

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Investigación de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en niños menores de cinco años aparentemente sanos que acuden a las guarderías Margarita Salazar de Erro y Laura Pérez de Batiz

Presenta

Francisco Ramón Vázquez Hernández

Para obtener el título de

Químico Farmacéutico Biólogo

Directora

Dra. Martha Asunción Sánchez Rodríguez



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 esta 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.

A mis padres:
+ Jesús Vázquez Tavares
+ Maria Hernández Torres
Dedico con cariño y respeto este trabajo a la memoria de quienes
Me supieron guiar en mi camino y en la vida, gracias por su apoyo
+ Rosa Campos Vázquez
+ Josefina Vázquez Hernández

A mi esposa:
Lourdes : que con su apoyo y amor logro que se
Concluyera este proyecto satisfactoriamente muchas
Gracias.

Con mucho agradecimiento y respeto al Sr Juan Carlos Cruz
Gracias por tu amistad y apoyo en los momentos precisos.

A Jonathan con cariño para mi sobrino que me da tantas satisfacciones.

A mi Asesora Dra. Martha Sánchez Rodríguez
Quien con su asesoría contribuyo de manera determinante en este trabajo

Al jurado:
Dra. Martha Sánchez Rodríguez
QFB Ma. De las Mercedes Zamudio Durán
QFB Roberto Cruz González Meléndez
QFB Yolanda Flores Cabrera
QFB Víctor Hugo Becerra López
Por su valiosa cooperación y oportunas sugerencias que permitieron
Enriquecer este trabajo así como por su tiempo, apoyo, comprensión.
Muchas Gracias.

ÍNDICE

Introducción	1
Problemática	1
Marco teórico	3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	8
<i>Haemophilus influenzae</i>	9
<i>Neisseria meningitidis</i>	11
Planteamiento del problema	14
Objetivos	15
Hipótesis	16
Material y equipo	17
Diseño de estudio	19
Criterios de inclusión y exclusión	19
Técnicas	20
Procedimiento para siembra , aislamiento e identificación de cepas	20
Resultados	32
Discusión de resultados	35
Conclusiones	38
Referencias	39
Anexo	43

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) representan uno de los problemas principales de salud entre los niños menores de cinco años de los países en desarrollo.

En la región de América, las IRA se ubican entre las primeras cinco causas de defunción de menores de cinco años y representan la causa principal de enfermedad y consulta de los servicios de salud (1,2).

En los países en vías de desarrollo la tasa de mortalidad por IRA en la infancia son significativamente más altas que en los países desarrollados, como Canadá y EU. Un grupo de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó una mortalidad anual por IRA entre 16 a 30 por 100,000 niños menores de cinco años en los países subdesarrollados, como Haití, Bolivia y Paraguay entre otros (1,2).

En México las IRA ocupan el primer lugar como causa de enfermedad a nivel nacional. Según información de la Secretaria de Salud, en el Distrito Federal, por cada 100,000 habitantes 291110 reportan episodios de infecciones respiratorias, mientras en el Estado de México la relación es de 23208 por cada 100,000 habitantes (3,4).

Las enfermedades se presentan en cualquier etapa de la vida pero principalmente en niños y ancianos sobre todo en individuos con factores predisponentes tales como: enfermedades debilitantes, desnutrición, inmunosupresión, etc. Por ejemplo, en México en el año de 1997 la neumonía ocupó el 3° lugar como causa de muerte en la población infantil, con 5375 defunciones (tasa de 199.2 por 100,000), y en los preescolares la tasa fue de 12.5 por 100,000 (5).

Las infecciones respiratorias se clasifican como de vías respiratorias altas y bajas, de acuerdo a su evolución pueden ser IRA leve, moderada o grave; afectando principalmente a niños y ancianos en épocas de invierno y principios de primavera (2,3).

Las IRA son más frecuentes en los meses de diciembre y enero, se presentan en regiones frías y sobre todo donde ocurren cambios de temperatura y no hay predilección por sexo.

En las IRA se ven involucrados gran variedad de microorganismos como lo son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides*, *Candida albicans*, *Eschericia coli* y *Pseudomona aeruginosa* (5,6,7).

Problemática

La morbilidad de enfermedades en niños menores de cinco años siempre ha sido motivo de preocupación para la salud pública. Desde hace varias décadas se ha trabajado por disminuir la tasa de mortalidad infantil impulsando acciones de salud como control de enfermedades diarreicas e inmunizaciones entre otros.

El trabajo de todas las personas comprometidas con la niñez ha logrado disminuir el número de muertes causadas por enfermedades diarreicas e inmunoprevenibles, lo cual ha hecho que las infecciones respiratorias agudas cobren mayor importancia llegando a ocupar el primer lugar de

mortalidad en esta población a nivel mundial según datos de la Organización Mundial de la Salud (7,8).

La problemática alrededor de las infecciones respiratorias es bastante compleja ya que con su alta incidencia, rápida evolución y grandes conocimientos de los signos que indican gravedad, disfrutan en gran medida su control.(7,8).

El diseño de la investigación es experimental transversal, la población son niños menores de cinco años que acuden a las guarderías del Instituto Politécnico Nacional (Margarita Salazar de Erro y Laura Pérez de Batiz).

MARCO TEÓRICO

Siguiendo una descripción anatómica, podemos decir que uno de los agentes causantes más importantes de infección aguda de las vías respiratorias altas es el estreptococo beta-hemolítico del grupo A. Estadísticamente es la causa más común de faringoamigdalitis bacteriana exudativa aguda (1,2).

La importancia de las infecciones estreptocócicas del grupo A es su consecuencia a fiebre reumática principalmente a carditis reumática con posibilidades de formación de cicatrices irreversibles y peligrosas en las válvulas cardiacas (7,8).

Todo paciente afectado por una infección aguda, la que caracterice por inflamación faríngea, deberá ser evaluado en términos de conocer si existen o no estreptococos del grupo A. Si están presentes, su erradicación eficaz con antibiótico evitara en la mayoría de los casos que aparezcan casos de fiebre reumática o carditis reumática.

