



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
Z A R A G O Z A

BUSQUEDA DE PORTADORES DE COCOS GRAM-
POSITIVOS EN UNA POBLACION ESTUDIANTIL DE
LA ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES ZARAGOZA.

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a n

JUANA SILVIA ESPINOSA BUENO
SALVADOR MONTERO LOPEZ

México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	PAGINA
I. RESUMEN.....	i
II. INTRODUCCION.....	1
III. FUNDAMENTO DEL TEMA.....	12
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
V. OBJETIVOS.....	14
VI. HIPOTESIS.....	15
VII. MATERIAL Y METODOS.....	16
VIII. RESULTADOS.....	22
IX. DISCUSION.....	29
X. CONCLUSIONES.....	34
XI. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.....	35
XII. ANEXOS.....	36
XIII. BIBLIOGRAFIA.....	50

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y DIAGRAMAS

	PAGINA
TABLA No 1.....	23
TABLA No 2.....	24
TABLA No 3.....	26
TABLA No 4.....	27
TABLA No 5.....	28
Figura No 1.....	3
Figura No 2.....	4
Figura No 3.....	37
Figura No 4.....	40
DIAGRAMA No 1.....	20
DIAGRAMA No 2.....	21

RESUMEN

La afectación de las vías respiratorias es muy frecuente en nuestro medio, su etiología es muy variada, incluyéndose cuadros infecciosos producidos por bacterias, virus, hongos y etiologías no infecciosas como el alto grado de contaminantes presentes en la atmósfera como existe en la ciudad de México. Las infecciones bacterianas generalmente resultan de una condición predisponente del huésped que favorece la invasión de las bacterias presentes como componentes de la flora normal. Por lo anterior, es importante conocer cuales bacterias están presentes en los individuos, y de que manera se puede establecer un recambio de las mismas en individuos en constante relación para poder establecer el riesgo de adquirir una infección bacteriana en las vías respiratorias.

En este trabajo se estudió a 100 adultos jóvenes de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza de las carreras de Cirujano Dentista (C.D) y Químico Farmacéutico Biólogo (Q.F.B.) cuyas edades se encuentran entre 18 a 30 años. Al determinar el estado de portador de cocos gram-positivos se encontró al *Staphylococcus aureus* en un 35 %, al estreptococos beta hemolítico del grupo A en un 2 %, al estreptococo beta hemolítico del grupo B en un 6 %, al *Streptococcus milleri* en un 4 %, a los estreptococos sp en un 3 % y en ningún caso se identificó al *Streptococcus pneumoniae*. Con el objeto de determinar el recambio en la microflora, se dividió a la población en dos grupos de estudio, grupo I población de primer ingreso y el grupo II que ha cursado la parte final de la carrera, encontrándose los cocos en estudio distribuidos al azar en ambos grupos. Se buscó la relación entre la presencia de signos de faringitis y la presencia de los cocos gram-positivos, encontrándose que 45/100 personas mostraron signos de faringitis y sólo 23 de estos portaron de las bacterias en estudio. En 2/4 aislamientos de *S. milleri* se observaron signos de

faringitis, lo que no permite inferir que se trate de un patógeno en vías respiratorias superiores. El análisis epidemiológico de las cepas de *S. aureus* reveló que existe el predominio de una cepa endémica resistente a ampicilina-penicilina-cloranfenicol entre la población estudiada.

INTRODUCCION

Uno de los pilares de esta investigación es el papel que juega la presencia de portadores de bacterias patógenas (cocos gram-positivos) del tracto respiratorio superior, estos portadores actúan como reservorio del microorganismo (m.o) y contribuyen a la transmisión de las infecciones respiratorias la cual es directa de persona a persona por medio de gotitas de pfluger al hablar, toser o estornudar y se forman aerosoles quedando en suspensión en el aire el tiempo suficiente para ser aspirados por huéspedes susceptibles (1,31).

En México se sabe que las infecciones respiratorias continúan ocupando los primeros lugares de mortalidad como lo demuestran las estadísticas vitales de la Secretaría de Salud, correspondiéndoles el sexto lugar de las diez principales causas de mortalidad en 1987 y el primer lugar de los diez principales casos nuevos de enfermedad en 1989 (38).

Este trabajo se encamina al estudio de agentes bacterianos, concretamente cocos gram-positivos, implicados en procesos de faringitis, para lo cual antes de abordar el tema hablaremos de conceptos que ayuden a entender la problemática del estado de portador de dichos m.o y sus implicaciones a nivel comunitario.

CLASIFICACION DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS

Las infecciones respiratorias se dividen por lo general en dos grupos principales: las del aparato respiratorio superior y las del aparato respiratorio inferior. Las infecciones respiratorias altas son: resfriado común, faringitis, epiglotitis y laringotraqueitis (Crup); causadas en mayor parte (85-90%) por virus (9,30,31,36). La epiglotitis y laringotraqueitis son frecuentemente causados por

Haemophilus influenzae y la faringitis es frecuentemente causada por *S. pyogenes* (5). Las infecciones respiratorias bajas son: bronquitis, bronquiolitis y neumonía; las cuales son por lo general de origen viral o bacteriano. Los virus causan la mayoría de los casos de bronquitis, por otra parte la neumonía (inflamación del parénquima pulmonar) es bacteriana; donde *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *Legionella sp* son los más comunes (31).

El resfriado común prevalece entre todas las infecciones respiratorias y es causado por virus. Los rinovirus se implican en aproximadamente 25 % de los resfriados en adultos, los coronavirus en más del 10 % de los casos, aunque también los virus de la parainfluenza, sincitial respiratorio, adenovirus y de la influenza han estado todos vinculados en dicho síndrome (31).

PATOGENIA

La patogenia de las infecciones por bacterias se presenta ya que durante una infección viral se invaden las células, figura No 1, de la mucosa de la nasofaringe y de la cavidad oral produciéndose edema, hiperhemia de la mucosa y de las amígdalas, así como un aumento en el volumen de las secreciones nasofaríngeas y en el número de m.o potencialmente patógenos que estas contienen. La aspiración de estas secreciones sirve como un acarreador de las bacterias que se encuentran en la faringe hasta los alveolos (29). Tanto en vías respiratorias superiores como inferiores las bacterias se adhieren, figura No 2, como en el caso de los estreptococos beta hemolíticos del grupo A, que primero se adhieren en las células de la faringe para después presentar una invasión de la mucosa del tracto respiratorio superior (31).

La faringitis es un síndrome inflamatorio de la faringe y es causado por bacterias, virus y hongos, así como también por etiologías no infecciosas como el cigarro. Usualmente se presenta con un

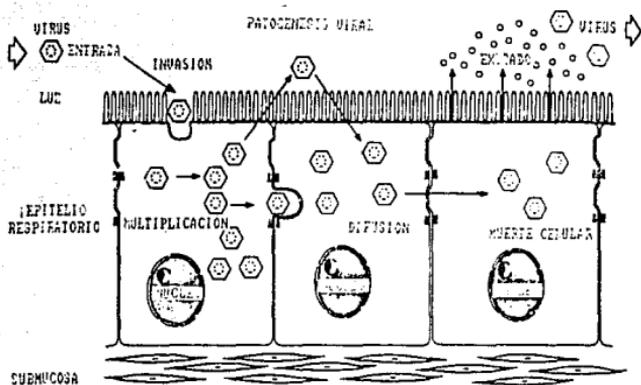


FIGURA No. 1. PTOGENESIS VIRAL EN LA INFECCION DE LA MUCOSA RESPIRATORIA.

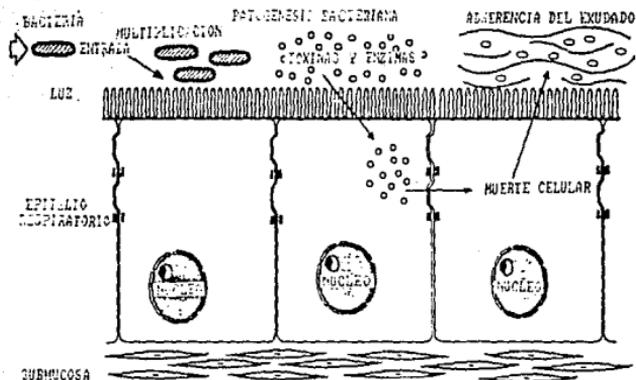


FIGURA. No. 2. PATOGENESIS BACTERIANA EN LA INFECCION DE LA MUCOSA RESPIRATORIA.

enrojecimiento, irritación, dolor o escozor de la garganta y dificultad para deglutir (1,31). La inflamación con exudado puede cubrir las amígdalas y los pilares de las amígdalas. Dependiendo del patógeno, se puede presentar fiebre y manifestaciones clínicas tales como mialgias y dolor de cabeza (31). La amigdalitis es la infección de las amígdalas (masa de tejido linfático) que se caracteriza por inflamación y tumefacción pronunciada lo cual causa dolor y dificultad al deglutir (1).

FLORA NORMAL DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR

Para llevar a cabo un acertado diagnóstico microbiológico es esencial conocer toda la variedad y el papel que desempeñan los distintos m.o que integran la flora microbiana del tracto respiratorio superior (flora microbiana normal y patógena) (14).

El término "flora microbiana normal" se refiere a la población de m.o asociados que habitan en las superficies internas y externas de los seres humanos y animales normales. Esta puede clasificarse en:

a) La flora residente, que esta compuesta de tipos relativamente fijos de m.o, los cuales se encuentran constantemente en un sitio dado a una edad, desempeña un papel definido en el mantenimiento de la salud y de las funciones normales. Puede prevenir la colonización por bacterias patógenas. La supresión de la flora normal crea evidentemente un vacío local parcial que tiende a ser llenado por m.o del ambiente o de otras partes del cuerpo; estos m.o se comportan como oportunistas y pueden volverse patógenos, así mismo pueden producir enfermedad si son introducidos a localizaciones extrañas en gran cantidad y existen factores predisponentes, por lo que los miembros de la flora residente que se encuentran en procesos patológicos son en ocasiones denominados "oportunistas".

b) La flora transitoria, esta compuesta por m.o no patógenos o sólo potencialmente patógenos hospedados en la piel o las mucosas durante horas, días o semanas; provienen del ambiente (19).

