



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

ESTAFILOCOCOS AEROTRANSPORTADOS:
DETERMINACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA
DE AMBIENTES INTRA Y EXTRAMUROS EN LA
CIUDAD DE MEXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A ;
ERIKA MARBAN CONDE

TESIS CON
VALIA 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.

AGRADECIMIENTOS

Nadie se desarrolla por sí solo. Agradezco el enriquecimiento que me han brindado todas las personas con quienes he interactuado a lo largo de mi vida: mis padres, hermanas y demás familiares, amigos, profesores y compañeros.

Agradezco al Q.F.B. Raúl Garza Velasco su dirección y asesoría académicas, así como a la Dra. Irma Rosas Pérez y a los Biólogos Eva Salinas Cortés y Felipe Cruz Ruiz, por su valioso y estimulante apoyo.

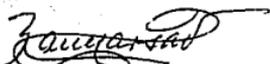
JURADO:

Presidente: Prof. ELDA PENICHE QUINTANA
Vocal: Prof. MARIA ELSA ESCUDERO GARCIA
Secretario: Prof. RAUL GARZA VELASCO
1er. Suplente: Prof. ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ
2o. Suplente: Prof. MAITE ASTIGARRAGA ZAVALETA

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Ciencias Ambientales del Centro de Ciencias de la Atmósfera, U.N.A.M. y Departamento de Biología de la Facultad de Química, U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA


Q.F.B. RAUL GARZA VELASCO

SUSTENTANTE


ERIKA MARBÁN CONDE

I N D I C E

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
I. GENERALIDADES	
i. Aerobiología	4
ii. El género <u>Staphylococcus</u>	22
II. PARTE EXPERIMENTAL	
i. Equipo, material, reactivos y medios de cultivo	43
ii. Area de estudio	44
iii. Recolección de las muestras	46
iv. Análisis microbiológico	47
v. Resultados	49
vi. Discusión	51
CONCLUSIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61

INTRODUCCION

Sin lugar a dudas, el análisis microbiológico del aire representa una de las actividades profesionales más importantes del Químico, por cuanto que determina cualitativa y cuantitativamente la presencia de los microorganismos en los ambientes abiertos y cerrados, en los cuales no sólo se vive sino que, además, se trabaja, se efectúan las intervenciones quirúrgicas, se convalece o, simplemente, se producen y envasan diversos medicamentos.

En la época contemporánea, la preocupación sobre la calidad del aire que respiran los seres humanos ha llegado a su máxima expresión, si bien en nuestro medio sólo se le concede una importancia adecuada a los contaminantes químicos, discriminándose inexplicablemente a las biopartículas que generan afecciones respiratorias o alergias que impiden una existencia óptima e impactan negativamente los logros socioeconómicos de la comunidad.

El presente trabajo persigue la meta de establecer la calidad del aire de la Ciudad de México, en virtud de que las enfermedades respiratorias destacan mundialmente entre las de mayor frecuencia.

En este sentido, se han tomado como indicadores las bacterias del género Staphylococcus, por tratarse de microorganismos de origen humano y animal, cuya transmisión aérea -de persona a persona- se encuentra ampliamente comprobada. Sin embargo, también se ha intentado detectar la frecuencia de Micrococcus debido a que, aunque también se localiza en humanos, su frecuencia en éstos es notablemente menor que la del género antes mencionado, pudiéndosele considerar de vida libre.

La comparación entre las abundancias de ambos géneros podría determinar la mayor relevancia del origen libre o humano de los principales contaminantes del medio ambiente.

De cualquier manera, la recolección del total de muestras se ha realizado con el impactador Andersen, puesto que se trata del equipo óptimo para llevar a cabo este tipo de estudios.

OBJETIVOS:

- Establecer la concentración de bacterias mesófilas aerobias en el aire de la Ciudad de México, en ambientes intra y extramuros, y en las épocas de "secas" y "lluvias".
- Determinar, en muestras de aire, la abundancia de estafilococos y compararla con la de Micrococcus, considerando las diversas condiciones mencionadas en el párrafo anterior.
- Utilizar el impactador Andersen para recolectar muestras de aire y conocer las características que lo colocan como el equipo óptimo para realizar esta clase de estudios microbiológicos.

I. GENERALIDADES

i. Aerobiología

i.1. Antecedentes

Se asigna el nombre de contaminación a la acumulación de sustancias indeseables en el agua, suelo y aire; evidentemente, los contaminantes pueden ser físicos, químicos y biológicos y, con relación al aire, resultan interesantes las partículas suspendidas totales (PST), las cuales corresponden a diversos elementos pequeños arrastrados por los vientos, de origen industrial o natural, tales como polvo, polen y microorganismos (35).

Cabe mencionar que estos últimos representan sólo una pequeña fracción de la masa total de materia orgánica aerotransportada y que no se consideran dentro de la definición tradicional de contaminante atmosférico, por no representar riesgos tan graves como los contaminantes químicos y los isótopos radioactivos (69).

No obstante, la constante inhalación de aeropartículas

implica una incuestionable importancia epidemiológica, dependiente de la clase y abundancia del contaminante, del tiempo y la frecuencia de exposición y, desde luego, de la sensibilidad de cada persona (20).

En este sentido, es claro que la humanidad se encuentra cada vez más expuesta a los efectos de los diversos contaminantes, lo cual se refleja negativamente en la economía de los diferentes países, que deben enfrentar un progresivo ausentismo en el trabajo así como gastos crecientes en atención médica (49).

Lógicamente, los adelantos en el combate de las enfermedades asociadas a problemas de contaminación se ven frenados más dramáticamente en los países en vías de desarrollo, en donde se manifiesta una limitada carencia de recursos (20).

Los microorganismos y las partículas de polvo constituyen ejemplos de contaminantes primarios que son emitidos directamente de diversas fuentes identificables. Desde el punto de vista físico, las partículas del aire se dividen en "suspendidas" y "sedimentables"; las primeras miden menos de 5 micras de diámetro, son aerosoles que no se precipitan sobre el suelo y se mantienen en el aire gracias a la acción del viento; por el contrario, las segundas llegan a

depositarse en el suelo y, como son de mayor tamaño, suelen depositarse muy cerca de su fuente de emisión (20).

La tabla 1 muestra la relación entre las diversas aeropartículas y su respectivos tamaños.

Tabla 1. Partículas del aire y sus respectivos tamaños (20)

<u>Aeropartículas</u>	<u>Diámetro (micras)</u>	
Humos	0.001 a	0.1
Polvos	0.1 a	1000
Virus	0.015 a	0.45
Bacterias	0.3 a	10
Algas	0.5 a	1000
Esporas de hongos	1 a	100
Fragmentos de:		
Líquenes	1 a	1000
Protozoarios	2 a	1000
Polen	10 a	100
Plantas e insectos	100 a	1000

Aerobiología es un término acuñado en los años 30's y corresponde a una disciplina enfocada a la caracterización de las partículas viables presentes en la atmósfera intra y extramuros, considerando tanto sus mecanismos de generación, transporte y deposición, como los factores físicos, químicos y biológicos que afectan su viabilidad y distribución. Contribuye, además, a la realización de estudios epidemiológicos relacionados con las enfermedades de las plantas, animales y humanos (20, 30).

Los antecedentes de esta ciencia tienen su origen en el año 55 a.c., cuando Lucrecio observó el movimiento de gotas en un rayo de luz -dentro de un cuarto oscuro- y asoció sus hallazgos a la generación de la peste, de las alergias y de las patologías en plantas.

En los siglos XVIII y XIX, Spallanzani, Pasteur, Tyndell, Miquel y algunos otros, utilizaron métodos aerobiológicos para combatir las teorías de la generación espontánea de la vida y del germen de la enfermedad.

Sin embargo, fue hasta el último cuarto del siglo XIX, cuando el químico A. Dumas realizó un estudio intensivo de bacterias y hongos en la atmósfera; por su parte, Miquel estimó el número de partículas de varias clases, contenidos en una determinada medida de aire y, posteriormente, W. Hesse diseñó algunos equipos constituidos de un tubo angosto horizontal de 3.5 cm de ancho por 70 de largo que contenía gelatina nutritiva, a través del cual aspiraba un volumen conocido de aire y los microorganismos se impactaban en el medio. Incuestionablemente, este aparato resultó el antecesor de los diversos muestreadores utilizados hoy en día (secuenciales, de tipo continuo, etc.), puesto que consideraba la existencia de las variadas aeropartículas viables (7, 59).

En México, los estudios sobre Aerobiología iniciaron a partir de 1982, concentrándose en el área fitopatológica aunque, en la actualidad, los alergólogos y microbiólogos investigan la relación entre la propagación de los microorganismos que integran habitualmente la flora y la fauna anemófila, y la ocurrencia de cuadros alérgicos e infecciosos en los seres humanos (10, 63).

i.2. Aeropartículas

El estudio de los aerosoles se basa en la consideración de las propiedades inerciales de las partículas, en virtud de su relevancia en cuanto a su transporte a través de corrientes de turbulencia del aire y a la velocidad con la que caen (16, 65).

En otras palabras, dichas propiedades son las que permiten recolectar partículas del aire, debido a su impactación sobre superficies acondicionadas que favorecen el análisis secuencial (16).

Cuando una partícula esférica se asocia a otro cuerpo suspendido en el aire, la masa de ambos influye para que desciendan -inicialmente de acuerdo con la fuerza de gravedad- a una velocidad progresiva; no obstante, también se irán incrementando las fuerza de rozamiento con el aire,

de manera que, paulativamente, la fuerza neta tenderá a cero y, de esta manera, la caída de la partícula se estabilizará a una velocidad final constante.

Lo mencionado en el párrafo anterior corresponde a la Ley de Stoke, cuya aplicación a la recolección de partículas es relativa cuando el muestreo contempla la impactación del analito empleando las corrientes de aire las cuales, si resultan suficientemente fuertes, estimulan además su distribución uniforme sobre el impactador (9, 16, 59).

Desde el punto de vista de su comportamiento aerodinámico, las partículas biológicas están sujetas a las mismas leyes físicas que las de naturaleza inerte, si bien las primeras también dependen de sus características metabólicas y estructurales. De hecho, su tamaño fluctúa entre 1 y 100 micras, y su velocidad de caída varía entre 0.003 y 30 cm/seg, dependiendo de tamaño, forma y densidad (11, 20).

Las atmósferas intra y extramuros

Los estudios aerobiológicos deben distinguir la contaminación intramuros (en interiores) de la extramuros (libre o de exteriores). Por lo general, la primera se relaciona con la presencia de partículas dentro de los hospitales, casas habitación, fábricas, escuelas, etc., en

tanto que la segunda se asocia a las enfermedades alérgicas y/o a la medicina epidemiológica (20).

Como es sabido, la atmósfera de la tierra representa un real enjambre de microorganismos, algunos de los cuales poseen una mayor o menor virulencia para el ser humano, o bien, para las plantas o los animales. En este sentido, todos ellos pueden diseminarse por vía aérea, hasta lograr el contacto con su hospedador susceptible (20).

Movimiento del aire en los espacios intramurales

El aire que se desplaza en espacios cerrados tiene un comportamiento variable, dependiendo del diseño de las habitaciones, así como de la temperatura, ventilación, tamaño y amueblado de las mismas, y de las actividades de quienes las ocupan (15).

La contaminación de la atmósfera y de las superficies y, sobre todo, la distribución e inhalación de los contaminantes representan un verdadero riesgo para los seres vivos que permanecen en ambientes cerrados; a este respecto, se ha comprobado ampliamente que es en estos últimos en donde los aerosoles biológicos resultan más contagiosos, transmitiendo enfermedades tales como tuberculosis, ántrax pulmonar, bronquitis y neumonías neumocócicas,

estreptocóccicas o estafilocóccicas, entre algunas otras (30, 41).

Por lo que se refiere a la atmósfera exterior, aunque no existen dudas acerca de que los aerosoles biológicos son capaces de recorrer grandes distancias -bajo condiciones meteorológicas adecuadas-, aún es necesario determinar los géneros o especies microbianos que conservan con mayor regularidad su poder infectivo después de esta clase de traslados prolongados (13, 19, 48, 66).