Algunas veces, otras bacterias ocasionan faringoamigdalitis o infección en otras zonas de las vías respiratorias altas. Entre las bacterias que provocan estas infecciones se encuentran los neumococos, meningococos y *H influenzae*.

El neumococo causa aproximadamente 1,200,000 defunciones cada año y es el agente etiológico más frecuente en neumonías adquiridas en la comunidad. La incidencia de neumonía neumocócica es diez veces mayor en los países en desarrollo que en los países desarrollados (11,14).

La carga de infección neumocócica en menores de cinco años así como la creciente emergencia mundial de cepas de neumococo resistente a anti-microbianos hace que la enfermedad neumocócica sea una prioridad en la salud pública del nuevo milenio (11,14).

El neumococo coloniza la nasofaringe desde el primer día de vida adhiriéndose las células del epitelio ciliar, el primer serotipo aparece aproximadamente a los seis meses de edad. En la edad adulta se alcanzan a presentar alrededor de 90 serotipos. Los anticuerpos contra la cápsula son protectores, excepto en los primeros años de vida, por cuanto el sistema inmune humano sólo adquiere su madurez hasta los 4 a 8 años de vida; por debajo de esta edad, los antígenos del polisacárido capsular no estimulan las células T-cooperadoras y no responden a la exposición por carácter de memoria inmune (11,16).

Así mismo, en niños mexicanos menores de cinco años, una tercera parte de las neumonías son producidas por *Haemophilus influenzae*, principalmente durante el periodo invernal y casi siempre con antecedentes de infección de vías respiratorias superiores y la muerte por neumonía representa hasta un 50% de todas las defunciones en niños menores de cinco años de edad (8,9).

Dentro de las bacterias anaerobias los miembros del género *Bacteroides* y los estreptococos microaerofílicos se encuentran frecuentemente involucrados en las infecciones de los senos

paranasales y el oído medio; estas bacterias se asocian comúnmente con infecciones virales de la nariz y la faringe respectivamente (11;16).

Los estreptococos del grupo A son la causa principal de las infecciones bacterianas de las membranas mucosas de la pared posterior de la faringe y las amígdalas o las regiones amigdalinas de los pacientes que sufren amigdalectomía. Por lo general la infección invade estructuras anatómicas contiguas como los pilares amigdalinos posteriores, la úvula y el paladar blando. Los estreptococos del grupo A ocasionan supuraciones que no son la faringe y las amígdalas.

La otitis media es una enfermedad que ataca a los niños muy pequeños y su mayor frecuencia ocurre en los primeros años de vida, los episodios repetitivos agudos o las alteraciones inflamatorias crónicas debilitan la capacidad auditiva y provocan la consecuente disfunción del habla.

La infección de la faringe o las amígdalas por *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, constituye sólo probablemente una pequeña porción de los casos de faringoamigdalitis bacteriana aguda, de hecho se demostró que los neumococos producen una adherencia notablemente reducida a las células de la zona bucofaringea *in vivo e in vitro* y especialmente cuando son capsulados (14).

Dada la importancia de estos microorganismos, en los cuadros de infección de vías respiratorias altas, se hará una breve descripción de los más frecuentes patógenos.

Streptococcus pyogenes

Son cocos grampositivos con un diámetro celular de alrededor de 0.6-1µm de diámetro su desarrollo en cadenas es una característica distintiva y el número de células en la cadena depende del ambiente en que se encuentre, es frecuente observar largas cadenas en los exudados purulentos, diplococos y cocos aislados en los tejidos (16,17).

Los requerimientos nutricionales de estreptococos son complejos, de manera que los medios de cultivo deben contener infusión de tejidos de cerebro y corazón, peptona, glucosa y un amortiguador. El pH óptimo del medio está entre 7 y 7.5, en muchos casos el suero sanguíneo permite el desarrollo del estreptococo del grupo A, para lo cual se incorpora al medio descrito sangre de carnero para el desarrollo de éstos sobre la superficie del agar sea óptimo (17,18).

Streptococcus pyogenes da lugar a colonias blancas o grises de 1 a 2µm de diámetro, rodeadas de zonas de lisis completa, los eritrocitos presentes en el medio de cultivo (hemólisis tipo β), aunque es posible en raras ocasiones aislar cepas que no expresen la hemolisina en la superficie. Algunas cepas las que producen en grandes cantidades ácido hialurónico capsular, crecen con la apariencia de una gota de agua en la placa. Pero esto ocurre también de forma excepcional. Por lo general, las cepas menos mucosa asumen un aspecto arrugado denominado mate, mientras que las colonias pequeñas y opacas carecen de cápsula y proteína M detectable, se denominan brillantes (16,18).

Los estreptococos son homofermentadores ya que producen esencialmente sólo L-ácido láctico a partir de la degradación de la glucosa y son catalasa negativos (16).

La presencia de polisacáridos, proteínas y polímeros del ácido teicoico, inmunológicamente específicos, en las paredes celulares de los estreptococos, permite clasificarlos en grupos y tipos dentro de los grupos (17,18).

Los estudios recientes demostraron que los estreptococos β-hemolíticos de las infecciones de las vías respiratorias altas poseen un antígeno común denominado A (17,18).

Una de las propiedades más importantes para la identificación positiva de los estreptococos es la hemólisis. La síntesis de hemolisinas extracelulares, que lisan los glóbulos rojos, es característica y permite la clasificación provisional de las cepas del grupo A, sólo el 2% de las cepas del grupo A no producen β-hemólisis. Normalmente se utiliza sangre de carnero (al 5%) en agar para determinar la β-hemólisis (hemólisis total, dando una transparencia al medio). La acción lítica se debe a una proteína antigénica, oxígeno labil, la estreptolisina O (SLO), y una lipoproteína no antigénica, oxígeno estable, la estreptolisina S (SLS). La hemólisis superficial típica, en la placa de agar, se debe principalmente a la estreptolisina S. La hemólisis por debajo de la superficie es debida a la estreptolisina O. La sangre de carnero se utiliza frecuentemente por que son menos las cepas estreptocócicas que no pertenecen al grupo A, que provoca β-hemólisis en la sangre de carnero (17,18).