El establecimiento de la flora normal se da en el transcurso de la vida, de 4 a 12 horas después del nacimiento se presentan los estreptococos del grupo viridans como los miembros más prominentes de la flora residente del tracto respiratorio superior, permaneciendo como tales toda la vida; probablemente provienen del aparato respiratorio de la madre y del personal encargado de madre e hijo. Durante los primeros meses de vida, se van añadiendo los estafilococos anaerobios y aerobios, los diplococos gram-negativos, la *Branhamella*, los difteroides y ocasionalmente los lactobacilos (19). Cuando comienza la dentición se establecen espiroquetas anaerobias, bacteroides (especialmente *B. melaninogenicus*) especies de *fusobacterium*, especies de *Rotharia* y *Capnocytophaga*, así como algunos vibriones y lactobacilos. En los adultos se encuentran regularmente especies de *Actinomyces* en el tejido de las amígdalas, así como en las encías, y también están presentes varios protozoarios y levaduras (especies de *Candida*) (19).

Los m.o predominantes en el aparato respiratorio superior particularmente en la faringe, son estreptococos no hemolíticos y alfa hemolíticos, así como neiserias, estafilococos, difteroides, varias especies de *Haemophilus*, neumococos, *Mycoplasma* y bacteroides.

La flora de las fosas nasales consiste predominantemente en corinebacterias, estafilococos (*S. aureus*, *S. epidermidis*) y estreptococos (19).

Desde hace mucho tiempo los *Staphylococcus* Coagulasa Negativos (CNS) constituyen el mayor componente de la microflora normal, especialmente de la piel, estos organismos que anteriormente habían sido considerados saprófitos o de baja patogenicidad para humanos, sin embargo ahora varias especies CNS son reportadas como patógenos oportunistas en el humano (7).

AGENTES ETIOLÓGICOS BACTERIANOS

En cuanto a la etiología de las infecciones respiratorias, con respecto a los cocos gram-positivos, se refiere a *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus milleri* y *Staphylococcus aureus* entre los más comunes (4-6,8,11-12,14,16,18,21-23,25,28,33,35,37,39).

S. pyogenes (S. grupo A). Son cocos gram-positivos, no móviles, no forman espora, crecen en medios enriquecidos (agar sangre). Característicamente son cocos redondos o ligeramente ovoides de un diámetro de 0.6 a 1.0 micra, se encuentran en pares o en cadenas (especialmente en medios líquidos o en material clínico) de variable longitud. Las colonias que forman en agar sangre después de 18 h de incubación a 37 °C son de alrededor de 0.5 mm de diámetro, son transparentes o translúcidas, abovedadas, con superficie lisa, semimate y borde entero rodeadas de una zona de hemólisis total de aproximadamente del doble al cuádruple de la colonia. Se ha visto que estos son responsables de aproximadamente 5 a 15 % de las infecciones de las vías respiratorias superiores tales como faringitis (5), amigdalitis, angina de Vincent, así como sinusitis, otitis media, mastoiditis, neumonía (frecuentemente asociadas con una neumonitis hemorrágica y empiema), artritis, infecciones de los huesos y con menos frecuencia meningitis o endocarditis, en la piel impétigo y celulitis (7,18,20). El estado de portador en nasofaringe puede variar entre 5 a 15 % (20). El propósito principal de realizar un diagnóstico microbiológico en una faringitis es el proporcionar el tratamiento adecuado para evitar complicaciones como fiebre reumática, glomerulonefritis, celulitis de tejidos blandos o abscesos (4,5,16,36).

S. agalactiae (estreptococo beta hemolítico del grupo B). Su morfología microscópica es similar a la de *S. pyogenes*, y las colonias que forma son un poco más grandes rodeadas de una zona de beta

hemólisis mucho más pequeña y en algunas cepas la lisis puede faltar por completo. Algunas cepas dan colonias pigmentadas después de incubación en anaerobiosis (18). Inicialmente se reconocieron como parte de la flora normal del humano, pero recientemente se ha establecido que son potencialmente patógenos ya que se ha visto que causa septicémia neonatal, meningitis, neumonía en ancianos, infección urogenital, bacteriémia, endocarditis (18), sepsis en recién nacidos después de la transmisión procedente del tracto genital de las madres (6, 18). También se ha visto involucrado en la faringitis y es más probable aislarlo de las gargantas cuando están inflamadas las amígdalas, existe exudado y se encuentran inflamados los nódulos cervicales anteriores con dolor. Podría ser un patógeno cuando se identifica en la faringe de pacientes con faringitis exudativa, pues tiene capacidad invasiva y de producir infecciones supurativas. La identificación acertada de los aislamientos clínicos de los estreptococos beta hemolíticos ayudaría a la evaluación del papel que tienen los estreptococos como agentes causales de faringitis; así como Chretien et al quienes correlacionaron la presencia y causa de faringitis por los estreptococos del grupo B (6). El estado de portador varía del 5 al 15 % en nasofaringe (20).

S. pneumoniae (Neumococo). Son cocos lanceolados gram-positivos, que aparecen en forma característica como diplococos, aunque a veces forman cadenas cortas o se presentan aislados. En muestras frescas de esputo, líquido cefalorraquídeo o exudados, están rodeados frecuentemente de cápsula (polisacárido capsular específico del que se han identificado 83 tipos serológicos). Para el aislamiento primario de los neumococos se necesita un medio enriquecido (agar sangre) y atmósfera de CO₂. Después de la incubación durante 24 horas, las colonias típicas de *S. pneumoniae* en agar sangre son redondas y relucientes con sus bordes enteros, transparentes, y aproximadamente de 1 mm de diámetro. Están rodeadas de una zona de alfa hemólisis de aproximadamente 2 mm. Por lo general las colonias jóvenes tienen

forma de cúpula, pero con el envejecimiento se aplanan mostrando un borde elevado y una porción central deprimida. El habitat normal *S. pneumoniae* es la porción superior del tracto respiratorio superior en el ser humano; de allí puede invadir los pulmones y la circulación general (6). El *S. pneumoniae* es el más común de los agentes adquiridos en la comunidad (transmisión de persona a persona) y que en dado momento puede causar neumonía aguda (31). También se ha implicado en las infecciones del oído medio, y los ojos; así como el que se ha logrado aislar del líquido peritoneal, la orina, secreciones vaginales, exudados de heridas y otras muestras clínicas. El estado de portador en adultos sanos puede variar entre 30 y 70 % dependiendo de la estación del año. Debido al índice elevado de portadores en las vías respiratorias que guardan un carácter estacional, es difícil interpretar la recuperación de esta bacteria. Sin embargo, el aislamiento, sobre todo de las cepas reconocidas virulentas como los tipos 1, 3, 4, 7, 8 y 12 del esputo de un paciente con neumonía lobar suele tener importancia clínica; además el aislamiento de neumococos de la sangre o el líquido cefalorraquídeo representa una evidencia concluyente de infección neumocócica (11).

S. milleri. Su morfología microscópica es similar a la de *S. pyogenes*, forma colonias diminutas como la punta de un alfiler después de un período de incubación de 48 horas, a 37 °C en atmósfera de CO₂; son parte de la flora normal de las mucosas del hombre. Han sido reportados con significado patógeno: se les encuentra asociados con bacteriemia, endocarditis, infecciones supurativas mixtas del sistema nervioso, abdomen y pelvis (20), causando otitis media, sinusitis (15), absceso cerebral, absceso del hígado, apendicitis (23) entre otras. La evidencia de su patogenicidad se encuentra afectada por las circunstancias ya que aún cuando se ha encontrado en altas proporciones de infecciones supurativas, otras bacterias se encuentran asociadas. Habitan en la boca, tracto respiratorio superior y gastrointestinal, son generalmente comensales inocuos. Aunque *S.*

milleri se encuentra poco relativamente en tejidos blandos de la boca, un gran número de investigadores ha reportado aislamientos esporádicos de estos m.o en cultivos de gargantas inflamadas. Los aislamientos de la garganta en su mayoría presentan beta hemólisis (15). Se ha estimado que el 25 % de las cepas son beta hemolíticas y pueden presentar antígenos de los grupos A, F o G (23) y los provenientes de la placa dentobacteriana son no beta hemolíticos. Poole y Wilson encontraron una asociación de esta bacteria con los caudros de faringitis y amigdalitis(35). Se ha demostrado que *S. milleri* cuenta con 75 % de grupo C, 15 % de grupo G, 100 % de grupo F y 75 % beta hemolíticos no agrupables (23), se ha reportado así mismo un incremento prevalente en los aislamientos de faringe de los estreptococos que no pertenecen al grupo A sobre los que si pertenecen (20).

S. aureus. Es un coco gram-positivo, inmóvil, que se presenta aislado, en pares, en cadenas cortas, o en racimos irregulares. Generalmente en el aislamiento primario produce un pigmento amarillo dorado, colonias opacas, circulares, lisas y enteras, de consistencia cremosa. El m.o crece en medios de rutina y la mayor parte de las cepas fermenta el manitol y son coagulasa positivos. Pueden tolerar concentraciones relativamente elevadas de sal (7.5 a 10 %). En el medio Sal y Manitol las colonias se rodean por un halo amarillo después de 24 a 48 horas lo cual indica la fermentación del manitol (11,18,29). *S. aureus* es frecuentemente encontrado en nasofaringe, bucofaringe y amígdalas, puede intervenir en diversos procesos patológicos de la garganta (18), se encuentra implicado en otitis media, sinusitis, absceso periamigdalino, angina de Vincent y traqueitis (26,27,29,34), foliculitis, forúnculos, carbunco, celulitis, impétigo, el síndrome de la piel escaldada (22) y neumonías atípicas que usualmente ocurren después de la influenza o bacteriemia estafilocócica (7). Aproximadamente 30 % de la población son portadores de este m.o y constituyen una fuente de infección hacia

huéspedes susceptibles (4). Debido al índice relativamente elevado de portadores de vías respiratorias es difícil interpretar la recuperación de dichos m.o de estos sitios. Sin duda, el aislamiento de esta bacteria en gran número de una lesión elimina tales dudas. En general, el número de estafilococos coagulasa positivos de esta región es pequeño. La naturaleza oportunista del m.o y la proximidad de la garganta de su habitat natural permite la propagación rápida de cualquier proceso patológico por esta bacteria. Es típico que esta bacteria pueda complicar secundariamente cualquier enfermedad, y su presencia en cultivos mixtos no deberá interpretarse solamente como un reflejo de contaminación (18).