En general, la dispersión aérea de los microorganismos -ya sea que se encuentren o no incorporados a otras partículas-, se realiza en 3 fases: a) su lanzamiento hacia el aire a partir de su sustrato original; b) su transporte a través de corrientes aéreas y c) su deposición sobre su nuevo sustrato (43).

En relación a su lanzamiento hacia el aire, éste suele ser pasivo y depende de la energía suministrada por el medio ambiente; las bacterias son incorporadas a la atmósfera vía los vientos o como resultado de la caída de la lluvia sobre la tierra, el agua o las plantas, aunque otros mecanismos asociados al ser humano también pueden gravitar en el fenómeno. De hecho, dado que los microorganismos carecen de

capacidad para dispersarse por sí mismos, otros vectores tales como el polvo y las prendas quirúrgicas -entre algunos otros- pueden acarrear, ya estando en el aire, diversos agregados de contaminantes (4, 30, 45, 56).

Adicionalmente, las gotas de lluvia -al salpicar-, la vaporización del mar, los procedimientos implicados en el tratamiento de aguas negras, etc., descargan hacia la atmósfera pequeñas gotas que contienen microorganismos, e inclusive, las microgotas de saliva expelidas al toser, estornudar o hablar, contribuyen -tanto en extramuros como en intramuros- a la dispersión de bacterias patógenas como no virulentas (20, 45, 61, 68).

En humanos y animales, la nariz y la boca figuran entre las principales fuentes de microorganismos patógenos para el ambiente aéreo, si bien se suman a ellas la descamación de la piel y la defecación. En todos los casos, se cumple el proceso de embarque o acarreamiento en las partículas suspendidas o balsas (20, 45).

Por lo regular, el tamaño de las partículas que contienen bacterias varía notablemente, de acuerdo con el tipo y cantidad de sus constituyentes sólidos, y no tanto en relación al tamaño de los gérmenes que acarrea.

Por otra parte, la concentración de dichos acarreadores atmosféricos es muy fluctuante, existiendo acumulaciones muy densas, hasta volúmenes muy grandes con bajo contenido microbiano, dependiendo de la proximidad de algunas fuentes de microorganismos o de la fuerza de las mismas y, desde luego, de los factores que pueden afectar la viabilidad de la carga microbiana (20).

1.3. Aerobacterias

Incuestionablemente, las bacterias constituyen uno de los grupos microbianos más abundantes en el medio ambiente; en condiciones naturales, se les encuentra fácilmente en agua, aire y suelo, en particular, aquéllas que se consideran degradadoras de la materia orgánica (8).

Una vez establecidas en su hábitat correspondiente, las células bacterianas pueden incorporarse a la atmósfera por acción del viento, por corrientes de convección, por la caída de la lluvia sobre el suelo y/o las plantas, por burbujas de eyección en el mar y ríos, e inclusive, numerosas actividades humanas contribuyen al incremento de las aerobacterias, mismas que son fácilmente acarreadas por las partículas de polvo o por microgotas de agua (20, 30).

El tiempo de permanencia de una partícula en el medio

ambiente depende de su tamaño, densidad e higroscopicidad y, tratándose específicamente de bacterias, su viabilidad varía dependiendo de la temperatura y humedad ambiental, de la precipitación pluvial, la radiación solar, de la velocidad y dirección del viento y de la nubosidad, entre otros factores (21, 22, 23, 35, 51).

De hecho, numerosas bacterias presentan ciertas características que favorecen su resistencia a los diversos agentes ambientales, tales como la presencia de pigmentos y su capacidad para producir esporas (Clostridium y Bacillus). No obstante, se ha comprobado ampliamente que su reproducción resulta casi óptima cuando las partículas que las transportan poseen humedad y nutrientes (17, 18, 25).

Por lo general, las partículas que contienen bacterias en los ambientes urbanos presentan un tamaño que fluctúa alrededor de 9.2 micras, mayor que en otros ambientes, debido a la participación de la tierra, del agua evaporada, de escamas de la piel, de los fragmentos de plantas, etc.

En otras palabras, las aerobacterias provienen del suelo y el agua y/o de los animales y el humano, aunque independientemente de su origen, suelen actuar como fuentes de contagio de enfermedades diversas (20).

El viento suele proporcionar la energía dinámica necesaria para aerolizar las bacterias y, dependiendo de las turbulencias, su concentración difiere de acuerdo con la altura y algunos otros factores. Cabe mencionar que, a medio día, cuando la temperatura suele ser mayor, su número disminuye; contrastando con lo anterior, la concentración de aerobacterias se incrementa durante la noche, aunque va reduciéndose gradualmente con la sedimentación (46, 60, 69).

Tal como ocurre con el viento, la lluvia constituye otro agente poderoso como generador de aerosoles microbianos, si bien sus efectos globales varían en relación al tamaño de las gotas, de su velocidad final al impactarse sobre las superficies y de las condiciones de dureza y humedad de estas últimas (26).

El número de aerobacterias se incrementa durante el verano y el otoño, considerándose que la carga microbiana puede disminuir por el lavado pluvial de la atmósfera, aunque también es posible que aumente debido al impacto de las gotas de lluvia sobre las diversas superficies (5, 20, 26, 30).

En resumen, el número absoluto de bacterias depende de la

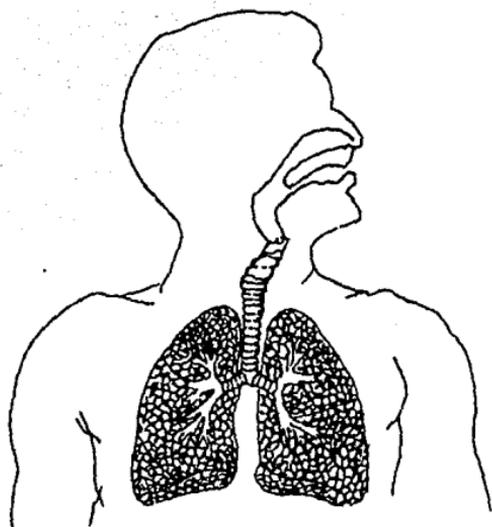
ocurrencia o inexistencia de lluvia, de las actividades antropogénicas -la actividad vehicular, los procesos industriales, la respiración-, la abundancia de vegetación y polvo, la frecuencia y velocidad del viento, el proceso vital de los animales, etc. (20, 30).

i.4. Partículas inhalables

Las partículas inhalables varían entre 0.1 y 15 micras de diámetro, fracción dentro de la cual se localizan los elementos que provocan efectos directos sobre la salud (52).

Dependiendo del tamaño de las biopartículas varía el sitio de su deposición dentro del tracto respiratorio humano; de hecho, se ha demostrado que sólo las que presentan diámetros menores a 5 micras penetran hasta los alveolos. Sin embargo otros factores que influyen en el proceso son el flujo, la frecuencia y el volumen respiratorios (52).

Tanto en la inhalación como en la exhalación se provoca la movilidad de numerosas partículas viables e inertes. Por tal razón, el tracto respiratorio cuenta con eficaces mecanismos de depuración, como el árbol bronquial el cual se encuentra tapizado por una capa de moco, que es impulsado, a través de los cilios, desde el tracto inferior hacia la porción



FRACCION NO RESPIRABLE
(REGION NASOFARINGEA)

FRACCION RESPIRABLE
(REGION TRAQUEO-BRONQUIAL
Y ALVEOLAR)

EL MUESTREADOR ANDERSEN SIMULA EL SISTEMA RESPIRATORIO HUMANO

superior, y los macrófagos alveolares cuya función radica en englobar e inactivar a los microorganismos, dando lugar a la respuesta inmune (65).

Sin embargo, cuando las partículas no viables de aproximadamente 1 micra alcanzan los pulmones, puede generarse una alveolitis y la infiltración de los bronquiolos ocasiona enfisema; independientemente de lo anterior, es posible que las partículas inhaladas resulten alergénicas y conduzcan a crisis asmáticas.

Las partículas inhalables se dividen, de acuerdo a su naturaleza, en minerales y orgánicas, destacando las de origen industrial y automotriz, los polvos domésticos, aerosoles, humos y agentes infecciosos (20).

i.5. Métodos de muestreo del aire (20)

El muestreo del aire reviste actualmente un gran interés desde varios puntos de vista, dada su incuestionable importancia médica, económica y científica, sustentada en el conocimiento cualitativo y cuantitativo de los aeromicroorganismos.

Muestreo por sedimentación

Corresponde al empleo de cajas de Petri con medios de cultivo

sólido, las cuales permanecen abiertas en la zona de muestreo, durante tiempos previamente determinados. Su medio de colección es el agar; se considera sencillo y barato, aunque no cuantifica y sólo favorece la implantación de partículas con alta velocidad de fijación; es decir, si bien este método determina el número de partículas viables que se adhieren a la superficie del medio, la impactación depende del tamaño y densidad de dichas partículas y es incapaz de detectar la cantidad de aerosol que se colecta.

Muestreo por filtración

Se basa en la filtración del aire a través de membranas y su desventaja más importante reside en el hecho de que los microorganismos recolectados sufren grados considerables de desecación, lo cual se refleja en cuentas inferiores a las reales.

Muestreo por impactación

Utiliza un impactador de vidrio con multiorificios y multietapas, mismo que permite la detección de partículas grandes y favorece la cuantificación de los microorganismos presentes en el aire, aunque es muy complicado esterilizarlo y ello da lugar a cifras más elevadas que las reales.

Emplea depósitos de vidrio, dentro de los cuales quedan las

aerobacterias, esporas u hongos, inmersos en solución amortiguadora, de la cual se toman alícuotas para adicionarse en medios de cultivo.

Muestreo por impactación en medio sólido

Se aplica empleando un impactador multietapas, que permite discriminar a las partículas de acuerdo a sus diversos tamaños, ya que éstas se impactan en varias etapas sobre la superficie del medio colector. Lógicamente, también permite medir el tamaño de las partículas aerodinámicas, tal como lo hace el impactador de cascada Andersen.

Cabe mencionar que la incorporación de un aparato volumétrico al método de sedimentación en cajas de Petri, ha conducido al diseño del impactador Andersen, considerado como el más práctico de los muestreadores volumétricos, independientemente de que también hace posible realizar estudios comparativos sobre el poder de penetración de las partículas atmosféricas dentro del aparato respiratorio humano (39).

La adecuada sensibilidad del muestreador Andersen se ha demostrado ampliamente mediante trabajos de campo efectuados en 1955, a partir de los cuales se aislaron microorganismos del aire por vez primera, considerando el tamaño de las

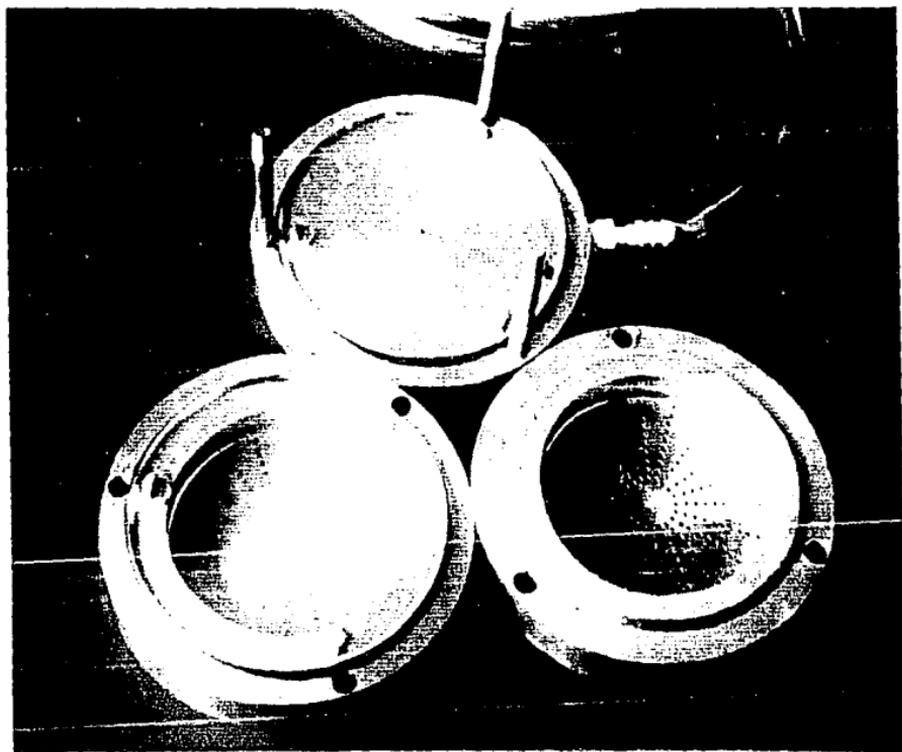
partículas suspendidas. Consecuentemente, ha resultado de gran utilidad en la realización de estudios de contaminación por polvos, esporas de hongos, bacterias, polen, etc.