La α -hemólisis se caracteriza por que presenta una coloración verdosa de la hemoglobina que circunda a la colonia en la placa. Los estreptococos que pertenecen a varios grupos inmunológicos diferentes del grupo A, son generalmente del tipo α -hemolítico aplicándole el termino Viridans a este grupo (17,18).

Otro factor importante es la identificación del estreptococo del grupo A es la sensibilidad a la bacitracina. Aproximadamente el 95% de las cepas del grupo A son sensibles a dicho antibiótico.

La sensibilidad se determina mediante el uso de un disco de papel filtro que contiene 0.02 a 0.044 unidades de bacitracina colocado sobre la placa de agar sangre inoculada con la cepa problema (17)

Se ha identificado un gran número de constituyentes somáticos y productos extracelulares en la bacteria que en ocasiones actúan como factores de virulencia, como la proteína M, el ácido hialurónico, los ácidos lipoteicoicos, enzimas y toxinas. *Streptococcus pyogenes* es responsable de un amplio abanico de infecciones más o menos graves que por orden de frecuencia son: faringitis, infecciones cutáneas (impétigo y erisipela) y de los tejidos blandos, sepsis puerperal, neumonía, endocarditis, meningitis y artritis. Incluso origina cuadros de fiebre escarlatina y el síndrome del shock tóxico, debido a cepas productoras de toxinas. En los últimos años ha habido un incremento en la notificación de los casos de shock tóxico producidos por *Streptococcus pyogenes* en Estados Unidos y Europa y, en la mayoría de ellos, las cepas que lo originaban eran productoras de proteína M1 o M3. Todo parece indicar que son estas exotoxinas las que están directamente implicadas en la producción del cuadro (19,20).

Streptococcus pneumoniae

Los neumococos tienen aspecto de diplococos grampositivos con formas lanceoladas, de 0.5 a 1.125 μm de diámetro las células pueden presentarse en forma de racimos y no es raro que formen cadenas de diversas longitudes, ciertas cepas tienden a la formación de cadenas y por ese motivo no se le distingue entre los estreptococos (21,22).

Por lo general, los neumococos no se diferencian de otros cocos grampositivos en las preparaciones de esputo, líquido cefalorraquídeo y otros líquidos, coloreados con la técnica de Gram, además la cápsula no se ve cuando el material es analizado directamente o cuando se realiza la tinción de Gram, ya que la cápsula sólo se ve mediante coloraciones especiales o aprovechando cuando ésta se hincha y se hace visible cuando se incorpora al medio de cultivo un antisuero específico, esto se conoce como reacción de Neufeld (21,22).

En cultivos de agar sangre de carnero, presentan colonias lisas, pequeñas, brillantes, circundadas por un halo verde de α -hemólisis. Son anaerobios facultativos y algunos aislamientos clínicos son exigentes en CO_2 . El neumococo pierde su viabilidad 60°C por 30 minutos, se lisa fácilmente, es soluble en bilis, sensible a la optoquina y muchos serotipos son virulentos para el ratón. Puede perder su característica de grampositivo después de la fase logarítmica (21,22).

Streptococcus pneumoniae requiere para su desarrollo de un medio enriquecido: las colonias se asemejan a las de otros α -hemolíticos, ya que provocan una reacción hemolítica en placas de agar sangre, si la cantidad de antígeno capsular es grande, como la cepa 3 que crece como colonias grandes mucoides (22).

Los neumococos se desarrollan en cultivos aerobios, si bien son anaerobios facultativos, se les clasifica dentro de las bacterias productoras de ácido láctico pues esta sustancia es uno de los principales productos metabólicos. Durante la fermentación ocurre una acumulación de peróxido de hidrógeno y puesto que los neumococos no sintetizan peroxidasa ni catalasa, su viabilidad celular sufre efectos adversos conforme el cultivo envejece. La viabilidad se ve incrementada si se incorpora sangre al medio de cultivo ya que los eritrocitos contienen cantidades adecuadas de catalasa (22,23).

Las células neumocócicas mantenidas en caldo o placas de agar sangre pueden morir por la activación de una enzima endógena autolítica, que es una L-alanina-muramidasa y es activada por varios agentes tensoactivos. Este fenómeno es la base de la prueba de solubilidad en bilis, debido a que no poseen las enzimas autolíticas, no siendo así el neumococo que al lisarse se solubiliza en bilis.

Streptococcus pneumoniae fermenta diversos carbohidratos al igual que los estreptococos, pero sólo los primeros fermentan la inulina y que es sensible a la optoquina, puede ser clasificado tentativamente como *Streptococcus pneumoniae* (20,21,22).

Los principales componentes de la superficie del neumococo son: la membrana plasmática, la pared celular y la cápsula (24).

La pared celular consiste en un esqueleto de peptido-glucano, típico de las bacterias grampositivas. En este esqueleto se anclan el polisacárido capsular, el polisacárido C de la pared celular y las proteínas (24,25).

El polisacárido capsular es un determinante esencial para la antigenicidad del neumococo y todo el sistema de la clasificación en serotipos se basa en su diversidad antigénica, es el responsable de la diferenciación de esta única especie en 90 serotipos (25).

El polisacárido capsular fue descrito como el primer antígeno, no proteico inductor de anticuerpos en humanos. La cápsula se sintetiza rápida y extensivamente durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano y el antígeno polisacárido capsular puede ser detectado en el suero y orina de pacientes con enfermedades neumocócicas (25,26).

Staphylococcus aureus

Son cocos grampositivos de 0.5 a 1 μm de diámetro, inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos, caracterizados por su agrupación en forma irregular en racimos, producen catalasa y descomponen los azúcares por fermentación, siendo característica la fermentación de manitol (21,22).