Debido a su ubicuidad, a veces es aconsejable diferenciar a las diversas cepas de estafilococos en tipos o grupos, la aparición de una cepa de estafilococos de resistencia única y exclusiva puede ser una señal valiosa como marcador epidemiológico. Se ha usado para ello diferentes técnicas, que incluyen tipificación serológica, uso de reacciones bioquímicas (biotipificación), resistencia antibiótica y tipificación bacteriofágica. La técnica empleada en esta investigación fue de la resistencia a los antibióticos, la cual se determinó por el método de difusión en disco (30).

FUNDAMENTO DEL TEMA

El estudio de las infecciones respiratorias resulta ser de suma importancia, pues representa uno de los problemas epidemiológicos más serios en el mundo, por su transmisibilidad amplia, rápida y al gran número de agentes etiológicos que las causan, trayendo como consecuencia infecciones constantes que pueden tornarse graves.

En México sabemos que las infecciones respiratorias se encuentran ocupando los primeros lugares de mortalidad como lo demuestran las estadísticas vitales de la Secretaría de Salud y donde se observa ocupan el sexto lugar de las diez principales causas de mortalidad en 1987 y el primer lugar de los diez principales casos nuevos de enfermedades en 1989 (38).

Este trabajo esta orientado hacia la determinación de portadores en el tracto respiratorio superior de cocos gram-positivos con potencial patógeno, ya que estos son reservorio de dichos microorganismos (m.o) contribuyendo así a su diseminación y por lo tanto es necesaria su identificación para prevenir complicaciones en el curso de la infección y con ello evitar daños que pudieran ser irreversibles.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Esta investigación se encaminó al estudio de los agentes bacterianos, específicamente cocos gram-positivos, que comunmente se aíslan a partir de exudados faríngeos. Para lo cual se realizó un estudio transversal empleando un muestreo aleatorio simple para obtener una población de 100 adultos jóvenes que cursan las carreras de Cirujano Dentista (C.D) y Químico Farmacéutico Biólogo (Q.F.B) en esta institución, cuyas edades están comprendidas entre los 18 a 30 años. La población se dividió en dos bloques (grupos I y II), el grupo I formado por 45 adultos jóvenes de primer ingreso (1^{er} año) de la carrera de C.D y el grupo II formado por 55 adultos jóvenes que cursan aproximadamente la parte final de la carrera (3^{er} año para C.D y 4^o año para los Q.F.B). El aspecto socioeconómico de la población en estudio resultó de nivel medio según los datos recabados en el cuestionario que se les aplicó a cada uno de ellos. Se hizo este planteamiento con el objeto de observar el efecto de la zona de influencia, que es el área en que se ubica nuestra escuela. Además del efecto de la convivencia entre los alumnos que han cursado juntos una carrera con lo cual se piensa encontrar un recambio en la flora orofaríngea aislada en estos alumnos y que se propone exista una diferencia con la flora aislada de alumnos de primer ingreso.

OBJETIVO GENERAL

Determinar en una población de estudiantes el estado de portador de cocos gram-positivos en el tracto respiratorio superior.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Analizar la diferencia que puede existir en la prevalencia de cocos gram-positivos en un grupo de estudiantes de nuevo ingreso con respecto a otro grupo de estudiantes que cursan la parte final de la carrera.
2. Determinar la prevalencia de cocos gram-positivos en estudiantes que muestran signos de faringitis.
3. Detectar el predominio de una cepa endémica de *S. aureus* empleando marcadores de resistencia a antimicrobianos.
4. Identificar a *S. milleri* y correlacionarlo como posible patógeno en vías respiratorias superiores.

HIPOTESIS

Los portadores de cocos gram-positivos en vías respiratorias, juegan un papel importante en la transmisión de estos microorganismos, por lo que es posible que exista una diferencia significativa en cuanto al hallazgo de cocos gram-positivos entre la población de primer ingreso (grupo I) y la que ha cursado la parte final de la carrera (grupo II), ya que debe efectuarse un recambio de la microflora en los individuos que se encuentran en constante convivencia.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

I. MEDIOS DE CULTIVO EN AGAR

- a) Nutritivo (Bioxon)
- b) Base para agar sangre (Bioxon)
- c) Soya tripticasa (Bioxon)
- d) Mitis salivarius (Difco)
- e) Sal y manitol (Bioxon)
- f) Mueller-Hinton (BBL)
- g) Medio O/F (Difco)

II. MEDIOS DE CULTIVO EN CALDO

- a) Pike (Bioxon)
- b) Todd-Hewitt (Bioxon)
- c) Infusión cerebro corazón (Difco)
- d) Básico rojo de fenol (Bioxon)

III. REACTIVOS Y CARBOHIDRATOS (AZUCARES)

- a) Peróxido de hidrógeno al 30 % (SUPEROXAL)
- b) Alcohol etílico absoluto (J.T.BAKER)
- c) Acetona (J.T.BAKER)
- d) Cristal violeta (J.T.BAKER)
- e) Safranina (J.T.BAKER)
- f) Lugol "Hidróxido de potasio" (J.T.BAKER)

- g) Aceite de inmersión (J.T.BAKER)
- h) Aceite mineral o nujol (J.T.BAKER)
- i) Agua destilada
- j) Manitol (SIGMA)
- k) Inulina (SIGMA)
- l) Lactosa (SIGMA)
- m) Rafinosa (SIGMA)
- n) Sorbitol (SIGMA)
- o) Glucosa (SIGMA)
- p) Slidex Strepto-Kit (BIOMERIEUX)

IV. DISCOS DIFERENCIALES

- a) Bacitracina "0.04 unidades" (BIGAUX)
- b) Optoquina 5ug (BIGAUX)
- c) Novobiocina 5ug (BIGAUX)
- d) Penicilina 10 U (BECTON DICKINSON = BD)
- e) Cloranfenicol 30 mcg (BD)
- f) Vancomicina 30 mcg (BD)
- g) Gentamicina 10 mcg (BD)
- h) Ampicilina 10 mcg (BD)
- i) Kanamicina 30 mcg (BD)
- j) Carbanicilina 100 mcg (BD)
- k) Cefalotina 30 mcg (BD)
- l) Tetraciclina 30 mcg (BD)
- m) Eritromicina 15 mcg (BD)
- n) Clindamicina 2 mcg (BD)
- o) Sulfametoxazol-Trimetoprim 23.75 mcg (BD)
- p) Cefotaxima 30 mcg (BD)
- q) Cloxaxilina 1 mcg (BD)
- r) Estreptomina 10 mcg (BD)
- s) Amikacina 30 mcg (BD)

V. MATERIAL BIOLÓGICO

- a) Cepas de referencia propiedad del cepario del Departamento de Bacteriología Médica de la E.N.C.B. I.P.N.
 - Streptococcus* del grupo A
 - Streptococcus* del grupo B
 - Streptococcus pneumoniae*
 - Streptococcus anginosus*
 - Streptococcus faecalis*
 - Streptococcus mutans*
 - Staphylococcus aureus* COWAN I
 - Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 - Staphylococcus epidermidis*
 - Staphylococcus saprophyticus*
- b) Sangre de carnero estéril
- c) Plasma humano

VI. EQUIPOS

- a) Microscopio (ZEISS)
- b) Autoclave
- c) Centrifuga clínica
- d) Incubadora (RIOS)
- e) Refrigerador (MABE)
- f) Balanza granataria
- g) Balanza analítica (OHUS)
- h) Dispensador de discos (BBL)

VII. CRISTALERIA

- a) Cajas de petri de vidrio (PYREX Y KIMAX)
- b) Tubos 13 X 100 mm (PYREX)
- c) Tubos 15 X 125 mm (PYREX)
- d) Tubos 16 X 125 mm (PYREX)
- e) Tubos 16 X 150 mm (PYREX)
- f) Pipetas graduadas de 1 ml (KIMAX)
- g) Pipetas graduadas de 5 ml (KIMAX)
- h) Jarras con vela extinguida
- i) Cajas de portaobjetos (KIMAX)
- j) Matraz volumétrico de 1000 ml (KIMAX)
- k) Matraz volumétrico de 100 ml (KIMAX)
- l) Frascos goteros color ambar

VIII. OTROS

- a) Cajas de petri de plástico
- b) Asas bacteriológicas con porta asa
- c) Mechero Fischer
- d) Gradillas
- e) Hisopos estériles
- f) Abatelenguas
- g) Jeringas y agujas desechables

DIAGRAMA No 1. MARCHA DE TRABAJO EN EL AISLAMIENTO DE COCOS
GRAM-POSITIVOS A PARTIR DE EXUDADO FARINGEO

TOMA DE MUESTRA
(2 HISOPOS)