Su eficiencia de colección permite efectuar la medición de aerosoles biológicos, ya que la impactación de las partículas es relativamente suave y preserva la integridad y viabilidad de los microorganismos (1).

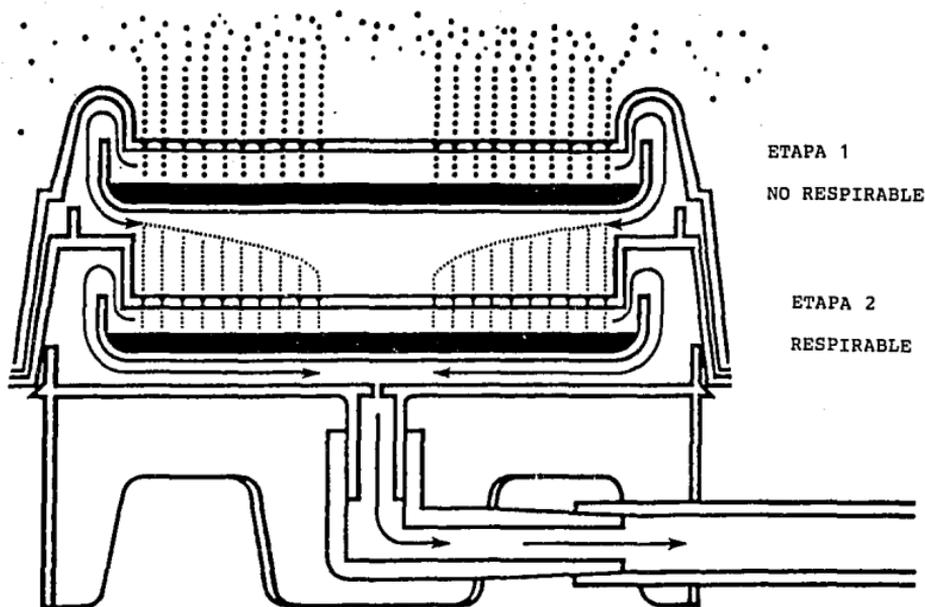
El Andersen es un impactador de succión, operado por una pequeña bomba al vacío; está formado por 2 a 8 etapas (según el modelo) de acero inoxidable, colocadas en serie, cada una de las cuales presenta orificios cuyos diámetros decrecen de una a otra placa (1).

Inmediatamente por debajo de cada etapa, se localiza una caja de Petri (de aluminio o vidrio) con medio de cultivo, la cual sólo permanece abierta durante la recolección. De esta manera, las partículas son obtenidas mediante impactación inercial, en las diversas etapas, obediendo a su respectiva isocinética (1).

En concreto, este muestreador es el más confiable para llevar a cabo estudios sobre aerobacterias, con base en las siguientes ventajas: 1) Es el de mayor sensibilidad y



IMPACTADOR DE CASCADA ANDERSEN DE DOS ETAPAS



ESQUEMA DEL IMPACTADOR DE CASCADA ANDERSEN DE DOS ETAPAS

eficiencia en la recolección; 2) Resulta fácil su esterilización; 3) Mantiene la viabilidad de los microorganismos contenidos en las muestras; 4) Discrimina el tamaño de las partículas recolectadas (1).

Características del impactador de 2 etapas (2)

1. Está constituido por 2 placas de aluminio, cada una de las cuales presenta 200 orificios: los correspondientes a la primera etapa poseen un diámetro de 1.5 mm, en tanto que los de la segunda son de 0.4 mm. Su bomba de vacío se localiza en la parte inferior y origina un flujo de aire (succión) de 28.3 L/minuto que confiere una aceleración adecuada a las partículas que se impactan selectivamente -en función de su tamaño- sobre el medio de cultivo.
2. Simula el ingreso de las biopartículas en las vías respiratorias humanas, ya que ambos se consideran sistemas aerodinámicos impactadores de partículas. A este respecto, la etapa 1 correspondería al tracto respiratorio superior (que recoge las partículas de 5 micras de diámetro) y, la etapa 2, equivaldría al inferior, donde suelen alojarse las menores a 4.5 micras.
3. Permite colocar y retirar las placas de Petri con suma facilidad. En este sentido, se recomienda que el medio de

cultivo seleccionado sea enriquecido (como el tripticase-soya agar) y, de acuerdo con varios autores, se encuentre adicionado de algún osmoprotector (50).

Este último componente puede resultar importante para que las bacterias se recuperen del daño que pudieran haberle conferido los diversos factores ambientales (tabla 2). Entre los osmoprotectores más empleados destaca la glicino-betaína (N,N,N trimetil-glicina), misma que se agrega a razón de 0.39 g/L (12, 28, 29).

ii. El género Staphylococcus

ii.1. Clasificación

Los estafilococos pertenecen a la familia Micrococcaceae, constituida también por los géneros Micrococcus y Planococcus (54).

Dentro del género Staphylococcus se localizan actualmente 27 especies, si bien las siguientes 6 son las que poseen un mayor significado en el campo de la salud pública: S. aureus, S. epidermidis, S. haemolyticus, S. saprophyticus, S. lugdunensis y S. schleiferi. Cabe mencionar que la primera es la única coagulasa positiva, en tanto que las 5

restantes integran, junto con las 21 que no se mencionan, el grupo de los estafilococos coagulasa negativa o ECN (14, 25, 54).

ii.2. Importancia del género Staphylococcus en salud pública

Hasta hace poco más de una década, en el campo de la salud se consideraba que, dentro del género Staphylococcus, la única especie patógena era S. aureus; de hecho, a los ECN se les clasificaba como saprófitos o de baja patogenicidad para los humanos, e inclusive, a algunas especies de este grupo se les incluía dentro de una sola: S. epidermidis, cuya mención en los reportes de los laboratorios clínicos se interpretaba como contaminación de las muestras con miembros de la flora de piel y/o mucosas. Sin embargo, en los años recientes, todo el planteamiento antes señalado se ha modificado radicalmente, ya que aún cuando se continúa reconociendo a S. aureus como la especie más virulenta, lo cierto es que varias cepas de ECN han mostrado un marcado incremento en padecimientos infecciosos, en especial cuando el paciente analizado se encuentra sometido a procedimientos médicos invasivos o es tratado con cuerpos extraños residentes, tales como sondas, catéteres y sus equivalentes (24, 38, 57).

Por lo que se refiere a los laboratorios farmacéuticos, la

especie S. aureus continúa siendo muy importante, en virtud de que se trata de uno de los 5 microorganismos objetables en productos farmacéuticos no estériles (PFNE), junto con Escherichia coli, Salmonella sp., Pseudomonas aeruginosa y la levadura Candida albicans (25).

Como es sabido, la presencia de cualquiera de esos 5 microorganismos en los PFNE, es suficiente para que el lote correspondiente no sea liberado para su venta, porque E. coli representa la posibilidad de contaminación fecal y los restantes ocasionan padecimientos al humano. De acuerdo a lo anterior, el químico que se desempeña en la industria farmacéutica debe saber detectar su presencia, diferenciándolos de otros géneros y especies presentes en dichos productos.

ii.3. Características microscópicas

Los estafilococos son bacterias esféricas cuyo diámetro fluctúa entre 0.8 y 1.0 micras (alrededor de un décimo de diámetro del eritrocito humano); no poseen flagelos ni esporas y sólo algunas cepas son capsuladas; además, se tiñen fácilmente reteniendo el colorante de Gram de manera tenaz, aunque esta propiedad varía en los cultivos viejos y los que se obtienen bajo condiciones adversas (como en presencia de antibióticos, etc.) (42, 54).

Su agrupación característica en acúmulos parecidos a racimos de uvas es la más evidente, aunque sólo se observa en las preparaciones provenientes de muestras biológicas y de cultivos sólidos; su pared celular consta de una capa externa rica en proteínas y de una capa interna de mucopéptido y, aunque su estructura antigénica ya se ha definido, los diversos antígenos tienen poco valor en su identificación, exceptuando a la proteína A de los estafilococos coagulasa positiva (ECP), la cual se utiliza para diferenciar a este grupo mediante la reacción pseudoimmune (58).

ii.4. Resistencia a agentes físicos, químicos y biológicos

Los estafilococos figuran entre las bacterias no esporuladas más resistentes, ya que pueden sobrevivir a muchas condiciones ambientales desfavorables durante su camino de un hospedador a otro; son muy resistentes a la luz, temperaturas externas extremas y desecación, por lo cual estos microorganismos se pueden transmitir aún por medio del polvo. Además, sobreviven días a semanas en el pus desecado y en el esputo, y pueden resistir calor húmedo hasta de 60°C durante 30 minutos (3, 25, 42).

Adicionalmente, los estafilococos resisten la acción de los fenoles y la de muchos otros desinfectantes empleados en los

laboratorios (cloruro de magnesio, cloruro de benzalconio, etc.). La incorporación de 7 a 8 % de cloruro sódico a los medios de cultivo permite su desarrollo, a la vez que inhibe el de casi todas las demás bacterias. De hecho, el diseño de medios selectivos para su aislamiento se basa en esta propiedad y/o en su capacidad para soportar la oxidación por teluritos (25, 47).

Finalmente, su resistencia a la penicilina suele depender de su capacidad para producir beta lactamasas, propiedad transmitida por conjugación o transducción y que implica la presencia de plásmidos de resistencia, de los cuales cada vez se genera mayor información (25).

ii.5. Propiedades culturales

Medios de cultivo

Aunque estos microorganismos se reproducen fácilmente en el laboratorio previa siembra en caldo o agar nutritivos, los medios de cultivo que carecen de tiamina y ácido nicotínico no favorecen su desarrollo; sin embargo, en los medios corrientes suelen existir cantidades pequeñas de estas vitaminas. Su crecimiento en sangre es más abundante y hace posible poner de manifiesto hemolisinas estafilocócicas de acción enérgica, tales como la alfa, beta, gamma o delta, presentes con cierta regularidad en los ECP (3, 24).

Independientemente de que en el laboratorio se emplea gelosa sangre para lograr el aislamiento de estos microorganismos, se suelen incorporar al análisis otros medios de naturaleza selectiva, tales como el S110 y el manitol sal agar -que deben su selectividad a su alto contenido en NaCl-, así como el Baird Parker y el Vogel Jhonson -cuyo agente inhibidor es el telurito de potasio al 1 %- (42).

Condiciones de incubación

Estos microorganismos desarrollan dentro de límites muy amplios de temperatura (10 a 40°C), aunque su crecimiento óptimo se obtiene entre los 30 y 37°C. Es importante precisar que, su pigmentación característica -la cual sólo es manifiesta en ciertas especies-, se produce mejor entre los 19 y 25°C (25, 54).

En 18 a 24 h y a una presión atmosférica normal de aerobiosis se logra un desarrollo abundante, pero la mayoría de las cepas se reproducen aceptablemente en ausencia de oxígeno; por tal razón, los estafilococos se clasifican como facultativos (54).

Morfología macroscópica

En general, las colonias estafilocócicas guardan semejanza

con manchas redondas de pintura y, de acuerdo a la composición de los medios, su diámetro fluctúa entre los 2 y 4 mm; además, son convexas, de bordes regulares y de consistencia butirácea, y su coloración varía desde el blanco (en gelosa sangre) hasta el negro -en las formulaciones que contienen teluritos, tales como el Baird Parker y el Vogel Jhonson- (54).