Son bacterias poco exigentes, que se cultivan fácilmente en medios comunes y presentan cierta resistencia a los agentes externos, por cuyo motivo se pueden encontrar en la naturaleza, especialmente en el medio ambiente que rodea al hombre, formando parte de la flora normal de la piel y las mucosas e interviniendo en procesos patógenos diversos, sobre todo en infecciones supuradas e intoxicaciones alimentarias. (21,22)

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* es generalmente más exuberante en condiciones aerobias que en condiciones anaerobias, la multiplicación de algunas cepas es acrecentada por un aumento de la tensión de CO_2 , las distintas colonias en agar nutritivo están claramente definidas, son redondas, convexas y poseen un diámetro de 1 a 4 μm , el clásico color amarillo dorado se debe a los carotenoides. La pigmentación es generalmente apreciable tras 18 a 24 horas de crecimiento en medio anaerobio o en un cultivo líquido. Se aprecia una acentuada variación que va desde el blanco hasta el naranja oscuro, entre las cepas e incluso entre las distintas colonias de una misma cepa (21,22).

En agar sangre es frecuente ver una zona clara de hemólisis alrededor de las colonias. Dado que *Staphylococcus aureus* puede producir cuatro hemolisinas distintas, con aspectos líticos diferentes, la extensión de la hemólisis depende tanto de la cepa como del tipo de sangre, la sangre humana puede inhibir el crecimiento bacteriano o alterar el aspecto de las colonias y no debe de emplearse (21)

Los estafilococos figuran entre los más resistentes de todas las bacterias que no forman esporas. Permanecen vivos durante meses en la superficie de la placa sellada y almacenada a 4° C y pueden ser cultivadas a partir de muestras de pus desecadas de muchas semanas. Algunas cepas son relativamente termo resistentes, soportando temperaturas de 60° C durante 30 minutos. Aunque muy sensibles a la acción bactericida de ciertos colorantes básicos (por ejemplo violeta de genciana), son más resistentes que la mayoría de las bacterias a los desinfectantes, tales como el cloruro de mercurio y el fenol. Así mismo, *Staphylococcus aureus* tiene una elevada tolerancia a la sal y a los medios que contienen un 7.5 a 10% de NaCl permiten su crecimiento mientras que inhiben otros microorganismos (21,22).

En *Staphylococcus aureus* el ADN extracromosómico tiene particular importancia en relevante problema clínico de la resistencia antibiótica. Cuando Fleming (1929), observó por primera vez la acción bactericida del moho *Penicilium notatum* en este germen, se encontró que la mayoría

de las cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* de enfermos eran sensibles al antibiótico. Ahora del 60 al 90% de las cepas son resistentes. Esta resistencia es causada por la penicilasa (β -lactamasa) una enzima codificada por un plásmido que desdobla el anillo betalactámico del núcleo de la penicilina. Algunos plásmidos penicilasa codifican también para la resistencia al cloranfenicol, tetraciclinas, neomicinas y kanamicinas (22).

Haemophilus influenzae

Es un microorganismo aerobio y anaerobio facultativo con forma de bacilo gramnegativo pleomórfico no esporulado; aparece como filamentos largos o bacilos cortos, en ocasiones simulan cocos grampositivos. Para su crecimiento requiere de medios de cultivo enriquecidos que contengan el factor V (NAD), denominado nicotina adenin dinucleótido y el factor X, una protoporfirina que se obtiene de los pigmentos hemáticos. Estos pigmentos sirven para definir género y especie de *Haemophilus* (21,22).

El mejor medio para su crecimiento es el agar chocolate suplementado con los factores V y X incubado a 37° C durante 24 o 48 horas con una tensión parcial de CO₂ (18,19). Macroscópicamente las colonias tienen forma redonda irregular y convexa, color blanquecino transparente sin olor característico.

Otros microorganismos pueden aportar el factor V necesario para el desarrollo de *Haemophilus influenzae*. Por ejemplo, las colonias de estafilococos que se desarrollan sobre agar chocolate producen suficiente factor V para permitir el crecimiento de *Haemophilus influenzae* en la vecindad inmediata de las colonias mencionadas, esto se conoce como fenómeno satélite. No se sabe si la producción del factor V por otros microorganismos, o por el propio huésped contribuya al desarrollo de *Haemophilus influenzae*, y por lo tanto coadyuva a su patogenicidad (20).

El principal componente antigénico de *Haemophilus influenzae* es el polisacárido capsular. Se han descrito seis tipos antigénicos diferentes denominados con letras de la A hasta la F. La tipificación se realiza mediante la reacción de Neufeld, utilizando antisueros específicos o a través de otras pruebas serológicas. El polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo B, es el que con mayor frecuencia provoca enfermedades en los humanos, resultando ser polirrifosfato. Las células de *Haemophilus influenzae* contienen otros antígenos. Se descubrió que el antígeno M, una proteína, está presente en todos los tipos y al parecer es específico de especie. Como la mayoría de las bacterias gramnegativas, *Haemophilus influenzae* contiene también una endotoxina. La infección en humanos, especialmente en niños, da lugar a la formación de anticuerpos contra antígenos de la membrana externa (22).

La mayor parte de los anticuerpos contra *Haemophilus influenzae* van dirigidos contra el PRP (polirribitol ribosa fosfato) de la cápsula; estos anticuerpos tienen actividad opsonica y bactericida y se cree que niveles de anticuerpos mayores a 1 son protectores (33).

Los niños menores de 18 meses de edad no responden adecuadamente formando anticuerpos después de la infección o inmunización con PRP, esta es la edad con la mayor riesgo, por lo que un buen número de investigadores se encuentran trabajando en la búsqueda de un buen inmunógeno eficaz que confiera la protección. Estudios recientes sugieren que la respuesta inmunitaria a otros componentes de la pared celular como LPS (lipopolisacáridos) o la OMP (proteína de la membrana externa) pueden ser igualmente importantes (33,34).

La infección en humanos, especialmente en niños, da lugar a la formación de anticuerpos contra antígenos de la membrana externa (33,34)

Del 10 al 50% de los niños menores de cinco años están colonizados con cepas de *Haemophilus influenzae* y esto puede favorecer la transmisión del microorganismo a individuos no inmunes o genéticamente susceptibles (34).