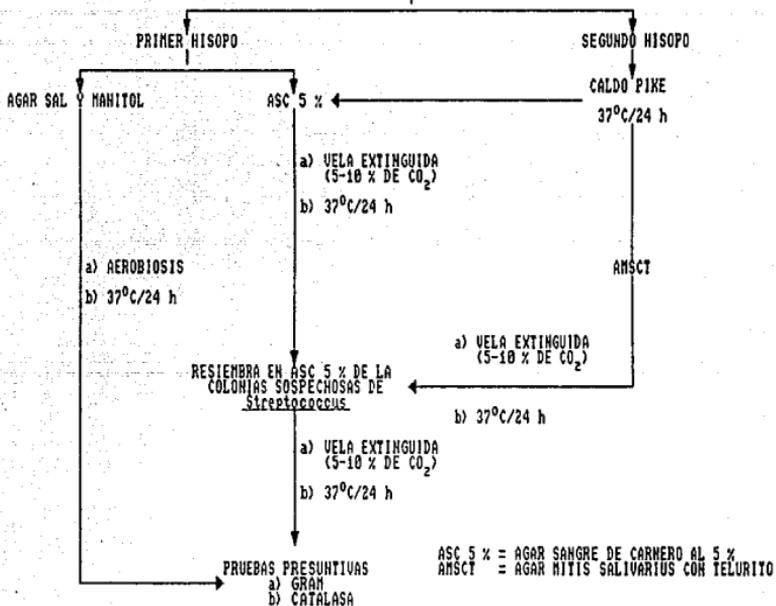
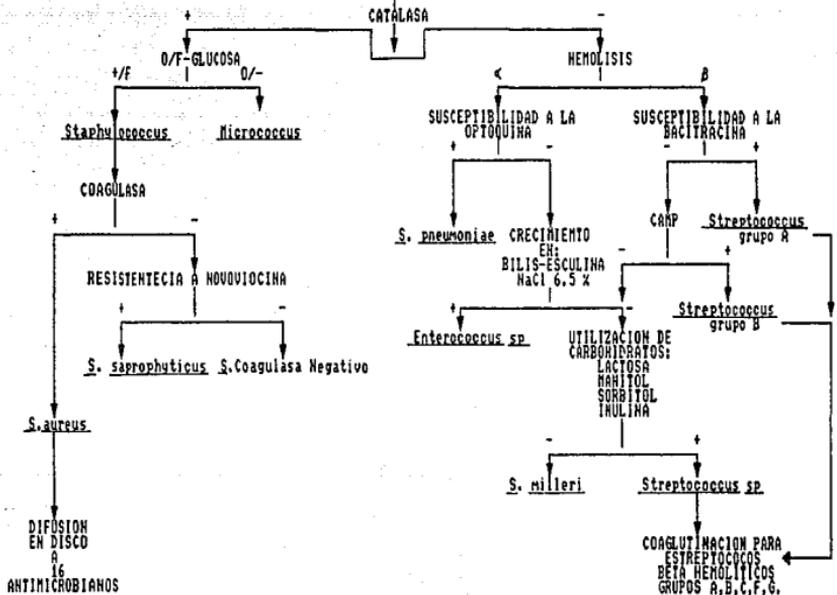


DIAGRAMA No 2. MARCHA DE TRABAJO EN LA IDENTIFICACION DE COCOS
 GRAM-POSITIVOS A PARTIR DE EXUDADO FARINGEO
 COCOS GRAM-POSITIVOS



RESULTADOS

En este estudio se incluyeron 100 adultos jóvenes estudiantes de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza cuyas edades oscilaron entre los 18 a 30 años. La población se dividió en dos grupos en función del tiempo de estancia en la escuela motivo de este estudio (Tabla No 1), el grupo I lo conformaron 45 estudiantes de la carrera de Cirujano Dentista (C.D) y el grupo II estuvo formado por 55 estudiantes, 32 alumnos de C.D y 23 alumnos de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo (Q.F.B). Se observa que no hay diferencia marcada en el intervalo de edad en el grupo I respecto al grupo II, y que se dió un predominio del sexo femenino en ambos grupos.

El estado de portador es una consecuencia natural de la relación de los m.o con el hombre, cocos gram-positivos de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* se han descrito con frecuencia asociados en faringe. En la tabla No 2 se muestra la prevalencia de portadores de cocos gram-positivos en las dos poblaciones de estudiantes analizadas. Observamos que *S. aureus* se presentó con mayor frecuencia en la población del grupo I, ya que 19 de los 45 estudiantes presentaron esta bacteria, en tanto que se presentaron 16 casos en los 55 alumnos que forman el grupo II, lo contrario se vió en los *Staphylococcus* Coagulasa Negativos (CNS) ya que el mayor número de aislamientos fue en el grupo II. Se aisló en cada uno de los grupos un estreptococo del grupo A; así mismo 4 *S. agalactiae* en el grupo I y 2 en el grupo II; respecto a *S. milleri* hubo únicamente 4 aislamientos en el grupo II; en cuanto *Streptococcus* del grupo G se aisló sólo una vez en cada uno de los grupos; en el grupo II se obtuvieron 3 aislamientos de *Streptococcus sp* beta hemolíticos, los cuales no fueron agrupables por la prueba de coaglutinación según el criterio de Lancefield, y de ninguno de los estudiantes muestreados se logró aislar *S. pneumoniae*.

TABLA No 1. POBLACION DE ESTUDIANTES DE LA E.N.E.P ZARAGOZA ESTUDIADA

GRUPO	No DE ESTUDIANTES	EDAD (ANOS)	SEXO		CARRERA	
			F	M	C.D	Q.F.B
I	45	18 - 28	37	8	45	0
II	55	19 - 30	41	14	32	23
TOTAL	100		78	22	77	23

C.D = Cirujano Dentista

Q.F.B = Quimico Farmaceutico Biologo

TABLE No 2. PREVALENCIA DE COCOS GRAN-POSITIVOS RECUPERADOS DE DOS GRUPOS DE ESTUDIANTES DE LA E.N.E.P TARAGOZA

GRUPO	No DE ESTUDIANTES	No DE CEPAS DE COCOS GRAN-POSITIVOS RECUPERADOS								
		Staphylococcus		Streptococcus (GRUPO)						TOTAL DE CEPAS
		aureus	Coagulasa Negativa	A	B	G	milleri	SP	pneumoniae	
I	45	19	3	1	4	1	0	0	0	28
II	55	16	10	1	2	1	4	3	0	37
TOTAL	100	35	13	2	6	2	4	3	0	65

El síndrome de la faringitis es causado por bacterias, virus, hongos y etiologías no infecciosas; los signos característicos son enrojecimiento e inflamación que puede acompañarse de exudado purulento. En la tabla No 3 se observa que 55 estudiantes no presentaron signos de faringitis, mientras que 16 de los individuos del grupo I presentaron faringitis, recuperándose cocos gram-positivos con potencial de causar este cuadro en 9 de estos. En los estudiantes del grupo II 29 presentaron los signos aislandose cocos gram-positivos en sólo 14 de ellos. Después se quiso establecer la presencia en forma única o combinada de cocos gram-positivos en los individuos con faringitis, en la Tabla No 4 se observa que del género *Staphylococcus* sólo se recuperó *S. aureus* de manera frecuente en ambos grupos de estudiantes y de manera importante 12 aislamientos de los 16 fueron únicos. Del grupo de los *Streptococcus* sólo en 11 individuos se recuperaron, mismos que se distribuyeron en los grupos A, B, G, Milleri y no agrupables. Se obtuvieron 7 aislamientos de los cuales 6 correspondieron a estudiantes del grupo II.

Por su ubicuidad es aconsejable diferenciar a las diversas cepas de estafilococos en tipos o grupos. La aparición de una cepa de *S. aureus* de resistencia única y exclusiva a algún antibiótico es una señal valiosa para advertir la presencia de cepas similares en una área geográfica determinada. En la tabla No 5 se observa la presencia de 9 patrones de resistencia diferentes los cuales, van desde la existencia de un marcador hasta 5. No se observó predominio de alguna cepa en particular en los dos grupos de estudiantes analizados independientemente si presentaron signos de faringitis o no. Sin embargo, se observó una mayor frecuencia del patrón de resistencia 2, al que pertenecen 21 de las 30 cepas estudiadas.

**TABLA No 3. PREVALENCIA DE COCOS GRAM-POSITIVOS EN ESTUDIANTES DE LA
E.M.E.P ZARAGOZA QUE MUESTRAN SIGNOS DE FARINGITIS**

GRUPO	No DE ESTUDIANTES	NUMERO DE CEPAS DE COCOS GRAM-POSITIVOS AISLADOS DE ESTUDIANTES CON SIGNOS DE FARINGITIS		
		AUSENTES	PRESENTES	
			TODAS LAS ETIOLOGIAS	ETIOLOGIA DE COCOS GRAM-POSITIVOS
I	45	29	16	9
II	55	26	29	14
TOTAL	100	55	45	23

TABLA No 4. AISLAMIENTO DE COCOS GRAN-POSITIVOS COMO ESPECIE UNICA O COMBINADA A PARTIR DE ESTUDIANTES DE LA U.N.E.P. PARAGUAY QUE MUESTRAN SIGNOS DE FARINGITIS

GRUPO	No DE ESTUDIANTES	COCOS GRAN-POSITIVOS AISLADOS DE ESTUDIANTES CON SIGNOS DE FARINGITIS					
		<u>S. aureus</u>	<u>S. grupo A</u>	<u>S. grupo B</u>	<u>S. milleri</u>	<u>S. grupo G</u>	<u>Streptococcus sp.</u>
		UNICO : MIXTO	UNICO : MIXTO	UNICO : MIXTO	UNICO : MIXTO	UNICO : MIXTO	UNICO : MIXTO
I	45	0	1	2	0	1	0
		5 : 3	0 : 1	1 : 1	0 : 0	0 : 1	0 : 0
II	55	0	1	1	2	1	2
		7 : 1	1 : 0	1 : 0	1 : 1	1 : 0	2 : 0
TOTAL	100	16	2	3	2	2	2
		12 : 4	1 : 1	2 : 1	1 : 1	1 : 1	2 : 0

DISCUSION

El estado de portador resulta de la convivencia del hombre con los microorganismos (m.o). Los portadores son reservorios de los m.o y contribuyen a la diseminación de éstos por contacto directo por medio de gotitas de pffluger al hablar toser o estornudar y se forman aerosoles quedando en suspensión en el aire el tiempo suficiente para ser aspirados por individuos diversos. Bajo ciertas condiciones predisponentes en el portador, las bacterias se comportan como patógenos oportunistas, generando cuadros de infección en las vías respiratorias (1,31,37). Los cocos gram-positivos de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* se han descrito con frecuencia asociados en nasofaringe como componentes de la flora normal, o bien causando cuadros de infección en vías respiratorias altas (12,14,21,25,28,37,39). En este estudio se analizaron las muestras de exudado faríngeo procedentes de 100 adultos jóvenes cuyas edades se encuentran entre 18 a 30 años, el propósito de éste fue el determinar la prevalencia de portadores de cocos gram-positivos potencialmente patógenos.