NOTA: Lo referido anteriormente se cumple para todas las especies de Staphylococcus. A continuación se mencionan algunas características macroscópicas que sólo sugieren la presencia de S. aureus:

- En gelosa sangre (G.S) y Baird Parker, las colonias suelen rodearse por halos transparentes, debido a la elaboración de hemolisinas -en G.S.- y de lecitinasa -en el segundo medio-.
- En manitol sal agar (MSA), las colonias se rodean por halos amarillos, debido a que ocurre fermentación del manitol, y su indicador rojo de fenol adquiere aquella coloración al disminuir el pH.
- En S110, tras otras 24 h de incubación, estas últimas a temperatura ambiente, las colonias manifiestan un color

amarillo dorado, al producirse un pigmento lipofílico -no hidrosoluble-, constituido por derivados de la xantina (24, 42).

ii.6. Pruebas de identificación

a) Detección del género

Una vez efectuado el aislamiento de colonias sospechosas de estafilococos, es necesario contar con la seguridad de que se trata de este género, lo cual por lo regular se logra mediante la observación de extensiones teñidas al Gram. Sin embargo, en caso de persistir algunas dudas, puede recurrirse a la realización de la prueba de la catalasa, para diferenciar a estos microorganismos -que la dan positiva-, en relación con los estreptococos -cuyo resultado es negativo- (38).

A continuación se describen los principales aspectos asociados a la prueba de la catalasa.

Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Químicamente es una hemoproteína bastante similar a la hemoglobina, con la diferencia de que los cuatro átomos de hierro contenidos en

su molécula, se encuentran en su estado más oxidado (Fe^{+++}), mientras que en la hemoglobina lo están en estado reducido (Fe^{++}). Exceptuando a los estreptococos y a Gardnerella vaginalis, las bacterias aerobias y facultativas poseen esta enzima, no así la mayoría de las anaerobias que, con el objeto de llevar a cabo la degradación del mismo sustrato, producen la peroxidasa (3, 47).

Dentro del laboratorio de Bacteriología, la prueba de la catalasa se utiliza generalmente para diferenciar al género Streptococcus (-) del Staphylococcus (+) y, con menor frecuencia, para hacerlo entre las especies de bacilos Gram positivos y entre las micobacterias. Para llevarla a cabo es necesario disponer, por un lado, de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 ‰ -almacenada en frasco ámbar y en refrigeración- y, por otro, de un cultivo puro de 18-24 h del microorganismo por probar, contenido en una caja de Petri o bien en tubos de ensayo exentos de sangre, toda vez que los eritrocitos poseen esta actividad enzimática.

El procedimiento más sencillo y rápido incluye el uso de un portaobjetos, en el cual se colocan, primeramente, una asada del microorganismo -ya sea que éste se encuentre en medios sólidos o en un cultivo líquido- y, posteriormente, se vierten sobre ésta una o dos gotas de la solución de

peróxido de hidrógeno al 30 %. La reacción es tan rápida que bastan unos segundos para que en la solución que está en contacto con las células, se empiecen a notar burbujas ocasionadas por el oxígeno que se desprende (3, 47).

b) Diferenciación de especie

Una vez que el aislamiento se ha identificado plenamente como Staphylococcus, puede procederse a determinar la especie correspondiente, iniciando con la prueba de la coagulasa -para establecer si se trata de S. aureus o de ECN-.

La tabla 2 muestra los patrones de identificación de las principales especies patógenas para el humano (14, 38, 59).

A continuación se describen los aspectos relevantes de las pruebas más empleadas en los laboratorios clínicos y farmacéuticos, mismas que tienen como objetivo central diferenciar entre S. aureus y los ECN -como grupo- (3, 47, 59).

Prueba de la coagulasa

La coagulasa es una proteína de composición química desconocida y que resulta relativamente termoestable, ya que

Tabla 2. Pruebas involucradas en la identificación de las principales especies estafilocócicas (59).

P R U E B A S :	1	2	3	4	5	6
COAGULASA	+	-	-	-	-	-
FACTOR AGLUTINANTE	+	-	-	-	(+)	+
TERMONUCLEASA	+	-	-	-	-	+
FOSFATASA ALCALINA	+	+	-	-	-	+
LECITINASA	+	-	-	-	-	-
ORNITINA DC	-	(d)	-	-	+	-
UREASA	d	+	-	+	d	-
RESISTENCIA A						
NOVOBIOCINA	-	-	-	+	-	-
MANITOLASA	+	(+)	-	-	+	+

CLAVES: 1 = S. aureus; 2 = S. epidermidis; 3 = S. haemolyticus; 4 = S. saprophyticus; 5 = S. lugdunensis; 6 = S. schleiferi; d = 11 a 89 % de cepas positivas; () = reacción tardía.

resiste temperaturas de hasta 60°C durante 30 minutos; es muy sensible a la acción de enzimas proteolíticas y, como posee una actividad similar a la de la protrombina -que la capacita para convertir el fibrinógeno en fibrina, aún cuando en el medio de reacción se encuentren ciertas sustancias anticoagulantes-, permite que el infectólogo la detecte mediante reacciones simples.

En cuanto a su función in vivo, ésta consiste principalmente en interferir la fagocitosis, debido a que genera la

producción de redes de fibrina alrededor de los microorganismos, impidiendo que el fagocito entre en contacto con ellos para englobarlos; sin embargo, al parecer también neutraliza la actividad antimicrobiana que el suero normal manifiesta contra los agentes infectantes (3, 47).

Tocante a su mecanismo de acción, existen evidencias de que la coagulasa puede inducir la activación de un mecanismo alterno de coagulación, habilitando a un componente del plasma, denominado factor reactivo de la coagulasa o FRC, para convertir el fibrinógeno en fibrina (47).

De hecho, se sugiere que la coagulasa es una sustancia muy parecida a la protrombina que, al reaccionar con el FRC, forma un compuesto muy parecido a la trombina. Este paso es el decisivo porque, como es sabido, es la trombina la que activa al fibrinógeno para formar fibrina en el proceso normal de la coagulación.

De acuerdo a lo anterior, la coagulasa origina la coagulación del plasma en dos pasos: inicialmente se verifica una reacción entre la enzima producida por el microorganismo y el FRC y, posteriormente, las redes de fibrina son producidas por efecto del complejo formado en el paso anterior (3, 47).

De hecho, existen una coincidencia y una diferencia entre los mecanismos de la coagulación sanguínea y el que implica a la coagulasa: ambos requieren de fibrinógeno, pero el que implica a la enzima estafilocócica no necesita de la presencia de iones Ca^{++} .

En este sentido, debe recordarse que el plasma -a diferencia del suero- siempre contiene algún anticoagulante que mantiene atrapado al Ca^{++} . De esta manera, el hecho de que ocurra la coagulación durante la prueba, permite acreditar al microorganismo como productor de coagulasa. Sin embargo, para que lo anterior se considere como posibilidad única, es necesario que la cepa analizada sea pura, ya que otros microorganismos podrían utilizar al anticoagulante como fuente de carbono y, al degradarlo, la consecuente liberación del Ca^{++} reactivaría la ruta que se presenta en el organismo (47).

Otro aspecto importante en la realización de la prueba, radica en la elección del plasma que se va a emplear; debe considerarse principalmente su origen, ya que se ha encontrado que algunas cepas presentan resultados positivos con el humano y el de conejo, pero negativos con el de bovino (3, 47).

Para llevar a cabo la prueba, se adicionan asépticamente 0.5

ml de plasma de conejo reconstituido en un tubo de ensayo estéril, al que posteriormente le son agregados 0.5 ml de un cultivo líquido y puro de 18-24 h del microorganismo analizado; los componentes se mezclan rotando el tubo y se procede a incubar a 37°C hasta que se observe la formación, bien sea de redes de fibrina o de un coágulo.

La reacción se considerará positiva si ocurre cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo. Las bacterias coagulasa fuertemente positiva pueden producir el coágulo dentro de las primeras cuatro horas, razón por la que es recomendable leer el resultado a intervalos de 30 minutos, ya que S. aureus también produce fibrinolisinás, y la acción de éstas puede destruir el coágulo, provocando la obtención de resultados falsos negativos cuando se toman las lecturas en lapsos mayores. Otras cepas de S. aureus sólo son capaces de producir suficiente cantidad de coagulasa hasta que transcurren cerca de 18 h. Por tal motivo, es conveniente revisar nuevamente a las 24 h los cultivos que en los primeros tiempos se observen como coagulasa negativa (3, 47).

Finalmente, es importante hacer notar que, a mayor virulencia de la cepa analizada, menor será el tiempo en que la prueba se manifieste como positiva (47).

Prueba del factor aglutinante

El factor aglutinante -antes conocido como coagulasa ligada- debe su nombre actual a que las pruebas en que se manifiesta aparentan reacciones de aglutinación; dicha sustancia se encuentra íntimamente ligada a la célula bacteriana (aunque se desconoce la naturaleza de dicha unión), por lo cual no se encuentra en filtrados de cultivos y puede ser detectada mediante una prueba en portaobjetos. Por otra parte, el hecho de que su reactividad no se vea afectada por la acción de anticuerpos inducidos por la coagulasa demuestra que la estructura química de ambas es diferente, además de que convierte el fibrinógeno en fibrina directamente, sin la necesidad de que intervengan factores plasmáticos (3, 47).

La realización de la prueba es sencilla y rápida, ya que basta poner en un portaobjetos una colonia del microorganismo suspendida en solución fisiológica estéril homogeneizada y, a un lado de ella, una gota de plasma; ambas partes se mezclan perfectamente con un aplicador de madera y la observación de un precipitado granular o de acúmulos blancos al cabo de 20 a 30 segundos deberá interpretarse como positiva; cuando estas características no se presentan dentro de los dos o tres minutos siguientes a la ejecución, la prueba se reportará negativa (3, 47).

Es importante mencionar que el factor aglutinante y la

coagulasa pueden tener el mismo valor diagnóstico en los laboratorios clínicos, siempre que el primero se haya detectado en la prueba correspondiente. Sin embargo, cuando sólo se realiza la prueba del factor aglutinante y resulta negativa, el analista estará obligado a llevar a cabo la prueba de la coagulasa, en razón de que 15 a 45 % de las cepas de S. aureus no son productoras de factor aglutinante (47).

Prueba de la nucleasa termoestable

Otro recurso utilizado para clasificar a los estafilococos dentro de la especie S. aureus, está basado en la detección de enzimas capaces de degradar al DNA. Sin embargo, se ha comprobado que en dicho género existen dos complejos diferentes que catalizan la reacción, a los cuales se conoce como DNasa termolábil y DNasa termoestable, respectivamente, y que en realidad sólo el segundo de ellos puede establecer la presencia de S. aureus -aunque este microorganismo sintetiza ambos- (3, 47).

Para demostrar la existencia de los dos complejos enzimáticos en los estafilococos, los investigadores recurrieron a introducir una pequeña variante en la metodología original, la cual consiste en exponer a la cepa -cuya actividad se desea investigar-, a temperaturas de 90 a

100°C, antes de inocularse en el medio que contiene al sustrato.

Al complejo enzimático capaz de llevar a cabo su actividad degradativa después de haber sido expuesto a la temperatura, se le conoce como DNasa estable al calor o termorresistente, mientras que, al que pierde esa capacidad, se le denomina DNasa termolábil (3, 47).

Las formas termorresistente y termolábil se han puesto de manifiesto en la mayoría de los ECP, en tanto que en los ECN sólo se ha demostrado la presencia de la última de ellas. Sin embargo, la prueba considerada como definitiva para la detección de Staphylococcus aureus -tanto en las industrias alimentaria y farmacéutica, como en el laboratorio clínico- es la prueba de la coagulasa (47).