La patogénesis de esta bacteria se inicia con la colonización de las mucosas de las vías respiratorias altas, ya que la bacteria es capaz de evadir la respuesta inmunológica de las mucosas mediante la producción de una proteasa que inactiva la IgA local (34).

Por los reportes de los casos de ingresos a los hospitales del Distrito Federal y de la ciudad de Puebla se sabe que en México, *Haemophilus influenzae* tipo B es el responsable del 20 al 45% de las meningoencefalitis bacterianas en niños menores de cinco años de edad (34).

Las infecciones respiratorias agudas constituyen la causa más común de mortalidad en niños menores de cinco años, dentro de éstas, la neumonía es debida a agentes virales, aunque las bacterias juegan un papel importante y principalmente *Haemophilus influenzae* tipo B (33,34).

En nuestro país se ha aislado hasta un 21% con una distribución estacional en invierno. Generalmente se presentan manifestaciones pulmonares con infiltrado global o segmentado y con frecuencia se acompaña con derrame pleural, lo que aumenta la posibilidad de aislar adecuadamente al agente etiológico (34). En niños mexicanos menores de cinco años, una tercera parte de las neumonías son producidas principalmente por el periodo invernal y casi siempre con el antecedente de infección de vías respiratorias superiores y la muerte por neumonía representa hasta un 50% de todas las defunciones en niños menores de cinco años de edad (33,34).

Se conoce poco a cerca del mecanismo de daño a las vías respiratorias por *Haemophilus influenzae* en adultos. Se sugiere que algunas deficiencias en las actividades fagocíticas predisponen a la neumonía causada por esta bacteria. Por otro lado, la capacidad de producción de proteasa para la IgA así como el efecto cicloestático que ocasiona el lipolisacarido, favorecen

la colonización y desaminación del microorganismo en las vías respiratorias superiores e inferiores (35).

Otra patología es la conjuntivitis por *Haemophilus influenzae* biovar III o *Haemophilus aegyptius* y desde 1984 se ha relacionado con un síndrome grave que se antecede de una conjuntivitis purulenta llamado “fiebre púrpura brasileña”, la cual es una infección sistémica grave que se antecede de una conjuntivitis purulenta (34,35).

El uso indiscriminado de diversos agentes antimicrobianos ha favorecido la selección de cepas resistentes, por lo que se hace necesario evaluar periódicamente la susceptibilidad de los microorganismos aislados de pacientes y portadores para establecer los cambios necesarios en las decisiones terapéuticas.

La prevalencia de cepas resistentes de *Haemophilus influenzae* se ha documentado continuamente desde que, en 1974 se reportaron los primeros fracasos en la quimioterapia de la meningoencefalitis con penicilina. El mecanismo de resistencia a este antibiótico involucra hasta un 95% de los casos de la síntesis y la producción de la enzima β -lactamasa. En nuestro país aproximadamente el 25% de los aislamientos de *Haemophilus influenzae* son productores de β -lactamasa (35,36).

Neisseria meningitidis

Este microorganismo es parásito estricto del hombre y causa en él meningitis agudas y meningocemia. Como muchas otras enfermedades la meningitis meningocócica también como meningitis cerebral epidémica es sin duda muy antigua (42).

Los meningococos son esferas de 0.6 a 1.0 μm de diámetro, ocasionalmente más grandes, se encuentran en pares (diplococos) con sus lados adyacentes generalmente achatados dando la típica apariencia reniforme y raramente en tétradas o pequeños racimos, en cultivos viejos se observan formas bizarras como resultados parciales de auto lisis, son microorganismos gramnegativos, inmóviles, no producen esporas y sólo tres tipos antigénicos descritos hasta ahora poseen cápsula, estructura que se puede ser demostrada en cepas aisladas recientemente, empleando antisueros específicos. Los meningococos son microorganismos que requieren de factores de crecimiento, tales como los que se encuentran en la sangre completa, suero y ciertos extractos vegetales. Se ha sugerido que éstos absorben sustancias tóxicas del medio de cultivo permitiendo entonces el crecimiento de *Neisseria meningitidis*. El desarrollo de muchas cepas es beneficiado cuando se cultivan en una atmósfera que contenga un 10% de CO_2 (42,43).

El meningococo crece bien entre 35° y 37° C su crecimiento no se lleva a cabo en condiciones de anaerobiosis estricta, consecuentemente estos organismos son esencialmente aerobios, aunque pueden crecer en condiciones de microfilia (42,43).

En contraste con las cepas normales menos patógenas que habitan en el huésped y pertenecen a otras especies dentro de la familia *Neisseriaceae* los meningococos requieren de medios de cultivo enriquecido y complejo. Dichos medios deben ser tratados o preparados de una manera especial, con el fin de tratar de eliminar ciertos productos tóxicos que inhiben el desarrollo del meningococo (42,43)

La mayoría de los laboratorios de Microbiología clínica utilizan placas de agar sangre preparadas con sangre de carnero en agar derretido, calentado entre 80° y 90° C, el cual se denomina agar “chocolate” debido al color café que adquieren (42,43).

El medio de Thayer - Martín es particularmente útil en los estudios epidemiológicos para detectar a aquellas personas que tienen *Neisseria meningitidis* en la región bucofaringea o la nasofaringe (44).

Según se piensa, la nasofaringe constituye un medio más húmedo, con una concentración de bióxido de carbono más alta que la faringe, sin embargo, es dudoso que lo anterior baste para explicar por que *Neisseria meningitidis* coloniza de preferencia la región de la nasofaringe de las vías respiratorias altas. La adherencia selectiva de *Neisseria meningitidis* a sustancias receptoras específicas sintetizadas por las mucosas de la nasofaringe, podrían explicar lo anterior (44,45).

La nasofaringe es el mejor sitio de cultivo si se requiere determinar si una persona esta infectada por el meningococo. Para obtener material de esta región anatómica se requiere de hisopos especiales de alambre delgado, con punta de algodón, los cuales se pasan a través de las fosas nasales, o bien escobillones con alambre doblado con punta de algodón entre en contacto con la mucosa de la nasofaringe, por encima del paladar blando y la úvula (44,45).