Para el género *Staphylococcus* se obtuvo una prevalencia de aislamiento de *S. aureus* del 35 %, lo que está acorde a lo reportado en la literatura (4,7,11,17,18,19,27,29). La colonización del aparato respiratorio superior es el resultado de la adherencia bacteriana, evento que bajo factores predisponentes del huésped se ha demostrado que conlleva al desarrollo de una neumonía bacteriana. Está establecido que en los fumadores, los acarreadores crónicos de *S. aureus* y los individuos con infección viral, se da un incremento en la adherencia de *S. aureus* a las células del huésped (28). La prevalencia de *Staphylococcus* Coagulasa Negativos (CNS) fue del 13 %, ello era de esperarse ya que éstos constituyen el mayor componente de

la microflora normal, especialmente de la piel (22).

Para los estreptococos de los grupos A, B y *S. milleri* se obtuvo una prevalencia menor a la reportada en la literatura; ya que inclusive para *S. pneumoniae* fue nula. Esto bien puede deberse a que los datos de referencia corresponden a la nasofaringe, mientras que los nuestros a la faringe (5).

La baja recuperación de cepas de estreptococos del grupo A puede entenderse en función de que en nuestra población no prevalece alguna de las cepas descritas por Tylewska y col., las cuales presentan una proteína asociada al antígeno M que facilita el fenómeno de adherencia a las células epiteliales faríngeas (39). Se ha reconocido la diseminación de las infecciones estreptococales del grupo A por un contacto cercano entre personas infectadas y sanas, resultando infecciones invasivas, faringitis o acarreadores asintomáticos; la mayoría de las enfermedades invasivas se presentan en adultos, mientras que la mayoría de las infecciones no invasivas ocurren en niños (25). Recientemente se ha notado un resurgimiento de las infecciones y secuelas por estreptococos del grupo A (21), lo que inclusive ha llevado a relacionar los serotipos M3 y M18 con los casos de fiebre reumática (25).

Para los estreptococos del grupo B se encontró un 6 % de aislamiento. En décadas pasadas sólo se les refirió como habitantes normales de la faringe, pero ahora hay reportes en los que se asocian con faringitis exudativa similar a la que causan los estreptococos del grupo A, pero no se han relacionado a la fecha, con secuelas no supurativas semejantes a la fiebre reumática y la glomerulonefritis. Ya que los estreptococos del grupo B han demostrado capacidad invasiva, generando infecciones supurativas, se recomienda que se tenga cuidado en la interpretación del hallazgo de esta bacteria a partir de un exudado faríngeo cuando se analiza un caso de faringitis exudativa (6).

S. milleri se recuperó en un 4 %. Se ha reportado como componente de la flora normal de las mucosas del hombre y también ha sido reportado con significado patógeno al causar bacteriemia, endocarditis, infecciones supurativas del sistema nervioso, abdomen y pelvis (20), otitis media, sinusitis (15), absceso cerebral, absceso del hígado y apendicitis (23). La evidencia de su patogenicidad se relegó, dado que el hallazgo en infecciones supurativas generalmente se observó en asociación con otras bacterias plógenas. *S. milleri* se encuentra poco en tejidos blandos de la boca, lo que se ha establecido por varios investigadores, que han reportado el aislamiento esporádico de éstos a partir de individuos con la garganta inflamada, aunque Poole y col. recientemente encontraron una relación entre *S. milleri* e individuos que cursan con faringitis y amigdalitis (15).

S. pneumoniae causa con frecuencia infecciones agudas, pero también se les puede encontrar en mucosas sanas (15). El estado de portador puede variar dependiendo de la estación del año entre 30 y 70 % (11), lo que hace sorpresivo el resultado de este estudio, el cual independientemente de la estación del año no brindó el aislamiento de esta especie. Aunque bien parte de la explicación puede ser por el hecho de que esta bacteria se asocia más en niños que en adultos, ya que inclusive en niños menores de cinco años se ha observado un predominio de las infecciones bacterianas en las que destaca *S. pneumoniae* sobre las infecciones virales (12), así como el estudio realizado en una población infantil hospitalizada por infección respiratoria, en el cual se aisló *S. pneumoniae* en niños menores de un año y no así en aquellos mayores de 4 años de edad (33). Se sabe que todas las edades, razas y sexos son susceptibles de enfermedades estreptococales por *S. pneumoniae*. Las infecciones son improbables excepto cuando la resistencia del huésped es reducida o después de la introducción de una cepa más virulenta (20).

El eje central de este trabajo fue el determinar la prevalencia de portadores de cocos gram-positivos en adultos jóvenes que

deambulan, conviven y guardan un estado de salud que les permite realizar actividades tales como el estudio. En relación a esto último sin embargo, al realizar la inspección del aspecto de la faringe se observó que en casi la mitad de la población presentaba signos de enrojecimiento, inflamación de las amígdalas con y sin exudado purulento típicos de una faringitis. 45/100 de los estudiantes analizados presentaron signos de faringitis, de los cuales, se aislaron cocos gram-positivos con potencial patógeno en 23 de éstos; lo que indica un incremento en cuanto a lo que se ha reportado referente a los agentes bacterianos como causantes de faringitis (9). De estos 23 casos la bacteria aislada con mayor frecuencia fue *S. aureus*, en 12 ocasiones como especie única y 4 en combinación. Debido al índice relativamente elevado de portadores de *S. aureus* de vías respiratorias, es difícil interpretar la recuperación de este en estos sitios (18). Aún cuando *S. aureus* se encontró como ya se mencionó en presencia de signos, no hay elementos suficientes para atribuirle tal hecho, pues no se realizó la identificación de otros organismos diferentes a los cocos gram-positivos, aunado a que como se sabe la faringitis puede presentarse por etiologías no infecciosas. Respecto a estreptococos beta hemolítico del grupo A se corroboró su asociación con la presencia de signos de faringitis (5), pues en los 2 hallazgos de este m.o se observó tal correlación. De estreptococos beta hemolítico del grupo B se encontró en 3/6 aislamientos implicado con los signos ya mencionados y *S. milleri* en 2/4 de las capturas se observó la misma situación. A pesar de no haber encontrado una correlación total con la presencia de signos, no se puede descartar la patogenicidad de ambos dadas las evidencias experimentales que se tienen (15,20).

Se dividió la población en estudio en dos grupos (grupo I y II) en un intento de conocer la influencia del ambiente sobre la prevalencia de portadores de cocos gram-positivos, observándose una distribución al azar de ellos. Puesto que de las bacterias de interés

S. aureus fue la que se recuperó con mayor frecuencia, se determinó la distribución del patrón de resistencia de este obteniéndose que 21 de las 30 cepas analizadas poseen el patrón común de resistencia a la ampicilina-penicilina-cloranfenicol los cuales se encuentran distribuidos al azar entre los estudiantes de ambos grupos con y sin signos de faringitis, de donde se infiere que esta cepa de *S. aureus* es el tipo común que prevalece en el ambiente, por lo que se requiere otro tipo de caracterización para poder establecer si se produce un recambio en el tipo de cepa como puede ser estudio por fagos.

CONCLUSIONES

Se encontró una distribución al azar de cocos gram-positivos en la población estudiada.

No se encontró la correlación entre los aislamientos de estreptococo beta hemolítico del grupo B, *S. milleri* y la presencia de signos de faringitis, en tanto que sí se encontró esta relación con el estreptococo beta hemolítico del grupo A.

Se encontró el predominio de una cepa endémica de *S. aureus* resistente a ampicilina-penicilina-cloranfenicol, en ambos grupos de estudiantes, independientemente de la presencia o ausencia de signos de faringitis, lo que permite advertir que esta cepa proviene del ambiente de la zona de influencia

Se identificó *S. milleri* en personas con y sin signos de faringitis, por lo tanto no es posible correlacionarlo como patógeno en vías respiratorias superiores en este estudio.

PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

Aún cuando este estudio nos ha permitido advertir detalles importantes en cuanto a la etiología de infecciones respiratorias por bacterias y concretamente por cocos gram-positivos, nos permitimos hacer algunas sugerencias esperando que puedan servir a toda aquella persona que se interese en el tema.

Si se pretende analizar la influencia del medio ambiente en la adquisición de microorganismos (m.o) causantes de infección respiratoria recomendamos que el diseño de la investigación se haga tomando como fuente de estudio individuos que provengan de lugares que estén fuera de la zona que se estudia a fin de tener un mejor panorama de dicha influencia. De ahí se desprende que es necesario hacer un estudio longitudinal con el objeto de obtener mejores y más confiables resultados. Análogamente para poder determinar la influencia de la carrera sugerimos se haga un muestreo de carreras de diferentes disciplinas incluyendo aquellas que no son consideradas de alto riesgo, por no tener contacto estrecho con pacientes como en el caso de carreras del área de la salud.

Es importante subrayar el que se realice la toma de muestra de las zonas nasal y nasofaríngea, pues estos m.o habitan principalmente en estos sitios.

También se recomienda analizar el papel que desarrollan las bacterias gram-negativas y los virus para apoyar fuertemente los resultados que se obtengan en investigaciones semejantes.

Ante todo para que la investigación tenga mayor respaldo reiteramos nuestra opinión de que es necesario realizar un estudio longitudinal de donde se podrán hacer mejores inferencias, así como los resultados arrojados podrán servir como base en posteriores trabajos.

ANEXOS

OBTENCION DE LA MUESTRA

Cultivo faríngeo. Se inclina hacia atrás la cabeza del paciente y se ilumina bien la garganta. Se empuja la lengua hacia abajo de modo que pueda observarse la parte posterior de la garganta. Se frota el hisopo de arriba abajo contra la parte posterior de la garganta y contra cualquier mancha blanca que se encuentre en la zona de las amígdalas. Debe evitarse el contacto del hisopo con la lengua y las mejillas. Una vez obtenidos los exudados faríngeos, se sigue la metodología para el aislamiento (9).