La metodología que se sigue para llevar a cabo la prueba que evalúa la producción de DNasa por los microorganismos, es bastante sencilla: se parte de un cultivo puro del microorganismo cuya actividad se desea probar -ya sea que se tenga en un medio líquido o en uno sólido-, el cual se siembra por estría en el medio agar para DNasa, que contiene DNA entre sus componentes; posteriormente se incuba a 35°C durante 18-24 h y, una vez que se ha obtenido desarrollo, se

adiciona 1 ml de HCl 1 N que se distribuye sobre toda la superficie del medio; al cabo de 3 minutos, aparecerán zonas transparentes alrededor de las colonias productoras de DNasa, mientras que alrededor de aquellas que no lo hagan, el medio conservará el aspecto opaco que el DNA confiere al mismo. Cabe señalar que se pueden sembrar en alguna otra porción de la superficie del medio, algunas cepas que hagan las veces de control negativo y positivo, con el objeto de que las personas que no cuentan con experiencia en la interpretación de los resultados de esta prueba, puedan comparar entre una reacción positiva y una negativa (3, 47).

En cuanto a la prueba que evalúa de una manera cualitativa únicamente la producción de DNasa termorresistente, ésta tiene como variantes que el cultivo puro de microorganismos por probar debe tenerse en forma líquida, de tal manera que antes de ser sembrado en el medio agar para DNasa, pueda resistir una exposición a la temperatura de un baño de agua hirviendo durante 15 minutos, sin que por ello pueda verse fundido el medio o inundado el cultivo (lo cual puede ocurrir si en su lugar es expuesta una placa que contenga medio sólido); la metodología posterior es la misma que la anteriormente mencionada (3, 47).

Prueba de la lecitinasa

La lecitina o yema de huevo, es un fosfolípido y representa

el sustrato natural sobre el cual actúan las lecitinasas (47).

Desde el punto de vista de la identificación de S. aureus, esta prueba es la más utilizada en análisis de alimentos para detectar la presencia de esta especie, misma que figura entre los principales agentes causales de intoxicaciones alimentarias (3, 47).

La prueba consiste en inocular las muestras en el medio Baird Parker, que se elabora adicionando yema de huevo a la base. El fosfolípido confiere una turbiedad evidente al medio, y ésta se pierde alrededor de las colonias lecitinasa positiva, previa incubación de 24 h a 35°C.

Cabe mencionar que el medio Baird Parker también contiene 1 % de telurito de potasio, por lo cual las colonias de S. aureus manifestarán una coloración negra, además de ser circundadas por halos transparentes asociados a la hidrólisis de la lecitina (47)

Prueba de la manitolasa

Con este nombre se conoce al sistema enzimático mediante el cual una célula bacteriana es capaz de llevar a cabo la utilización de manitol; químicamente, éste es un

azúcar-alcohol o un alcohol polihídrico, muy similar a otros -adonitol, dulcitol y sorbitol-, que también son producidos a partir de la reducción de monosacáridos (3, 47).

La vía mediante la cual S. aureus metaboliza a este compuesto es la glicólisis, misma que sucede una vez que han ocurrido reacciones en las que se ven involucradas isomerasas, ligasas, transferasas y oxidorreductasas, para transformar al manitol o a la manosa -según el caso-, en fructosa-6-fosfato (47).

De esta manera, el sustrato será incorporado al sistema Embden-Meyerhoff-Parnas, cuyos productos finales ácidos provocarán una disminución en el pH del medio de cultivo, que podrá detectarse mediante el vire a amarillo del indicador rojo de fenol.

La prueba de la manitolasa constituye una reacción que, dada su aceptable exactitud y sencillez, es utilizada en muchos laboratorios para diferenciar a la especie S. aureus -que la da positiva- de la mayoría de los ECN -que no lo hacen-. Puede ser llevada a cabo tanto en medio sólido como en medio líquido, si bien una parte de los analistas prefiere efectuarla en el primero, al mismo tiempo que se aísla al microorganismo en medios selectivos con alta concentración de NaCl -como el manitol sal agar- (3, 47).

De esta manera, se reduce el tiempo de diagnóstico, aunque existe un serio inconveniente: el índice de confiabilidad de la prueba no es del 100 % y, de no realizarse también la reacción de la coagulasa, se estará corriendo el riesgo de reportar erróneamente al microorganismo aislado, con toda la problemática que ello origina (3, 47, 59).

La técnica se reduce a sembrar la muestra o a la bacteria en manitol sal agar o en caldo manitol rojo de fenol -respectivamente-, dado que sus composiciones incluyen tanto al sustrato como el indicador; los medios se incuban posteriormente durante 24 h, después de las cuales se hará la lectura de los resultados, interpretándose la prueba como positiva cuando el indicador del medio ha virado a amarillo o, como negativa, cuando dicha coloración es roja.

Cabe mencionar que en algunos laboratorios se prefiere realizarla en el medio líquido dado que, a la vez que se lleva a cabo, se obtiene el cultivo líquido de 24 h a partir del cual puede llevarse a cabo la prueba de la coagulasa en tubo; esto implica un considerable aumento en el tiempo de identificación, pero con ello se aumenta la confiabilidad del diagnóstico (3, 47).

II. PARTE EXPERIMENTAL

i. Equipo, material, reactivos y medios de cultivo

- Autoclave
- Cuentacolonias
- Impactadores de cascada tipo Andersen, de 2 etapas
- Incubadora ajustada a 35^oC
- Microscopio óptico
- Refrigerador (4^oC)

- Asa bacteriológica
- Gradillas
- Mecheros Bunsen
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Portaobjetos
- Tubos de ensayo de 13 x 100.

- Aceite de inmersión
- alfa-naftol al 5 % en etanol
- Betaína
- Clorhidrato de tetrametil p-fenilendiamina
- Colorantes y reactivos de Gram
- Hidróxido de potasio al 40 %

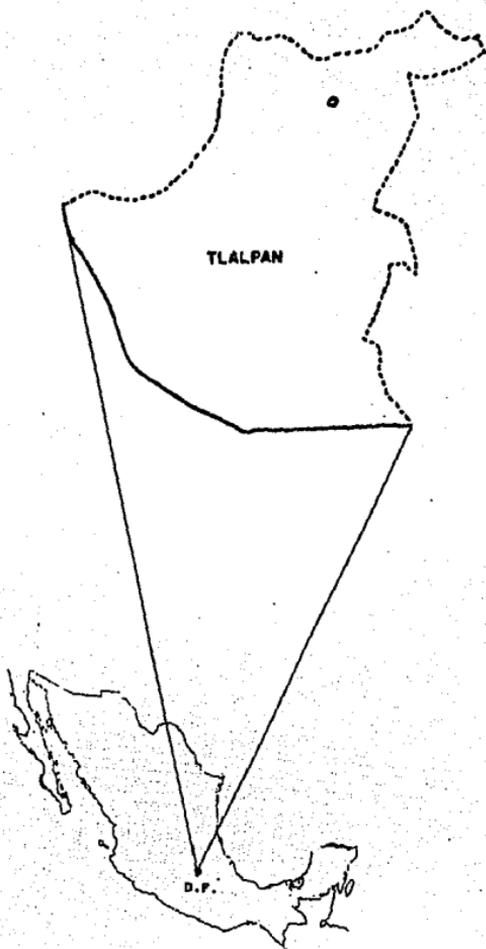
- Hidróxido de sodio al 0.5 %
- Peróxido de hidrógeno al 30 %
- Plasma de conejo liofilizado
- Agar S110 (en placa)
- Agar tripticase-soya (en placa)
- Caldo manitol rojo de fenol (en tubo)
- Caldo RMVP (en tubo)

ii. Area de estudio

La totalidad de las muestras se obtuvo en la zona Sur de la Ciudad de México, cuyas características topográficas y climatológicas son las siguientes:

La Ciudad de México tiene una superficie de 9,500 Km², se localiza en la porción meridional de la Altiplanicie Mexicana, en la región denominada Cuenca de México. Esta última se encuentra rodeada de montañas, lo que propicia una circulación de vientos provenientes del noroeste-noreste.

El número de días despejados fluctúa entre 100 y 200 al año y la incidencia de radiación solar varía de 450 a 475 calorías/cm²/día. Su clima se considera tropical de montaña, es decir que, aunque la temperatura es menguada por lo elevado de la altura del Valle, otros rasgos climáticos como



LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO

la regularidad e intensidad de los aguaceros son típicos de los trópicos, además de encontrarse durante la estación invernal bajo la influencia de las masas polares, característica de las zonas templadas ubicadas fuera de los trópicos (6).

De esa manera, el clima es determinado por los sistemas atmosféricos tropicales y extratropicales, distinguiéndose 2 estaciones bien definidas: el semestre de "secas", de noviembre a abril, y la época de "lluvias", de mayo a octubre (37).

La zona específica muestreada fue la Delegación de Tlalpan; tiene una superficie de 310.8 Km^2 , lo cual la convierte en la más extensa, pues representa el 20.3 % del territorio del D.F. Se encuentra comprendida entre las coordenadas de latitud $19^{\circ}05'00''$ norte y $19^{\circ}18'45''$ sur y con una longitud $99^{\circ}07'30''$ este y $99^{\circ}18'30''$ oeste.

Su altitud mínima es de 2,250 msnm, en tanto que la máxima alcanza los 3,930 msnm. Por otra parte, su relieve es escarpado -en su mayoría-, debido a las formas volcánicas individuales o en conjunto, que son parte de la Sierra del Ajusco. Presenta un clima templado subhúmedo con lluvias en verano y, debido a su extensión y a sus diferencias en

altitud, su régimen térmico es muy variable, manifestando una temperatura media anual de 15°C (36).

Evidentemente, las características antes señaladas afectan la humedad de su atmósfera y, por lo tanto, la frecuencia y volumen de las precipitaciones pluviales.

iii. Recolección de las muestras

En este trabajo se muestrearon 26 casas-habitación ubicadas en la Delegación de Tlalpan, considerando recolecciones simultáneas intra y extramuros, tanto en época de secas (noviembre de 1992 a marzo de 1993) como en la de lluvias (agosto a octubre de 1993), durante 15 minutos en cada oportunidad y en un horario de 10 a 12:30 h.

Los muestreadores Andersen (de 2 etapas) se colocaron en torres de aluminio, a una altura de 2 m sobre el nivel del suelo, por tratarse de las condiciones óptimas empleadas en las investigaciones aerobiológicas asociadas a salud pública, para caracterizar y determinar partículas potencialmente respirables.

Lógicamente, este equipo se esterilizó previamente con una solución de isopropanol al 5 %, colocándosele las placas con agar tripticase soya (20 ml) antes de la transportación.

Transcurrido el tiempo de exposición, las cajas Petri se retiraron y taparon, sometiéndose a una incubación de 48 h a 35°C, al regresar al laboratorio.

iv. Análisis microbiológico

Una vez que se llevó a cabo la recolección de las muestras, las placas con agar soya-tripticaseína se incubaron a 35°C durante 48 h y las colonias se cuantificaron con la ayuda de un cuentacolónias.