La identificación de *Neisseria meningitidis* se hace por pruebas bioquímicas, en primera instancia oxida la glucosa y la maltosa, es catalasa positiva y oxidasa positiva Las pruebas de fermentación se hacen de rutina en medios semisólidos que contengan Gelosa-Tripticasa-Cistina al 1% del carbohidrato específico (44,45).

Han sido aislados por fraccionamiento químico tres antígenos somáticos, uno de ellos formado por nucleoproteínas denominadas sustancia P, encontrando también en otras neisserias y neumococos tipo III. Parece ser que esta sustancia contribuye a la toxicidad del microorganismo. Otra sustancia de tipo carbohidrato que parece formar parte del polisacárido o endotoxina y un polisacárido más llamado sustancia C que se comparte también con las demás neisserias (45).

Se han observado cuatro antígenos capsulares también formados por carbohidratos tipo específico denominados A, B, C, D. El tipo C está formado por ácido sialico y hexosamina. En estos antígenos esta basada la clasificación de *Neisseria meningitidis* (46).

Los meningococos del grupo B contienen una fracción proteínica común a todos los miembros del grupo, que es altamente antigénica. Este grupo contiene también un hapteno llamado *kappa* formado por un complejo polipéptido-carbohidratos, que reacciona con anticuerpos específicos contra el grupo B (46).

La infección se adquiere generalmente a través de gotitas infecciosas por contacto con personas sanas que portan el meningococo en su nasofaringe, después de haberse implantado en nasofaringe, los microorganismos pueden inducir la reacción inflamatoria localizada, progresar a un estadio de rinitis purulenta o permanecer inactivos dando lugar entonces a la aparición o no de signos y síntomas (47).

En sólo una pequeña proporción de la población infectada, el meningococo es capaz de invadir torrente sanguíneo, en algunos casos se limita a una simple bacteremia, sin embargo, en otros los microorganismos son diseminados en diferentes órganos y tejidos dando lugar a lesiones en: piel, oídos, pulmones, glándulas suprarrenales el más importante de todos, el sistema nervioso central. Estas lesiones son generalmente tromboembólicas de donde frecuentemente los meningococos prefieren aislarse en medios de cultivos. Las lesiones en piel característicamente purpúricas y petequiales son el resultado de daño vascular causado por la presencia del meningococo y de sus fracciones endotóxicas. La inflamación y daño de las paredes vasculares pueden conducir a coagulación intravascular, formación de trombos y como consecuencia graves lesiones en la piel, músculos y otros tejidos, uno de estos cuadros es la necrosis hemorrágica de las glándulas suprarrenales, conocidas como síndrome de Waterhouse-Friderichsen (47).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Este estudio forma parte de un proyecto de investigación multidisciplinaria (clave DEP1872385) sobre la infección respiratoria aguda (IRA). En este se han estudiado agentes bacterianos (incluyendo micoplasmas) y vírales en niños menores de cinco años, provenientes de Naucalpan, Estado de México, que son internados en el Hospital Infantil de Legaria del Departamento del Distrito Federal, cuando la gravedad del paciente así lo requiera.

En la primera parte del estudio los resultados obtenidos demostraron que los virus se encontraron en menor proporción que las bacterias; se descubrió que tres de las cepas (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*) que se investigaron en el presente trabajo, fueron las más frecuentemente aisladas.

En nuestro país son pocos informes específicos diseñados para la investigación de las especies bacterianas mencionadas en niños menores de cinco años aparentemente sanos. El estudio en sujetos aparentemente sanos es de importancia para la detección del estado de portador, ya que a través de portadores sintomáticos se puede diseminar una infección y difundir hasta provocar una epidemia. En este sentido es de utilidad conocer la presencia de *Neisseria meningitidis* agente etiológico muy importante de brotes epidémicos en otros países y desconociéndose en México en que proporción se encuentra en el grupo etario motivo de este estudio.

Además se intenta confirmar la baja incidencia de *Streptococcus pyogenes*. Por otro lado de un 20 a un 70% de los seres humanos aparentemente sanos contienen neumococo en las vías respiratorias altas. En el hemisferio norte, la neumonía muestra una distribución comparable a otras infecciones respiratorias, el mayor número de casos ocurren durante los meses fríos del año.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar la prevalencia de portadores de las siguientes bacterias *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en niños menores de cinco años que acuden a guarderías del IPN
- 2.- Conocer los serotipos mas frecuentes de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*.
- 3.- Establecer el porcentaje de cepas de *Streptococcus pneumoniae* patógenas para el ratón.
- 4.- Determinar el porcentaje de cepas de *Haemophilus influenzae* productoras de β - lactamasa.

HIPÓTESIS

En estudios en niños menores de cinco años sintomáticos se encontró que los principales microorganismos causantes son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*, de éstos, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* provocan neumonías que se presentan cuando los mecanismos de defensa están debilitados

Existe la posibilidad de que los niños adquieran el microorganismo sin tener sintomatología (estado de portador).

En estudios anteriores en niños de la guardería del Hospital Infantil de México Federico Gómez de la ciudad de México de abril a octubre de 1999, los microorganismos más frecuentes fueron *Streptococcus pneumoniae* (23.5%), *Haemophilus influenzae* (15%).

Los niños objeto de este estudio se localizan en la zona poniente del Distrito Federal, y se encuentran expuestos a mayor polución, por lo tanto la probabilidad de encontrar microorganismos patógenos en estado de portador será mayor a los porcentajes encontrados en el estudio anterior.

MATERIAL Y EQUIPO

1.-Material biológico

Cepas aisladas de exudado faríngeo de niños de 0 a 5 años provenientes de dos guarderías del centro de desarrollo infantil (CENDI).