PROCEDIMIENTO PARA INOCULAR UNA PLACA DE AGAR SANGRE

El procedimiento correcto para inocular una placa de agar sangre se indica en la figura No 3. Se utiliza el hisopo para inocular aproximadamente un sexto de la placa. Se hace girar el hisopo sobre la superficie del agar de modo que toda la superficie del hisopo entre en contacto con el agar. Se utiliza entonces una asa de alambre para aislar por estría sobre la placa. Esto dispensa a las bacterias para que durante la incubación desarrollen en forma de colonias aisladas. Después se pica el agar con el asa en la zona entre las segunda y tercera estría de forma perpendicular a la superficie para asegurar un corte limpio sin bordes irregulares; con este procedimiento se observa de manera más definida el tipo de hemólisis que presenta el estreptococo aislado (9).

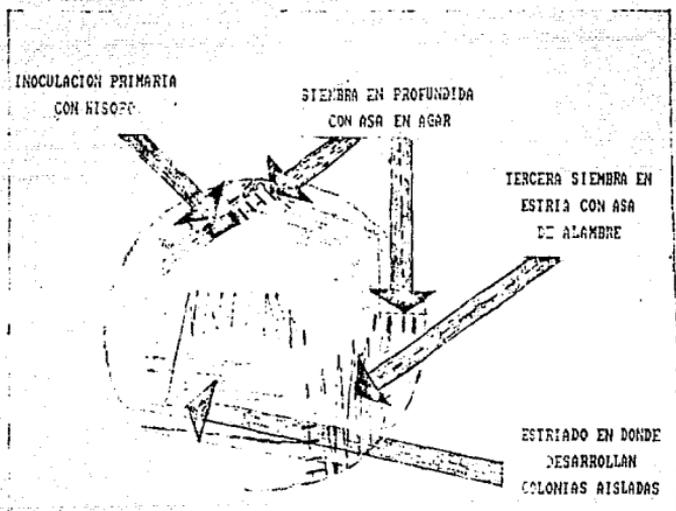


FIGURA No. 3. PROCEDIMIENTO PARA INOCULAR Y AISLAR ESTREPTOCOCCOS EN CAJAS DE AGAR SANGRE DE CARNERO AL 5%.

PRUEBA DE LA BACITRACINA

La prueba de la bacitracina tiene las siguientes recomendaciones: Se disponen de discos comerciales que distinguen entre los estreptococos beta hemolíticos del grupo A y otros estreptococos beta hemolíticos. 1) Hay que asegurarse que los discos adquiridos sean diferenciales (0.04 unidades), y no de sensibilidad. Los discos que se venden y utilizan para las pruebas de sensibilidad a la bacitracina tienen una concentración demasiado elevada de bacitracina para poder distinguir con precisión entre estreptococos pertenecientes al grupo A. 2) Se recomienda emplear un inóculo abundante de un cultivo puro, pues de otro modo, con un inóculo escaso, cepas de estreptococos no pertenecientes al grupo A parecerán susceptibles a la bacitracina. 3) Debe usarse un cultivo puro. El uso de los discos diferenciales en placas primarias inoculadas con frotos de garganta sólo ha permitido lograr un 70 % de precisión en la identificación de estreptococos del grupo A. La prueba ha sido diseñada para usar cultivos puros, no mixtos. 4) La prueba tiene por objeto diferenciar entre estreptococos beta hemolíticos. A fin de que esta prueba diferencial sea confiable, debe determinarse correctamente la hemólisis. Muchos estreptococos alfa hemolíticos, incluidos los neumococos, son sensibles al disco diferencial de bacitracina. Los lotes de los discos comerciales pueden variar; por lo tanto, cada lote nuevo que se obtenga debe ensayarse con cepas conocidas de estreptococos pertenecientes o no al grupo A. Los discos deben ensayarse quincenalmente con cepas testigo a fin de determinar su confiabilidad. 5) Para interpretar las pruebas, deben aplicarse los siguientes criterios: a) Toda zona de inhibición, cualquiera que sea su diámetro, significa que el cultivo es positivo. b) La ausencia de zonas de inhibición (crecimiento hasta la orilla misma del disco) significa que el cultivo es resistente. c) En las publicaciones se establecieron requisitos de tamaño para las zonas, y un fabricante, en

un boletín técnico, indica que se requiere la presencia de una zona de un tamaño determinado para la identificación presuntiva de estreptococos grupo A. El originador de la prueba (Maxted) no estipuló que las zonas deberían ser de determinado tamaño. No hay datos experimentales que confirmen que deban medirse los diámetros de las zonas a fin de diferenciar entre estreptococos pertenecientes al grupo A y no pertenecientes al mismo. Las falsas interpretaciones positivas son menos perjudiciales que las falsas interpretaciones negativas. Al establecer como requisito para la identificación presuntiva de estreptococos del grupo A que las zonas midiesen 10 mm o más, por lo menos un grupo de investigadores aumentó el error de la prueba en un 10 % (falsos negativos). Los usuarios de los discos diferenciales deben tener presente que los discos de bacitracina inhiben el crecimiento de algunas cepas de estreptococos beta hemolíticos no pertenecientes al grupo A. Por lo tanto, el informe debe ser como sigue: a) "Identificación presuntiva de estreptococos beta hemolíticos del grupo A por bacitracina" o b) "Estreptococos beta hemolíticos no pertenecientes al grupo A por bacitracina". No menos del 6 % de los estreptococos beta hemolíticos del grupo B de origen humano son susceptibles a la bacitracina. Este error puede eliminarse usando una prueba fisiológica para identificar presuntivamente los estreptococos del grupo B (9).

PRUEBA DE CAMP

La prueba de CAMP se efectúa trazando una sola estría del cultivo de estreptococos en sentido perpendicular a una estría de una cepa de *S. aureus* productora de beta lisina. Las estrias de ambos organismos no deben estar en contacto. Nótese que en la figura No 4 hay un espacio de aproximadamente 0.5 cm entre los dos organismos. En la placa de agar sangre debe usarse sangre de carnero o bovino. Los mejores resultados se obtienen con sangre de carnero lavada que ha

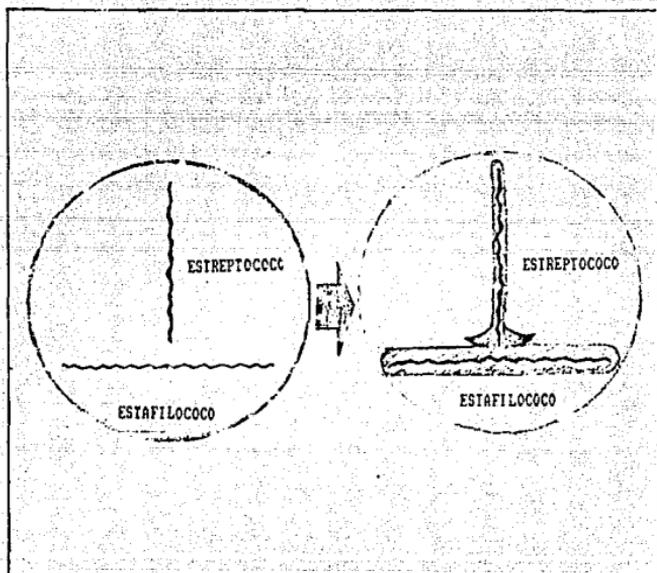


FIGURA No. 4. MONTAJE E INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE CAMP.

sido resuspendida en solución salina fisiológica y una base de agar de tripticasa y soya. Se han utilizado algunas placas comerciales de agar de sangre de carnero; pero cada partida de placas debe ensayarse para verificar que provoque las reacciones debidas con cepas de estreptococos testigos de los grupos A, B, C, G y la cepa de estafilococo productora de beta lisina (9).

Las placas para las pruebas de CAMP no deben incubarse en anaerobiosis, ya que cepas de estreptococos del grupo A podría dar falsos positivos. Los estreptococos del grupo B producen una sustancia conocida como el factor CAMP, que incrementa la zona de la beta hemólisis en la zona localizada entre ambas cepas, adquiriendo el aspecto de punta de flecha. Los estreptococos beta hemolíticos negativos en la prueba de bacitracina y positivos en la prueba de CAMP pueden identificarse como estreptococos del grupo B (9).

Los estreptococos beta hemolíticos negativos en la prueba de bacitracina y negativos en la prueba de CAMP son estreptococos beta hemolíticos no pertenecientes a los grupos A o B (9).

Los estreptococos no hemolíticos del grupo B son positivos en la prueba de CAMP; por lo tanto, los estreptococos no hemolíticos que son negativos en la prueba de bilis esculina y positivos en la prueba de CAMP pueden identificarse presuntivamente como estreptococos no hemolíticos del grupo B (9).

PRUEBA DE BILIS ESCULINA (BE)

Con el medio BE se identifica a las especies del género *Enterococcus* (antes *Streptococcus* del grupo D). Todos ellos ennegrecen la BE contenida en los tubos inclinados, habitualmente dentro de un plazo de 48 horas. *S. bovis* y *S. equinus* siguen siendo considerados como estreptococos del grupo D, los cuales también dan positiva esta prueba. Un estreptococo que produce una reacción

considerados como estreptococos del grupo D, los cuales también dan positiva esta prueba. Un estreptococo que produce una reacción positiva en la BE debe calificarse de "estreptococo presuntivamente identificado como del grupo D por hidrólisis de BE" (9).

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SAL (NaCl al 6.5 %)

E. faecalis y sus variedades *zymogenes* y *liquefaciens*, *E. faecium* y *E. durans* generalmente se desarrollan en abundancia y producen una modificación del indicador dentro de un plazo de 24 horas. Algunos otros *Enterococcus* tardan 48 horas y algunos se desarrollan sin que se produzca una modificación concomitante en el indicador incluso al cabo de 72 horas. Aproximadamente el 80 % de los estreptococos del grupo B también se desarrollan en este medio, y algunas cepas modifican el indicador. Normalmente, los estreptococos beta hemolíticos de los grupos A, C, G y F no desarrollan en este medio. Los estreptococos alfa hemolíticos no clasificables en grupos (*viridans*), tales como *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans* y *S. MG* no se desarrollan en el medio NaCl al 6.5 % como tampoco las especies *S. bovis* y *S. equinus* del grupo D (9).