Posteriormente, se anotaron los siguientes datos asociados a las cajas de Petri con medio de impactación:

- a) Etapa de impactación (E1 ó E2)
- b) Lugar de muestreo (extramuros -E- ó intramuros -I-)
- c) Medio de cultivo empleado: agar soya-tripticaseína con 0.5 g/L de cicloheximida (con o sin betaína)
- d) Cuenta corregida de colonias por etapa, obtenida mediante la fórmula:

$$C = N \ln N / N - P, \quad \text{donde:}$$

C = cuenta corregida de colonias por etapa

N = número de orificios en la placa perforada -200-

P = número de orificios positivos (desarrollo de colonias)

De esta manera, se calculó el número de UFC para cada etapa; cabe señalar que la suma de UFC en ambas etapas proporcionó el número total de UFC en cada muestreo. Adicionalmente, debido a que la velocidad del flujo de aire se mantuvo constante (a 1 pie³/min), el volumen de aire aspirado coincidió con el número de minutos en cada muestreo; en este sentido, al dividirse el número de UFC entre el tiempo se determinó el total de UFC/pie³ pero, para obtener esta última cifra en m³, se multiplicó por una constante K=35 (55):

$$\text{UFC/m}^3 = (\text{UFC del total de las etapas}) (K) / t, \quad \text{donde:}$$

K = constante de conversión, de pie³ a m³ -35-

t = tiempo de muestreo -15 minutos-

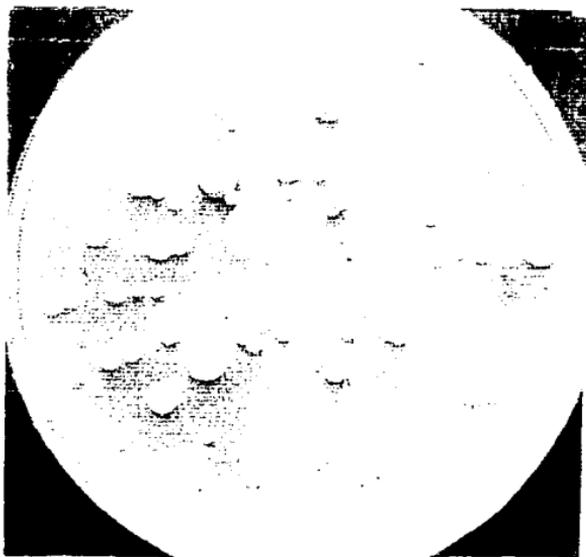
Identificación de las colonias obtenidas

Se realizó considerando las características macroscópicas de las colonias, en cuanto a tamaño, forma, color, aspecto y consistencia, si bien después se observaron a inmersión, previo frotis al Gram, para establecer forma, agrupación y Gram.

De acuerdo con dichos parámetros primarios, los cocos Gram positivos se sembraron en agar S110 y, en los casos en los



CAJA DE PETRI CON DESARROLLO DE AEROBACTERIAS TOTALES.
FRACCION NO RESPIRABLE.



CAJA DE PETRI CON DESARROLLO DE AEROBACTERIAS TOTALES
FRACCION RESPIRABLE.

que ocurría el crecimiento, se les sometía a la prueba de la catalasa -para detectar al género Enterococcus, que la da negativa (a diferencia de Staphylococcus y Micrococcus).

Posteriormente, se efectuaron las pruebas de oxidasa y Voges Proskauer a las colonias catalasa positiva, para discriminar entre Staphylococcus (que las da negativa y positiva, respectivamente) y Micrococcus (que las da exactamente al revés).

Finalmente, se realizó la prueba de la coagulasa a los microorganismos identificados como Staphylococcus, para reconocer entre S. aureus y los estafilócocos coagulasa negativa (ECN).

v. Resultados

Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 3 y 4, así como en las gráficas 1 a la 4.

Globalizando, puede señalarse que, al dividirse el número de aerobacterias totales/m³ (36,014) entre la cantidad de muestras analizadas (52), se obtiene el número promedio de aerobacterias/m³ del aire (693) existente en la región geográfica estudiada.

Tabla 3. Aerobacterias mesófilas aerobias totales.

<u>PARAMETRO</u>	<u>UFC</u>	<u>UFC/m³</u>	<u>%</u>
Secas	8,459	19,737	54.8
Lluvias	6,976	16,277	45.2
Interior	9,317	21,739	60.4
Exterior	6,118	14,275	39.6
Etapa 1	9,177	21,413	59.5
Etapa 2	6,258	14,602	40.5
TSA + B*	6,424	14,990	50.4
TSA	6,309	14,772	49.6

* = Betaína.

Tabla 4. Proporción (%) de aerobacterias mesófilas, en relación a los parámetros analizados.

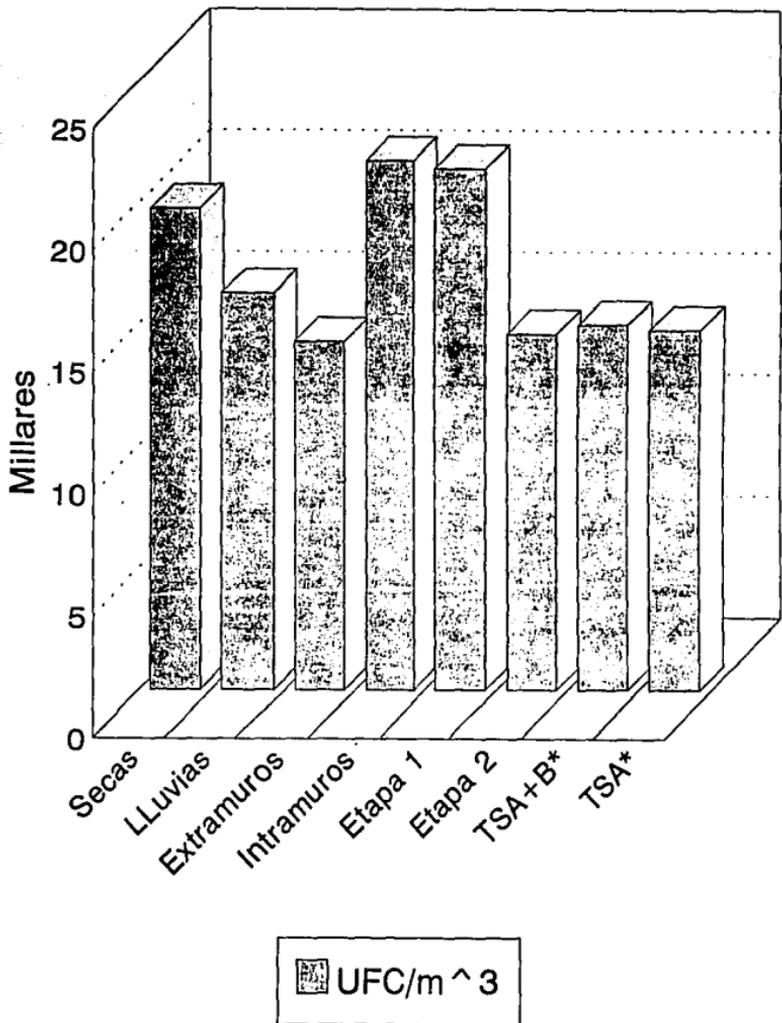
<u>PARAMETRO</u>	<u>INTRAMUROS</u>	<u>EXTRAMUROS</u>	<u>ETAPA 1</u>	<u>ETAPA 2</u>
Secas	51.49	61.97	40.89	59.10
Lluvias	48.50	38.02	40.13	59.87
Etapa 1	57.38	62.60	-----	-----
Etapa 2	42.62	37.40	-----	-----

Tabla 5. Cuenta total de estafilococos y micrococos en el total de muestras analizadas.

<u>PARAMETRO</u>	<u>ECN</u>	<u>ECN</u>	<u>ECP</u>	<u>ECP</u>	<u>--Micrococcus--</u>	
	<u>UFC</u>	<u>%</u>	<u>UFC</u>	<u>%</u>	<u>-UFC-</u>	<u>%</u>
Secas	521	71.1	6	75.0	1,224	42.1
Lluvias	212	28.9	2	25.0	1,680	57.9
Interior	449	61.3	5	62.5	1,600	55.1
Exterior	284	38.7	3	37.5	1,304	44.9
Etapa 1	394	53.8	5	62.5	1,640	56.5
Etapa 2	339	46.2	3	37.5	1,264	43.5

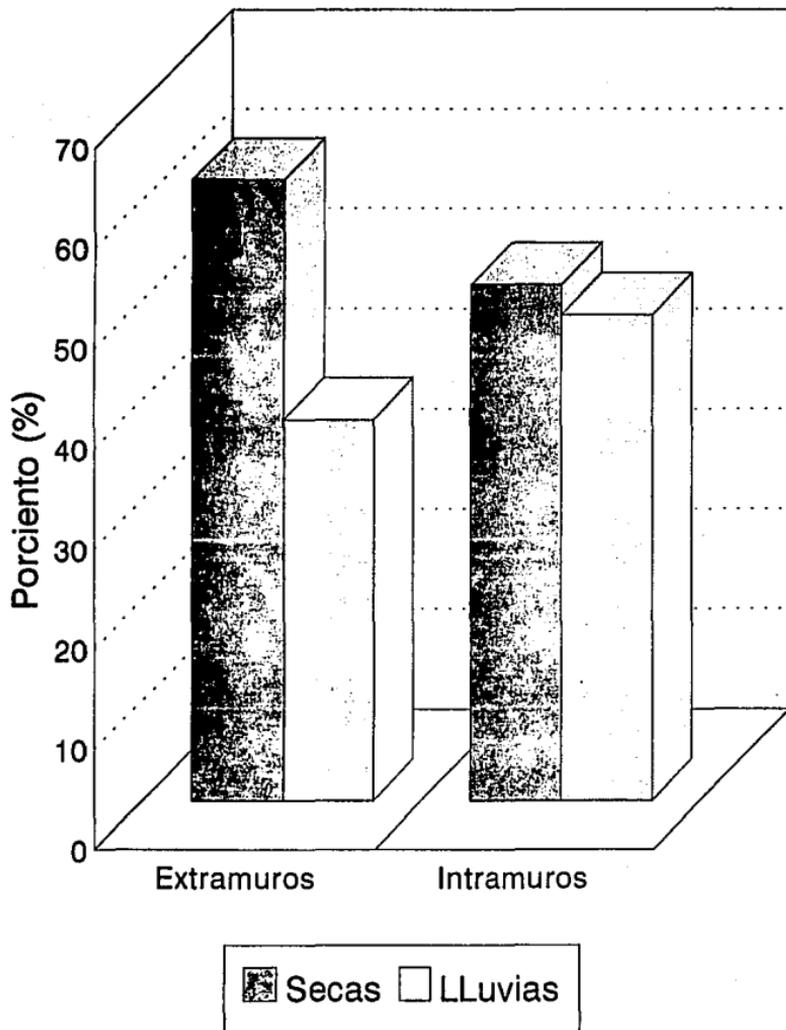
Tal como lo muestran la tablas 3 y 4, así como las gráficas