Plasma humano

Sangre de carnero

Ratones jóvenes cepas singenicas Balb C

Cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 1965

Cepa de *Haemophilus influenzae* ATCC 7901

Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2.- Medios de cultivo

Agar sal y manitol MCD 715

Base de gelosa sangre BBL 11945

Medio GC BBL11274

Thayer-Martin

Hemina-Bacitracina

BHI

Extracto de levadura BBL11928

Base de CTA BBL11095

Polienriquecimiento Isovitalex 11875

Inhibidor VCN Isovitalex 11926

Caldo estreptococo BBL 11314

Caldo Tood – Hewitt BBL11735

3.-Azúcares

Glucosa

Lactosa

Manitol

Fructosa

Sacarosa

Maltosa

4.-Antimicrobianos

Penicilina

Ampicilina

Discos de optoquina BBL (taxo P), Difco

Discos de bacitracina BBL (taxo A) Difco

5.- Reactivos

Solución salina al 0.85% de NaCl

Reactivos de coagulación para: *Haemophilus influenzae* serotipos A, B, C, D, E, F.

Reactivos de coagulación para: *Neisseria meningitidis* serotipos A, B, C, D.

Agua oxigenada sigma, No.59

Dexicolato de sodio al 10% (sigma D-650)

6.- Material de vidrio

Pipetas pasteur estériles

Tubos de 13 X 100 estériles

Cajas Petri estériles

Ampolletas

7.-Equipo

Autoclave

Centrífuga

Incubadora

Refrigerador a 4°C

Agitador mecánico

8.-Otros

Abate lenguas estériles

Gradillas

Pipetas automáticas de 20-200µl

Puntas estériles

Asas estériles

Hisopos estériles

Tubos capilares

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio transversal, descriptivo en 300 niños menores de cinco años de ambos sexos provenientes de 2 guarderías del Centro de Desarrollo Infantil (CENDI) Margarita Salazar de Erro y Laura Pérez de Batiz. Sus datos en el momento de la toma de la muestra se asentaron en un formulario previamente diseñado para éste (Anexo 1) A todos los niños se les tomó una muestra de exudado faríngeo en ayuno mínimo de 8 horas

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión

Se incluyeron niños menores de cinco años que acuden a las guarderías del IPN Margarita Salazar de Erro y Laura Pérez de Batiz.

Se aceptaron a quienes el médico familiar hubiera diagnosticado clínicamente como sano

Criterios de exclusión

Se excluyeron a aquellos niños que estuvieran en tratamiento con antibiótico

Se descartaron a los niños que no pasaron a examen médico

TÉCNICAS

I.- TOMA DE MUESTRA

Exudado faríngeo

Inclinar hacia atrás la cabeza del paciente e iluminar bien la garganta

Empujar bien la lengua hacia abajo, de modo que pueda observarse la parte posterior de la garganta.

Frotar un hisopo estéril de arriba hacia abajo contra la parte posterior de la garganta y contra cualquier mancha blanca que se encuentre en la zona de las amígdalas.

Deben evitarse tocar la lengua, las mejillas y los carrillos

La muestra se tomó por duplicado colocando un hisopo en caldo estreptococo (enriquecimiento) y el otro en caldo Todd – Hewitt (medio de transporte de transporte).

II.- PROCEDIMIENTO PARA LA SIEMBRA, AISLAMIENTO DE LAS CEPAS E IDENTIFICACIÓN

Los tubos conteniendo las muestras se incubaron a 37° C durante 2 horas para enriquecerlos.

Se inocularon con el material biológico los siguientes medios EMB, gelosa sangre, Thayer – Martín, Hemina- Bacitracina.

Se aislaron por estría cruzada. Las cajas de gelosa sangre, EMB, sal y manitol se incubaron a 37° C de 24 a 48 horas. Los medios de Thayer-Martin y hemina-bacitracina se incubaron a 37° C por 24 a 48 horas con una atmósfera parcial de CO₂ de 5%

Si hubo crecimiento se procedió a realizar la identificación del microorganismo aislado (Diagramas I, II y III).

A) Identificación de *Streptococcus pyogenes*

Diferenciar entre la hemólisis alfa (hemólisis parcial de color verde) y la hemólisis total o aclaramiento del medio.

Resembrar para obtener la cepa pura. utilizando un inóculo abundante y sembrar masivamente en gelosa sangre. .

Colocar un disco de bacitracina (0.04 unidades).

Cualquier zona de inhibición, no importando su diámetro se considero positiva para determinar *Streptococcus pyogenes*.

B) Identificación de *Streptococcus pneumoniae*.

Aislar las colonias alfa- hemolíticas.

Sembrar las colonias sospechosas masivamente y colocar un disco diferencial de optoquina de 6 mm y realizar la susceptibilidad a optoquina

Medir el halo de inhibición (14mm).
Realizar la prueba de solubilidad en bilis.
Prueba de virulencia a ratón

Susceptibilidad a optoquina

La optoquina (hidruro de etilhidrocupreína), es un compuesto al cual *Streptococcus pneumoniae* es susceptible en bajas concentraciones (5µg o concentraciones menores) y por lo tanto inhibe su crecimiento. La optoquina puede inhibir el crecimiento de otros *Streptococcus* alfa hemolíticos, pero en concentraciones altas; es soluble en agua y se difunde rápidamente en el medio, por lo tanto discos de papel de filtro impregnados con optoquina pueden ser colocados directamente sobre la superficie del agar para la realización de la prueba.

Procedimiento

- 1.- Trabajar con un cultivo puro. Inocular una placa de agar sangre de carnero al 5% sembrar con asa el inóculo, en 3 o 4 direcciones, lo cual favorece un crecimiento homogéneo del microorganismo.
- 2.- Colocar el disco de optoquina sobre el inóculo inicial e incube de 18 a 24 horas con atmósfera parcial de CO₂.
- 3.- Medir el tamaño de la zona de inhibición

Solubilidad en bilis:

Las sales biliares, específicamente el desoxicolato de sodio y el taurocolato de sodio, poseen la propiedad de lisar selectivamente a *Streptococcus pneumoniae* cuando se agregan las bacterias en fase de crecimiento activo en medio agar o caldo. *S. pneumoniae* produce enzimas autolíticas (autolisinas) que son las responsables de la depresión o umbilicación características de las colonias viejas de neumococos en medio agar. El agregado de sales biliares activa las autolisinas y acelera la reacción lítica natural observada en los cultivos de neumococos.