Una prueba de BE-positiva y un desarrollo positivo en el caldo de NaCl al 6.5 % confirma la presencia de *Enterococcus*, incluso cuando se determinan reacciones serológicas, debe utilizarse el desarrollo en caldo NaCl al 6.5 % para confirmar la presencia de un verdadero *Enterococcus*. Muy rara vez se presentan cepas beta hemolíticas que toleran la sal y no pertenezcan al grupo B y D, así como el que aparezcan cepas de estreptococos del grupo A que toleren la sal. Todos los estreptococos beta hemolíticos de los grupos A, B, C, F, y G son BE-negativos (9).

OPTOQUINA

La sensibilidad a la optoquina se usa para diferenciar presuntivamente a los estreptococos viridans alfa hemolíticos de los neumococos. Dos o tres colonias sospechosas se estrían a la cuarta parte de una placa, y el disco de optoquina se coloca en el tercio superior del área sombreada. La placa se incuba durante la noche en una jarra con vela o un incubador de CO₂ 37 °C. Los cultivos no crecen adecuadamente en atmósfera normal, produciéndose mayores zonas de inhibición. Si se usa un disco de 6 mm, una zona de inhibición de 14 mm de diámetro, por lo menos, se considera positiva para neumococos. Un diámetro de 6 a 14 mm es dudoso para neumococos, y la cepa se identifica presuntivamente como neumococos sólo si es soluble en bilis. Para discos de optoquina de 10 mm, una zona de inhibición de 16 mm de diámetro por lo menos, es positiva, y debe probarse la solubilidad en bilis de las cepas con zonas de inhibición de 10 a 16 mm (9).

COAGULASA

La capacidad de coagular el plasma es el criterio más común empleado en la identificación de *Staphylococcus aureus*. Pueden hacerse dos pruebas: en tubo de ensayo para coagulasa libre y en porta objetos para coagulasa asociada. La prueba en tubo es la más sensible; la del portaobjetos se ha recomendado como técnica de selección. Al contrario de lo que dicen algunas opiniones, diferentes plasmas pueden usarse para estas dos pruebas, pero el plasma de conejo deshidratado conteniendo citrato o etilendiaminetetracetato (EDTA) es el que se recomienda para obtener los mejores resultados. La prueba en tubo debe hacerse mezclando 0.1 ml de un cultivo crecido toda la noche en caldo de infusión cerebro corazón con 0.5 ml de plasma reconstituido; la mezcla se incuba de 2 a 4 h a 37 °C en un baño de agua observando si se produce la formación de coágulo.

Alternativamente, una colonia grande bien aislada en agar no inhibitorio puede transferirse a 0.5 ml de plasma reconstituido e incubarse como se indico. Cualquier grado de coagulación constituye una prueba positiva. Sin embargo, un precipitado floculante o fibroso no es un coágulo verdadero y debe registrarse como negativo. Se ha procurado semicuantificar el grado de coagulación, pero casi todos los laboratorios registran sólo el resultado positivo o negativo (9).

La prueba en portaobjetos se hace con una suspensión densa de células en agua destilada a la que se le agrega una gota de plasma, observando si dentro de los primeros 10 segundos se forman grupos. Esta prueba usa menos plasma que la del tubo y sus resultados son más rápidos, pero es menos exacta y las pruebas negativas deben repetirse en tubo. Las relaciones deben leerse rápidamente porque aparecen resultados positivos falsos si los tiempos de reacción pasan de los 10 segundos. Además, las células probadas no deben provenir de medios que contengan altas concentraciones de sal (agar Sal y Manitol) porque son posibles la autoaglutinación y los resultados falsos positivos (9).

PRUEBA DE LA CATALASA

El *S. aureus* y cualquier especie de *Streptococcus* son buenos testigos, ya que se obtienen fácilmente y su conservación en cultivos madre no crea problemas. *S. aureus*: prueba fuertemente positiva; especies de *Streptococcus*: prueba negativa.

Método: A) Pruebas de la catalasa de rutina, a la temperatura ambiente (25 °C).

1. Método del portaobjetos, procedimiento recomendado.

a) Con una asa se pica el centro de una colonia pura que fue crecida de 18 a 24 horas y se coloca sobre un portaobjetos de vidrio limpio (procurar no enfriar el asa en la gelosa sangre, ya que los eritrocitos que se acarrean pueden dar falsos positivos).

b) Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 30 % sobre el organismo del portaobjetos. Usar un gotero o una pipeta Pasteur. No invertir el orden del método porque pueden producirse resultados falsos positivos y no se requiere de mezclar el cultivo con el peróxido de hidrógeno.

c) Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) y registrar el resultado.

d) Desechar el portaobjetos poniéndolo en un desinfectante.

2. Método en tubo de ensayo

a) Agregar directamente 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % a un cultivo puro de agar en pico de flauta, densamente inoculado.

b) No utilizar un inóculo que probenga de agar sangre.

c) Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) y anotar los resultados.

Interpretación: A) Prueba positiva: Formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de oxígeno).

B) prueba negativa: No hay formación de burbujas (no se forma oxígeno).

Así mismo, pocos especímenes clínicos producen un cultivo bacteriano puro en los medios de aislamiento iniciales; por lo tanto, si las colonias son pequeñas y no están bien aisladas, es posible que la prueba se realice con tipos celulares mixtos de organismos que reaccionan a la catalasa, produciendo resultados dudosos o falsamente positivos (9).

PRUEBAS DE UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS

Pueden utilizarse diversos hidratos de carbono. La batería depende de las dificultades que se presenten para identificar un organismo determinado. En este estudio se emplearon los siguientes: lactosa, manitol, sorbitol, rafinosa e inulina.

Inoculación:

- a) Crecimiento de un cultivo puro de 18 a 24 horas.
- b) Inóculo espeso. Puede inocularse una batería de hidratos de carbono con un sólo inóculo.
- c) Con aguja o asa de inoculación. Pasar la aguja o el asa sobre el crecimiento de un cultivo. Asépticamente, introducir la aguja o el asa en cada uno de los hidratos de carbono.

Agitar suavemente cada tubo. No dejar que el líquido salpique la tapa del tubo.

Incubación a 37 °C de 18 a 24 horas.

Interpretaciones:

Medio de caldo con hidratos de carbono y rojo de fenol

1. Positivo:
 - a) Acido (A), pH: 6.8
 - b) Color amarillo
2. Retardada:
 - a) Color anaranjado. Si se tiene inseguridad, comparar con el tubo no inoculado.
 - b) Volver a incubar.
3. Negativo:
 - a) Alcalino
 - b) Color rosa rojizo (9).

PRUEBA DE OXIDACION-FERMENTACION (OF)

Principio: Determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono. Algunas bacterias son sólo capaces de metabolizar a los hidratos de carbono (manifestada por la producción de ácido) sólo en condiciones aeróbicas, mientras que otras lo pueden hacer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Al primer grupo se le refiere como bacterias con metabolismo de tipo oxidativo, mientras que al segundo de tipo fermentativo (24).

Determinación OF: Fermentativo: F
Oxidativo : 0
No F/O : -

COAGLUTINACION

La cepa Cowan I de *Staphylococcus aureus* contiene abundante proteína A y fija la porción Fc de IgG de las subclases 2 y 4, dejando libres las porciones Fab para que reaccionen con cualquiera de una serie de moléculas del anticuerpo. Los anticuerpos son acoplados por medio de las uniones de proteína A a estafilococos muertos; que sirven como portadores. Cuando se mezcla este reactivo con una mezcla que contiene estreptococos u otro antígeno correspondiente, la reacción anticuerpo-antígeno específica resultante produce la coaglutinación en forma de malla que se manifiesta por la formación de un precipitado blanco en el portaobjetos (11).

Se ha utilizado la reacción de coaglutinación estafilocócica para identificar diferentes bacterias, pero sobre todo estreptococos beta hemolíticos de los grupos A, B, C y G (11).

Procedimiento:

1. Tomar 2 - 3 asas de cultivo puro en agar soya tripticasa con sangre.
 2. Hacer una emulsión en 0.4 ml de enzima de extracción.
 3. Incubar 1 hora al baño maría a 56 °C.
 4. Centrifugar 10 minutos a 1200 g.
 5. Homogeneizar bien las suspensiones de látex. Poner en un porta 1 gota de cada uno de los látex.
 6. Poner una gota de sobrenadante de extracción al lado de cada suspensión de látex.
 7. Mezclar con un agitador (homogeneizar).
 8. Imprimir al porta un movimiento de rotación.
 9. Lectura: aglutinación en menos de 2 minutos (3).
- NOTA: Control positivo incluido en el envase.

DIFUSION EN DISCO

El procedimiento de difusión en disco es un procedimiento empleado en la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos por su sencillez y efectividad en la determinación de la resistencia a los antibióticos por cepas de origen clínico. El inóculo a emplear debe ser estandarizado, ya que la cantidad de antibiótico necesario para inhibir una población de bacterias es directamente proporcional al número de la población. La densidad de la suspensión bacteriana usada en el procedimiento es ajustada y comparada con una suspensión de turbiedad conocida. El estándar es el tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Farland. Los discos con los antibióticos se obtienen comercialmente y están impregnados con una concentración conocida de éstos. El agar empleado es el Mueller-Hinton, que fue elegido por sus propiedades en la difusión de los antibióticos y el desarrollo bacteriano conocido. La temperatura de incubación deberá ser de 35 a 37 °C y el tiempo de incubación de 18 h para obtener resultados confiables.

Procedimiento:

Se usa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como cepa de control.

