklik W., Willett H., Amos B.:
MICROBIOLOGIA DE ZINSSER.
Ed. Médica Panamericana, 18a edición.
Buenos Aires, 1989.
17. Pruitt B.: Infections caused by *Pseudomonas* species in patients with burns and in other surgical patients, J. Infect. Dis., 1974; 130 (suplement): 8 - 13.
18. Testut L., Latarjet A.:
TRATADO DE ANATOMIA HUMANA.
Ed. Salvat, 9a edición.
Barcelona, 1979.
19. Gibbons R.J., van Houte J.: Bacterial adherence in oral microbiology, Annu. Rev. Microbiol., 1975; 29: 19 - 44.
20. Johanson W., Woods D. E., Chaudhuri T.: Association of respiratory tract colonization with adherence of gram-negative bacilli to epithelial cells, J. Infect. Dis., 1979; 139 (6): 667 - 673.
21. Rosenthal S., Tager I.: Prevalence of gram-negative rods in the normal pharyngeal flora, Ann. Intern. Med., 1975; 83: 355 - 357.

22. Murthy S., Baltch A., Smith R., Desjardin E., Hammer M., Conroy J., Milchelsen P.: Oropharyngeal and fecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital patients, J. Clin. Microbiol., 1989; 27 (1): 35 - 40.
- 23.. Whitby J. L., Rampling A: *Pseudomonas aeruginosa* contamination in domestic and hospital environments, Lancet, 1972; 1: 15 - 17.
24. Rahal J., Meade R., Bump C., Reinauer A.: Upper respiratory tract carriage of gram-negative enteric bacilli by hospital personal, JAMA, 1970; 214 (4): 754 - 756.
25. LeFrock J., Ellis C., Weinstein L.: The relation between aerobic fecal and oropharyngeal microflora in hospitalized patients, Am. J. Med. Sci., 1979; 277 (3): 275 - 280.
26. Johanson W., Pierce A., Sanford J., Thomas G.: Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli, Ann. intern. Med., 1972; 77: 701 - 706.
27. Baltch A., Griffin P.: *Pseudomonas aeruginosa*: pyocine types and clinical experience with infections in a general hospital, Am. J. Med. Sci., 1972; 264 (3): 233 - 246.
28. Baltch A., Griffin P.: *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a clinical study of 75 patients, Am. J. Med. Sci., 1977; 274 (2): 119 - 129.

29. Fuxench Z., Ramírez C.: Pharyngeal flora in ambulatory alcoholic patients, Arch. Intern. Med., 1978; 138: 1815 - 1816.
30. Reyes M.: The aerobic gram-negative bacillary pneumonias, Symposium on Infectious Lung Diseases, 1980; 64 (3): 363 - 383.
31. Fainstein V., Rodríguez V., Turck M., Hermann G., Rosenbaum B., Bodey G.: Patterns of oropharyngeal and fecal flora in patients with acute leukemia, J. Infect. Dis., 1981; 144 (1): 10 - 18.
32. Schimpff S., Greene W., Mae Young V., Wiernik P.: Significance of *Pseudomonas aeruginosa* in patient with leukemia or lymphoma, J. Infect. Dis., 1974; 130 (Suplement): 24 - 31.
33. Tillotson J., Finland M.: Bacterial colonization and clinica superinfection of the respiratory tract complicating antibiotic treatment of pneumonia, J. Infect. Dis., 1969; 119 :P 597 - 624.
34. Brown R., Sands M., Ryczak M.: Community-acquired pneumonia caused by mixed aerobic bacteria, Chest, 1986; 90 (6): 810 - 814.
35. Phair J., Bassaris H., Williams J., Metzger E.: Bacteremic pneumonia due to gram-negative bacilli, Arch. Intern. Med., 1983; 143: 2147 - 2149.

36. Bodem C., Lampton L., Miller D., Tarka E., Everett D.: Endobronchial pH relevance to aminoglycoside activity in gram-negative bacillary pneumonia, *Am. Rev. Res. Dis.* 1983; 127: 39 - 41.
37. Irwin R., Demers R., Pratter M., Erickson A., Farrugia R., Teplitz C.: Evaluation of methylene blue and squamous epithelial cells as oropharyngeal markers: a means of identifying oropharyngeal contamination during transtracheal aspiration, *J. Infect. Dis.*, 1980; 141 (2): 165 - 171.
38. Pratter M., Irwin R.: Clinical value of gram-stain smear of respiratory secretions, *Chest*, 1985; 88 (2): 163 - 164.
39. Gleckman R., DeVita J., Hibert D., Pelletier C., Martin R.: Sputum gram stain assessment in community-acquired bacteremic pneumonia, *J. Clin. Microbiol.*, 1988; 26 (5): 846 - 849.
40. Speert D., Dimmick J., Pier G., Saunders J., Hancock R., Kelly N.: An immunohistological evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection in two patients with cystic fibrosis, *Ped. Resear.*, 1987; 22 (6): 743 - 747.
41. Alves M., Martin L., Correia I.: Temperature profiles and alginate synthesis in mucoid and non-mucoid variants of *Pseudomonas aeruginosa*, *Letter in Appl. Microbiol.*, 1991; 12: 244 - 248.