GRAFICA 1. Bacterias totales

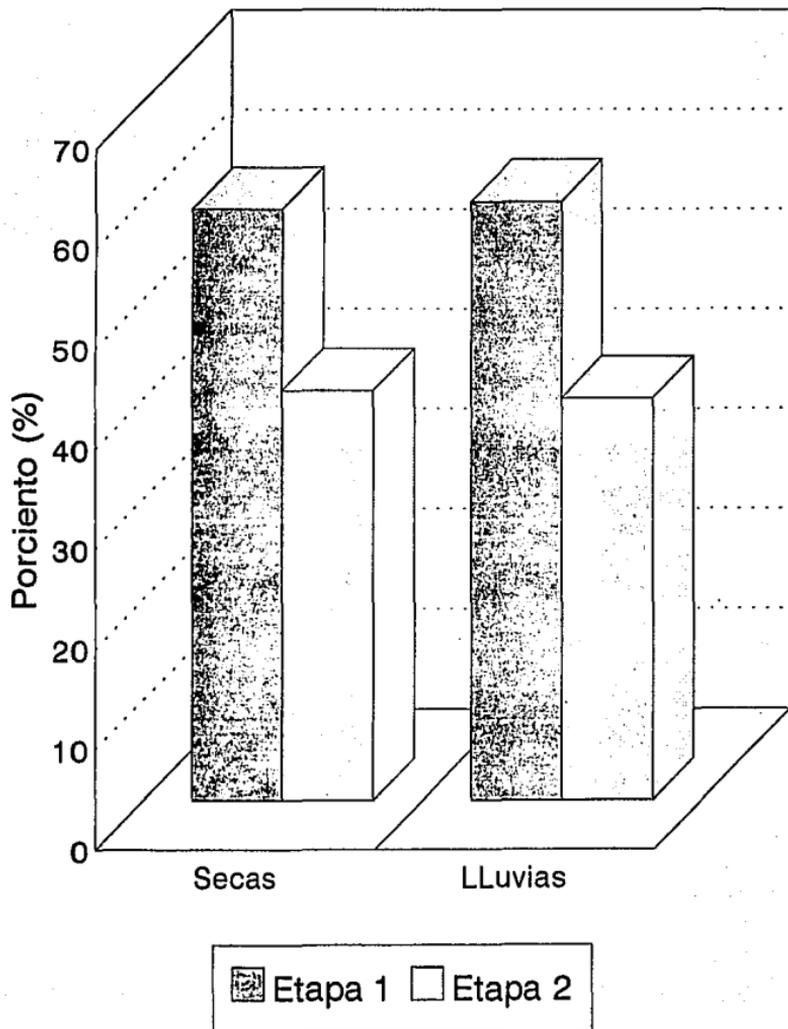


* = 10 Muestras en secas y 10 en lluvias

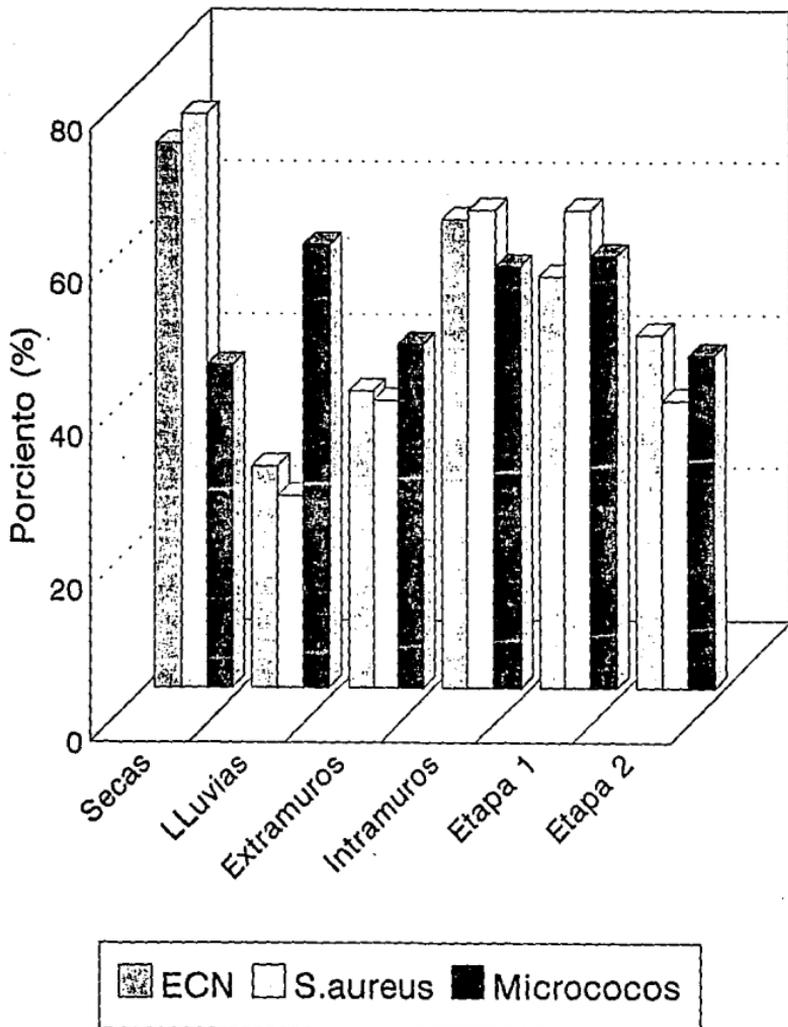
**GRAFICA 2. Aerobacterias en secas y lluvias:
Extramuros vs intramuros**



**GRAFICA 3. Aerobacterias en secas y lluvias:
Etapa 1 vs Etapa 2**



GRAFICA 4. Estafilococos y Micrococcos
en ambientes aéreos



1, 2 y 3, la cantidad de aerobacterias resulta mayor en la época de secas que en la de lluvias, en la atmósfera intramural que en la extramural y en la etapa 1 que en la 2.

Asimismo, se observa que las cajas Petri que contenían betaína, no reflejaron un aumento de UFC/m³, en comparación con las que carecían de este osmoprotector.

La gráfica 2 evidencia que, en extramuros, la proporción secas vs. lluvias difiere notablemente (62 vs. 38) respecto a la obtenida en intramuros (51.5 vs. 48.5).

Por su parte, la gráfica 3 subraya que la relación entre las etapas 1 y 2 (60 vs. 40) no varía en relación a la época de muestreo.

Finalmente, la tabla 5 y la gráfica 4 muestran que la proporción de estafilococos y micrococos resulta mayor en secas, intramuros y en la etapa 1, excepto en el caso de los segundos, cuya abundancia es más elevada durante la época de lluvias.

vi. Discusión

vi.1. Con respecto a las aerobacterias totales:

En relación a la mayor abundancia de aerobacterias durante

las épocas de secas que en lluvias, debe considerarse que ello obedece al hecho de que el agua de lluvia origina que las biopartículas del aire se proyecten hacia el suelo, en tanto que tal fenómeno no ocurre en secas cuando, por el contrario, los vientos favorecen la incorporación de microorganismos al aire, principalmente a partir del suelo (40, 66).

El balance global en cuanto a las cifras que se generan durante los climas lluviosos y secos marca una mayor carga aerobacteriana en estos últimos, aún cuando su menor humedad suele afectar a los microorganismos (33).

A este respecto, es preciso subrayar que la desecación representa un factor físico que compromete, tanto la viabilidad de las aerobacterias, como las probabilidades de que éstas puedan desarrollar en los medios de cultivo que se emplean comúnmente para detectar su presencia en las muestras (51).

En otras palabras, la desecación puede influir decisivamente para que muera gran parte de los microorganismos transportados por el aire, al generar la pérdida de su estabilidad orgánica: bajo tales condiciones, la alteración de la homeostasia intracelular puede llegar hasta el "punto

sin retorno" en cuanto a viabilidad, al perderse el medio acuoso que se requiere para que ocurran las reacciones bioquímicas mínimas suficientes de sobrevivencia; de hecho, se incrementan los solutos intracitoplásmicos -algunos de los cuales se precipitan y/o se desnaturalizan- y no existe síntesis ni degradación de moléculas vitales (12).

Dependiendo de lo prolongado de los tiempos involucrados, el muestreo contempla la obtención de microorganismos muertos y en estado de estrés y, por lo tanto, sólo resultan detectables aquéllos cuya situación metabólica les permite una rápida recuperación al impactarse en el medio de cultivo (50).

Por tal motivo, puede concluirse que la cantidad de aerobacterias durante la época de secas debe ser considerablemente mayor que la que aparece en climas lluviosos, puesto que aún cuando la desecación afecta la viabilidad de muchas de ellas, este fenómeno resulta de menor trascendencia, en relación al que proyecta las aeropartículas sobre el suelo, por efecto de las gotas de lluvia.

En otro contexto, la comparación entre las biopartículas del aire, en extramuros e intramuros, manifiesta una mayor abundancia de aquéllas en ambientes cerrados que en los abiertos.

Las principales razones a citar son: la acumulación intramuros de los microorganismos liberadas al aire por quienes habitan los espacios cerrados y la relativa regularidad con la que éstos presentan una constante humedad, generada por el vapor de agua que se desprenden de las actividades humanas, tales como el baño diario, el cocimiento de alimentos acuosos (sopas y guisados), etc.

En el primer caso, es obligado hacer mención de la cuantiosa flora habitual de boca y vías respiratorias altas del ser humano, por cuanto que numerosas bacterias de este origen suelen proyectarse hacia el aire a través de los estornudos, los accesos tusígenos y la conversación (20, 30).

Evidentemente, dichos factores son determinantes en el contagio de enfermedades respiratorias, tales como faringoamigdalitis, sinusitis, bronquitis y neumonía, entre algunas otras, debido a que los microorganismos implicados son liberados formando parte de microgotas de saliva, las cuales disminuyen decisivamente el riesgo de desecación y conservan su viabilidad hasta que son inhalados por quienes resultan susceptibles. De hecho, debe recordarse que muchas ocasiones son los padres quienes fungen como "focos infecciosos" de estreptococos beta hemolíticos o de otras especies en las enfermedades de los hijos y, frecuentemente,

las terapéuticas involucran tanto a unos como a los otros, aunque los primeros aparenten encontrarse en condiciones de salud (27).

En otras palabras, la mayor abundancia de aerobacterias en ambientes intramuros se desprende de que en éstos suele encontrarse una biocarga adicional de origen humano y de que la totalidad de microorganismos se encuentra concentrada en espacios más reducidos por tiempos más prolongados.

Sin embargo, considerando lo subrayado en la gráfica 2, en relación a la proporción de la cantidad de bacterias que se detectaron durante la época de lluvias, a lo mencionado en el párrafo anterior, debe adicionarse que, en intramuros, las aerobacterias también están menos expuestas a la desecación durante todo el año.

En otro orden de ideas, refiriéndose a la notable diferencia que se observa entre las etapas 1 y 2 de muestreo, es preciso señalar que, en la primera, se obtienen aeropartículas de mayor tamaño, las cuales por esta razón suelen contener cantidades más grandes de microorganismos.

No obstante, la etapa 2 resulta más representativa en relación directa al ser humano, debido a que detecta las

biopartículas que pueden penetrar -vía inhalatoria- al sistema respiratorio, ya sea para incorporarse a la flora habitual del tracto superior, o para ocasionar eventualmente afecciones respiratorias (10, 41, 65).

Lógicamente, el hecho de que los muestreos contemplen la utilización del agar tripticaseína-soya y de que las incubaciones no excedan las 48 h, impide que en la etapa 2 se puedan detectar microorganismos patógenos muy delicados o exigentes, e inclusive, que se logren aislar micobacterias generadoras de neumonías graves.

De cualquier manera, la notable cantidad de bacterias obtenidas demuestra ampliamente que la aérea es una de las principales vías mediante las cuales se adquieren los padecimientos humanos y que este mecanismo es incontrolable desde el punto de vista epidemiológico (31).

Finalmente, puede deducirse que la utilización de osmoprotectores microbianos sólo aporta una efectividad muy relativa a los análisis de aerobacterias, puesto que así lo sugieren las cifras de UFC/m³ obtenidas con betaína y sin ella.

En relación a este último párrafo, es importante recordar que

el estado de estrés bacteriano suele revertirse mediante el empleo de medios enriquecidos que favorecen la recuperación, hasta el grado de lograr la capacidad de reproducción, si bien la anomalía más dañina difiere entre las diversas especies, e inclusive, dentro de las diferentes condiciones fisicoquímicas que predominan en cada región geográfica analizada (29, 50).

vi.2. En relación a los estafilococos y micrococos:

La gráfica 4 demuestra la presencia de estos microorganismos en la atmósfera intra y extramural de la zona muestreada, si bien es claro que Micrococcus es más frecuente que Staphylococcus.

Lo anterior implica que los cocos Gram positivos de vida libre (Micrococcus) son más abundantes que los de origen humano y animal (Staphylococcus) en los ambientes aéreos, principalmente en aquéllos que son abiertos.

Estos resultados difieren notablemente de los obtenidos en otras regiones geográficas; por ejemplo, en 1993, Tong Yongyi y cols llevaron a cabo estudios similares en Beijing, China, obteniendo aproximadamente un 30 % de estafilococos y 7 % de Micrococcus, en relación a las bacterias totales (66).

Sin embargo, en E.U.A. se encontraron recientemente cifras de

41 % de Micrococcus y 11 % de estafilococos, las cuales resultan muy similares a las del presente trabajo (48).

Independientemente de lo anterior, se observan porcentajes mayores de ambos géneros en la etapa 1, lo cual determina su mejor ocurrencia en aeropartículas de mayor tamaño. No obstante, es más importante la presencia de S. aureus en la etapa 2, estableciendo su notable capacidad de ser inhaladas dentro de los espacios cerrados, tal como sucede dentro de los ambientes intrahospitalarios, en donde su interés sólo es rebasado por el de Pseudomonas aeruginosa (31, 44).

En este sentido, es incuestionable la utilidad de los muestreadores de cascada Andersen dentro de los nosocomios, a la vez que se analizan las expectoraciones y/o los aspirados transtraqueales de los pacientes que manifiestan trastornos del tracto respiratorio inferior (41, 67).

Del mismo modo, debe recomendarse el uso de este tipo de muestreadores dentro de la industria farmacéutica, principalmente en las diversas zonas estériles, en donde se realizan análisis microbiológicos o llenados de ampollitas y de otro tipo de recipientes, con fármacos estériles (2, 39).