1. Preparación del inóculo de prueba y el cultivo de control.

- a) Realice una tinción de gram. Use solamente cultivos puros.
- b) Escoger 4 ó 5 colonias similares y transferirlas con el asa de inoculación dentro de 5 ml de un caldo de soya tripticasa o caldo Mueller-Hinton para organismos exigentes.
- c) Incubación del caldo de cultivo a 37 °C por 2 a 8 horas, si es necesario para desarrollar una clara o moderada turbiedad.
- d) Diluir si es requerido para obtener una turbiedad equivalente a 0.5 Mc Farland la turbiedad del estándar preparado la da el sulfato de bario ($BaSO_4$) por la adición de 0.5 ml de cloruro de bario ($BaCl_2$) a 0.048 M (1.175 % p/v) de $BaCl_2 \cdot 2 H_2O$ en 99.5 ml de H_2SO_4 0.36 N (1.0 % v/v), use un caldo estéril o solución salina.

2. Inoculación

a) Sumergir dentro de los 15 minutos el asa para obtener una solución apropiada del inóculo y girar fuertemente varias veces.

b) Estriar en la placa de agar Mueller-Hinton en tres cuadrantes girar 60 grados en cada estriado para obtener una homogeneidad en la inoculación.

3. Seleccionar los discos y aplicarlos por medio de un dispensador BBL, asépticamente.

4. Incubar las cajas a 37 °C durante toda la noche.

5. Examinar las cajas, medir el diámetro de los halos de inhibición e interpretar los resultados en las tablas.

Determinación de la sensibilidad. El procedimiento de difusión en disco usa tres criterios para interpretar las medidas del diámetro de la zona de inhibición del crecimiento.

Sensible. Es el intervalo en el que la bacteria resulta ser sensible al antibiótico en dosis terapéuticas normales. Generalmente el diámetro de la zona de inhibición es grande (2).

Resistente. Es el intervalo en el que la bacteria resulta ser resistente al antibiótico en dosis terapéuticas normales. Si el diámetro de la zona es pequeño este se considera resistente al antibiótico (2).

Intermedio. Es el intervalo entre el diámetro de la zona sensible y resistente en donde diferencias individuales entre los pacientes y la carga bacteriana puede causar una particular combinación y ser resistente mientras otras combinaciones pueden ser sensibles (2).

Limitaciones del procedimiento:

1. Dentro de esta prueba se describe la aplicación común de bacterias de crecimiento rápido.

2. La clasificación de resistencia, intermedio y susceptible varía sólo por unos mm, lo que se considera error del laboratorio.

3. El uso de otros agentes no comunes (2).

BIBLIOGRAFIA

1. Asociación Mexicana de Profesores de Pediatría, A.C.;1991. Mead Johnson de México S.A de C.V..
2. Becton Dickinson; 1989. USA.
3. BioMérieux; Productos y reactivos para laboratorio. Francia.
4. Boyd R.F. & B.G.Hoerl; 1991. Basic Medical Microbiology; 4^a ed. Ed Little; Brown & Co (Inc). USA.
5. Cimolai N; R.W.Elford; L.C.Bryan; C.Anand & P. Berger;1988. Do the beta-hemolytic non-group A streptococci causa pharyngitis?; Rev. Inf. Dis. 10(3):587-601.
6. Chretien J; C.G.McGinnis; J.Thomson; E.Delaha & V.F.Garagusi; 1979. Group B beta-hemolytic streptococci causing pharyngitis; J.Clin.Microbiol. 10(3):263-6.
7. Cohen J.G.; 1991. *Staphylococcus*, p. 203-4. In: S. Baron, M.D & P.M. Jennings (Ed), Medical Microbiology. 3^a Ed. C.L. USA.
8. Facklam R.R. & J.A. Washington II; 1991. *Streptococcus* and related catalase-negative gram-positive cocci, p. 238-257. In: A. Balows, W.J. Hausler Jr, K.L. Hermann, H.D. Isenberg & H.J. Shadomy (Ed), Manual of Clinical Microbiology. 5^a Ed. A.S.M, Washington, D.C., USA.
9. Facklam R.R.; 1980. Manual de procedimientos, aislamiento e identificación de estreptococos; CDC. Atlanta. Georgia USA.
10. Fishman A.P.; 1980. Pulmonary diseases and disorders; Mc Graw Hill; Book Company.
11. Finegol S.M.; W.J. Martin; E. Bailey & Scott's; 1978. Diagnostic Microbiology; 5^a Ed. Ed Mosby; USA.

12. García R.G; S.E. Pizarro; S.L. Angel & Lugo de la F.G; 1991. Estudio epidemiológico y etiológico de las infecciones respiratorias agudas (IRA) en niños menores de cinco años; Rev. Lat-amer. Microbiol. 33:109-119.
13. Giono Cerezo S; 1987. Aspectos inmunológicos de la fiebre reumática; Cardí; V(6):138-142.
14. Gómez Vega C; 1990. Microbiología en Otorrinolaringología; BIOQUIMIA; XV(59).
15. Gossling J. 1988. Occurrence and Pathogenicity of the *Streptococcus milleri* Group; Rev. Inf. Dis; 10(2):257-285.
16. Holm S.E.; A. Norby; A.M. Bergholm & M. Norgen; 1992. Aspects of pathogenesis of serious group A streptococcal infection in swedeng. 1988-1989; J. Inf. Dis. 166:31-37.
17. Isenberg H.D. & D'amato; 1991. Indigenous and pathogenic microorganism of humans; p. 2-5. In: A. Balows; W.j.Hausler Jr; K.L. Herrmann; H.D. Isenberg & H.J. Shadomy (Ed); Manual of Clinical Microbiology; 5^a Ed. A.S.M.; Washignton, D.C. USA.
18. Isenberg H.D. & B.G. Painter; 1991. Microorganismos nativos y patógenos del hombre; p. 43-52. In: Lennette; A. Balows & W. Hausler J. (Ed); Manual de Microbiología Clínica; 3^a Ed. A.S.M. Washington, D.C. USA.
19. Jawetz E; J.L. Melnick & E.A. Adelberg; 1987. Flora normal; p. 78-80. Microbiología Médica; 12^o Ed. Ed. Manual moderno. México.
20. Jevitz M.p; 1991. *Streptococcus*; p. 215-219. In: S. Baron; M.D. & P.M. Jennings (Ed); Medical Microbiology; 3^a ED. C.L. USA.
21. Johnson D.R; R.L. Stevens & E.L. Kaplan; 1992. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes asociated with severe systemic infections, rheumatic fever, o uncomplicated pharyngitis; J. Inf. Dis.; 166:374-82.

22. Kloos W.E. & D.W. Lamber Jr; 1991. *Staphylococcus*; p. 222-237; In: A. Balows; W.J. Hausler Jr. K.L. Herrmann; H.D. Isenberg; Shadomy (Ed); Manual of Clinical Microbiology; 5^a Ed. A.S.M.; Washington D.C. USA.
23. Lawrence J; D.M. Yajko & H. Keit; 1985. Incidence and characterization of beta-hemolytic *Streptococcus milleri* differentiation from *S. pyogenes* (Group A), *S. equismitlis* (Group C), and large-colony Group G streptococci; J. Clin. Microbiol. 22(5):772-777.
24. Mac Faddin J.F.; 1980. Biochemical tests for identification of Medical bacteria; 2^a Ed. Ed. Williams & Wilkins; Co. Eng.
25. Molina A.M.; G. Coratza; R.A. Musmanno; N. Figura & G.M. Rossolini; 1985. Production of serum-opacity by *Streptococcus-pyogenes* strains isolated from pharyngitis in children prevalence of rheumatogenic M types among opacity factor negative strains; EUR. J. Epidemiol; 1(1):37-41.
26. Moritz D.; T.Cleary; 1986. Infecciones del aparato respiratorio superior; Infectología; 2(55):72.
27. Murray P.; 1990. Medical Microbiology; Ed. Mosby Company. USA.
28. Musher D.M. & Fainsteinv; 1981; Adherence of *Staphylococcus aureus* to pharyngeal cells from normal subjects, smokers, staphylococcal carries and patients with viral infections; Zentralbl. Bakteriol. Microbiol. Hyg (Germany, west); 251/suppl; 10:1011-1016.
29. Netter F.H; 1984. Sistema respiratorio; Ed. Salvat. México.
30. Nuñez P.C.; E.M. Lugo & Colonina Barranco; 1986. Infecciones respiratorias agudas; Fac. Med. UNAM.
31. O'Connor M.C. & C. Liu.; 1991. Infections of the respiratory system; p. 1149-1160. In: S. Baron; M.D. & P.M. Jennings (Ed); Medical Microbiology; 3^a Ed. C.L., USA.

32. Patrick C.D.; 1991. Normal flora; p. 123-4, 127-8. In: S. Baron; M.D. and P.M. Jennings (Ed); Medical Microbiology; 3^a Ed. C.L. USA.
33. Pimentel I.T.C.; 1990. Identificación de estreptococos provenientes de infección respiratoria aguda (IRA) de niños menores de cinco años internados en el hospital infantil de Legaria. Tesis profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; IPN, México D.F.
34. Pío A; J.Leowsky & F.Luelmo; 1984. Programa de la OMS de infecciones respiratorias agudas en la infancia. Boletín de la OPS; 96(4)
35. Poole P.M. & G. Wilson; 1976. Infection with minute-colony-forming beta-hemolytic streptococci; J. Clin. Pathol; 29:740-5.
36. Ruiz Palma M; 1987. Dx de laboratorio de estreptococos (Lancefield); Infectología; 1(1):15.
37. Schwartz B; J.A Elliott; J.C. Butler; P.A. Simon; B.L. Jameson; G.E. Welch & R.R. Facklam; 1992. Cluster of invasive group A streptococcal infections in family, hospital, and nursing homesettings; Clin. Inf. Dis; 15:277-84.
38. S.S.A. Dirección General de Epidemiología; 1989. Estadísticas Vitales; México.
39. Tylewska S. & W. Hryniewicz; 1987. *Streptococcus-pyogenes* cell walls protein responsible for binding to pharyngeal epithelial cells; Zentrabl Bakteriol Microbiol Hyg. Ser A; 265 (1-2):146-150.
40. Vega L. & H. García; 1982. Bases esenciales de la salud pública; Ed. Prensa Médica Mexicana; México.