Indudablemente, los métodos de muestreo del aire por

sedimentación (la simple apertura temporal de placas con medio de cultivo), deben sustituirse por los que contemplan el uso del impactador Andersen, a fin de proporcionar una mayor confiabilidad a los estudios.

CONCLUSIONES

- 1..Las bacterias figuran entre los contaminantes comunes del aire, en la atmósfera intramural. Sin embargo, sólo una parte de ellas resulta susceptible de ser inhalada por el ser humano.
- 2..En ambientes extramurales, la abundancia de las aerobacterias totales suele ser mayor en la época de secas que en la de lluvias.
- 3..El contenido de bacterias es mayor en las aeropartículas no respirables, mismas que se detectan en la etapa 1 del muestreador Andersen.
- 4..Aparentemente, el empleo de la betaína -como osmoprotector-, no incrementa la confiabilidad de los métodos implicados en el análisis microbiológico del aire.
- 5..La mayor parte de las aerobacterias no es de origen humano; el número de Staphylococcus es notablemente menor que el de Micrococcus.
- 6..Independientemente de su finalidad, las muestras involucradas en los estudios microbiológicos del aire deben recolectarse con impactadores tipo Andersen, a fin de obtener resultados representativos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1..Andersen A.: New sampler for the collection, size and enumeration of viable airborne particle. J Bacteriol, 1958; 76: 471-484.
- 2..Andersen Sampler.
OPERATING MANUAL FOR ANDERSEN SAMPLER, INC
Atlanta, 1984.
- 3..Balows A., Hausler W.J., Hermann K.L., Isenberg H.D. and Shadomy H.J.:
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
Washington, 1991.
- 4..Blanchard D.C. Jet drop enrichment of bacteria, virus and dissolved organic material. Pure and Appl Geophysics, 1978; 116:302-308.
- 5..Bovallius A.: Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden. Appl Environ Microbiol, 1978; 358(5):847-852.
- 6..Bravo H.: Climatología en el valle de México. Boletín del Instituto de Geografía, 1989; 15:22-28.
- 7..Calderón C.: Seasonal Variation of basidiospores in the atmosphere of Mexico City. Symposium of the Panamerican Aerobiology Association; 1993.

- 8..Cambell R. :
ECOLOGIA MICROBIANA
Editorial Limusa
México, 1987.
- 9..Cooper N.L. :
AN INTRODUCTION TO THE MEANING AND STRUCTURE OF PHYSICS
A Harper International Edition
Washington, 1969.
- 10..Coutiño B.R. : Importancia de los hongos en las alergias de tipo respiratorio y su estudio en México. Bol Mex Mic, 1979; 13:215-222.
- 11..Cox C.S. :
THE AEROBIOLOGICAL PATHWAY OF MICROORGANISMS
John Wiley
Gran Bretaña, 1987.
- 12..Csonka L. : Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol Rev, 1989; 53(1):121-147.
- 13..Che F. : Ecological distribution of atmospheric bacteria over Beijing and Tianjin Area. China Environ Sci, 1990; 10:192-195.
- 14..Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N. and Ginsberg H.S. :
MICROBIOLOGY
J.B. Lippincott Company, 4th edition
Philadelphia, 1990.

- 15..Daws L.F.: Effect of sunlight on bacterial survival in transparent air samples. Symp Soc Gen Microbiol, 1976; 17:31-57.
- 16..Dimmick R.L. and Akers A.B.:
AN INTRODUCTION TO EXPERIMENTAL AEROBIOLOGY
Wiley-Interscience
New York, 1969.
- 17..Dimmick R.L., Wolochow H. and Chationy M.A.: Evidence that bacteria can form cells in airborne particle. Appl and Environ Microbiol, 1979; 37(5):924-927.
- 18..Dimmick R.L., Wolochow H. and Chationy M.A.: Evidence for more than one division of bacteria within airborne particles. Appl and Environ Microbiol, 1979; 38(4):642-643.
- 19..Donaldson A.J.: Factors influencing the dispersal, survival and deposition of airborne pathogens of farm animals. Vet Bull, 1978; 48:83-94.
- 20..Edmonds R.L.:
AEROBIOLOGY, THE ECOLOGICAL SYSTEMS APPROACH
Dowden, Hotchinson and Ross, Inc
Pennsylvania, 1979.
- 21..Ehrlich R., Miller S. and Walter R.L.: Relationship between atmospheric temperature and survival of airborne bacteria. Appl Microbiol, 1970; 19(2):245-249.
- 22..Ehrlich R. and Miller S.: Survival of airborne Pasteurella

- tularensis at different atmospheric temperatures. Appl Microbiol, 1973; 25(3):369-372.
- 23..Fedorak P.M. and Westlake D.W.S.: Airborne bacterial densities at an activated sludge treatment plant. J Water Pollution Control Federation, 1980; 52(8):2185-2192.
- 24..Finogold S.M. y Baron E.J.:
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
Editorial Medica Panamericana, 7a. edición.
Buenos Aires, 1989.
- 25..Freeman B.A.:
MICROBIOLOGIA BURROWS
Editorial Interamericana McGraw Hill, 22th edition
México D.F., 1989.
- 26..Fulton J.D.: Microorganisms of the upper atmosphere. Appl Microbiol, 1966; 14(2):245-250.
- 27..Gallego B.R.: Sepsis por Estafilococo en el niño. Rev. Cubana Pediatr, 1988; 60(2):140-162.
- 28..Gauthier J.M. and Le Rudulier D.: Survival in seawater of Escherichia coli cell a grown in marine sediments containing glycine betaine. Appl and Environ Microbiol, 1990; 56(9):2915-2918.
- 29..Ghoul M., Bernard T. and Cormier M.: Evidence that Escherichia coli accumulates glicine betaine from marine sediments. Appl and Environ Microbiol, 1990; 56(2):551-554.

- 30..Gregory P.H. :
THE MICROBIOLOGY OF THE ATMOSPHERE
Leonard Hill Ltd.
Londres, 1973.
- 31..Groschel H.M.: Air Sampling in Hospitals. Annals of the New York Academy of Science, 1980; 353:230-240.
- 32..Guzmán G.J.: Interacción virus-bacteria en el aparato respiratorio. Gaceta Médica de México, 1982; 118(6):223-235.
- 33..Hatch M.T. and Dimmick R.L.: Physiological responses of airborne bacteria to shifts in relative humidity. Bacteriol Rev, 1966; 30(3):597-603.
- 34..Hileman B.: Particulate mater: The inhalable variety. Am Chem Soc, 1981; 15(9):983-986.
- 35..IMECA: Una forma de medir la contaminación. Comisión metropolitana para la prevención y control de la contaminación ambiental en el Valle de México.
- 36..Inegi: Textos no publicados; Crecimiento poblacional y sus repercusiones en la Ciudad de México. SEDUE y Consejo Nacional de Estadística, México, 1991.
- 37..Jáuregui E.: El Clima Urbano de la Ciudad de México. Boletín del Instituto de Geografía, 1975; 6:47-58.
- 38..Jawetz E., Melnick J. y Adelberg E.:
MICROBIOLOGIA MEDICA

Editorial EL Manual Moderno, 12a. edición
México, 1987.

- 39.. Johnston J.R.: A comparison of sampling methods for airborne bacteria. Environ Research, 1978; 16:279-284.
- 40.. Jones B.L. and Cookson J.T.: Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area. Appl and Environ Microbiol, 1983; 45(3):919-934.
- 41.. Kelsen S. and Mc Guckin M.: The role of airborne bacteria in the contamination of fine particle nebulizers and the development of nosocomial pneumonia. Ann NY Acad Sci, 1980; 353:218-229.
- 42.. Koneman E., Allen S., Dowell V. y Sommers H.:
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
Editorial Médica Panamericana, 3a.edición
Buenos Aires, 1992.
- 43.. Lacey J. and Lacey M.E.: Microorganisms in the air of cotton mills. Ann Occup H, 1987; 31(1):1-19.
- 44.. Larracilla A.J.: Infecciones intrahospitalarias. Rev Mex Pediatr, 1987; 54(3):99-110.
- 45.. Lidwell O.M.: Take-off of bacteria and viruses. Simp Soc Gen Microbiol, 1967; 17:116-137.
- 46.. Liddemann J. and Upper C.D.: Aerial dispersal of epiphytic

bacteria over bean plants. Appl and Environ Microbiol, 1985;
50(5):1229-1232.

47. MacFaddin J.F.:

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE
IMPORTANCIA MEDICA.

Editorial Médica Panamericana

Buenos Aires, 1990.

48. Mancinelli R.L. and Shulls W.A.: Airborne bacteria in an
urban environment. Appl and Environ Microbiol, 1978;
35(6):1095-1101.

49. Márquez M.E.:

EL MEDIO AMBIENTE

Archivo del Fondo de Cultura Económica

México D.F., 1973.

50. Marthi B. and Lighthart B.: Effects of betaine on
enumeration of airborne bacteria. Appl and Environ
Microbiol, 1990; 56(5):1286-1289.

51. McDade J. and Hall L.: Survival of gram negative bacteria in
the environment. Ann J-H, 1964; 80:192-204.

52. Miller J.F.: Size considerations for establishing a standard
for inhalable particles. J of the Air Pollution Control
Assoc, 1979; 29(6):610-615.

53. Moncayo C.F.: Búsqueda de portadores nasales de S. aureus
con una técnica de diagnóstico nueva. Colombia Médica, 1993;

14(4):136-142.

54..Murray P.R., Lawrence D.W., Kobayashi G.S. and Thompson J.H.:

MICROBIOLOGIA MEDICA

C.V. Mosby Co., 2a. edición

Madrid, 1993.

55..Niemela S.: Microbiol incidence in the upper respiratory tracts of workers in the paper industry. Appl and Environ Microbiol, 1985; 50(1):163-168.

56..Noble W.C. and Pitcher D.C.: Microbial ecology of the human skin. Adv Microbi Ecol, 1978; 2:245-289.

57..Peniche Q.E. y Garza V.R.: La importancia clínica de los estafilococos coagulasa negativa y su identificación, en el laboratorio, Lab-acta, 1993; 5(2):77-82.

58..Peniche Q.E., Garza V.R. y Castellanos Ch.N.A.: La reacción pseudoimmune y su aplicación en el diagnóstico de laboratorio de los padecimientos ocasionados por S. aureus. Lab-acta, 1990; 2(4):39-41.

59..Probisher M.:

FUNDAMENTALS OF MICROBIOLOGY

W.B.Sounders Co.,

Philadelphia, 1968.

60..Rosas I.: Airborne bacterial flora in a suburban area of Mexico City. Abstrats of the Annual Meeting of the American

Society for Microbiology, 1988.

- 61..Rosas I. and Yela A.: Aerosol containing enteric bacteria generated by wastewater treatment process. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 1989.
- 62..Rosas I. y Yela A.: Distribución estacional de aerobacterias en la Ciudad de México. Memorias del V Curso-Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación, 1987.
- 63..Roy Ocotla G.: Composición algal de la atmósfera de dos ciudades del estado de Veracruz México. Memorias del III Curso y Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación, 1985.
- 64..SEDUE.: Informe sobre el estado del medio ambiente en México, 1986; 33-41.
- 65..Taulbee B.D.: A theory of predicting respiratory tract deposition of inhaled particles in Man. Ann Occup Hyg, 1977; 20:198-213.
- 66..Tong Y.: Population study of atmospheric bacteria at the Fengtai district of Beijing on two representative days. Aerobiología, 1993; 9:192-195.
- 67..Villasmil M.: Hallazgos bacteriológicos en muestras provenientes del tracto respiratorio inferior. Kasmera, 1982; 10(2):95-121.

68..Willeke K. and Baron P.A.: The size distribution on whirpool-generated droplets, the ability to contain bacteria and their deposition potential in the human respiratorytract. Adv in Aerobiology, 1987; 361-364.

69..Wright T.J. and Greene V.M.: Viable microorganisms in an urban atmosphere. J of the Air Pollution Control Assoc, 1969; 19:336-342.