La prueba de solubilidad en bilis se puede realizar con un cultivo líquido del microorganismo o con las colonias que se desarrollan en medio agar. Si el microorganismo es soluble, la turbidez de un cultivo en caldo líquido se aclara visiblemente cuando se agregan sales biliares.

Procedimiento

- 1.- Colocar 0.5 mL de un cultivo en caldo infusión cerebro corazón, en cada uno de dos tubos de ensayo. Agregar una gota de rojo de fenol como indicador y NaOH para ajustar el pH a 7.0.
- 2.- A uno de los tubos agregar 0.5 mL de desoxicolato de sodio al 2% y 5 mL de solución salina al 0.86%.
- 3.- Se mantienen ambos tubos a 37° C y se examinan periódicamente durante un plazo de hasta 2 horas. Cuando la turbidez se aclaró se consideró como positivo.

Virulencia al ratón.

En esta prueba se valora la capacidad que tiene el *Streptococcus pneumoniae* de ser virulento al ratón cuando se le inocula la cepa vía intraperitoneal, esto se da como la capacidad de ser mortal para el ratón.

Procedimiento:

- 1.- Preparar una suspensión en caldo infusión cerebro corazón con la cepa aislada de *Streptococcus pneumoniae* al 5%
- 2.- Inocular vía intraperitoneal 0.5mL de la suspensión de *Streptococcus pneumoniae* a un ratón joven (tres meses de edad).
- 3.- Revisar al ratón cada 24 horas para ver su estado
- 4.- En caso de que el ratón muera hacer un cultivo de la cavidad peritoneal
- 5.- aislar la cepa que crezca de la cavidad peritoneal
- 6.- Identificar la cepa aislada

C) Identificación de *Haemophilus influenzae*

Sembrar la muestra en el medio GHBEL (Agar hemina- bacitracina, con extracto de levadura) que es un medio preparado con base de agar sangre, bacitracina para inhibir el desarrollo de otras bacterias, hemina que suministra el factor X y extracto de levaduras como fuente del factor V, incubar a 37° C durante 24 horas, con una atmósfera parcial de CO₂ del 5 al 10 %.

A las colonias sospechosas se les realizó la prueba de satelitismo para determinar los requerimientos de los factores X y V.

A partir de un aislamiento puro de la especie por identificar, preparar una suspensión de células bacterianas en caldo de infusión de cerebro corazón; con este material inocular por estría cruzada la superficie de una placa de agar de Müller– Hinton.

Colocar los discos con los factores X y V sobre la superficie del agar en el área de inoculación a una distancia de 1 cm, entre sí.

Incubar la placa a 35° C con una tensión parcial de CO₂ al 5%, durante 24 hrs.

Examinar visualmente la superficie del agar para comprobar la presencia de desarrollo visible alrededor de una o ambas tiras.

A las cepas identificadas como *Haemophilus influenzae* se les realizó prueba de coaglutinación bacteriana, sensibilidad a ampicilina y producción de *b*-lactamasa.

Determinación del requerimiento de factores X y V

En el comercio hay tiras o discos de papel filtro impregnados de factores x o V. Los factores X y V, ambos hidrosolubles, difunden fácilmente en agar. Los discos o tiras de papel filtro con estos factores se colocan sobre la superficie de un medio deficiente en dichos factores, como el agar soya tripticasa , previamente inoculado en forma masiva con el microorganismo en estudio. La dependencia de la bacteria por los factores X y v se determina observando el patrón de crecimiento de las colonias alrededor de las tiras de papel.

Procedimiento

- 1.- A partir de un aislamiento puro, realizar una siembra masiva en una caja con agar soya tripticasa.
- 2.- Colocar los discos o tiras X y V sobre la superficie del agar en el área de inoculación, a una distancia de 1 a 2 cm entre ellos.
- 3.- Incubar la caja a 35° C en 3-5% de CO₂ durante 18 a 24 horas
- 4.- Examinar visualmente la superficie del agar para comprobar la presencia del crecimiento visible alrededor de los discos.
- 5.-Los aislamientos que dependen únicamente

Producción de indol

La producción de indol es importante para la identificación de muchas especies de microorganismos. El indol es un bencipirrol, producto de degradación del triptófano y las bacterias que poseen la enzima triptófanasasa , son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano y las bacterias que poseen la enzima triptofanasasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoniaco.

La prueba de indol está basada en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehido, contenido en los reactivos de Kovac y de Ehrlich. Se utiliza como sustrato un medio rico en triptófano. En la práctica se emplean medios combinados como SIM, MIO o indol nitrato.

Procedimiento

- 1.- Inocular caldo triptofano enriquecido con 5 % de Fildes con el microorganismo en estudio e incubar a 37° C durante 18 a 24 horas.
- 2.- Añadir 5 gotas del reactivo de Erhlich
- 3.-El desarrollo de un color rojo en la superficie de cultivo nos indica la presencia de indol.

Coaglutinación bacteriana.

Esta técnica también es empleada ampliamente en particular en la detección de antígenos varios grupos de estreptococos, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus neumoniae* y otros.

Ciertas cepas de *Staphylococcus aureus* (la cepa Cowan, ATCC 12498) tienen un alto contenido de proteína A en las paredes las que se une con la porción Fc de una molécula de inmunoglobulina, y deja la porción Fab libre para recibir el antígeno. La aglutinación visible de las células de estafilococos sirve como una prueba positiva de unión antígeno-anticuerpo.

Procedimiento.

El reactivo de Coaglutinación se mezcla gota a gota con la cepa asilada por identificar. El reactivo de Coaglutinación puede adquirirse comercialmente (Phadebact).

Si hay reacción antígeno – anticuerpo, en pocos segundos se presenta la aglutinación muy evidente.

Determinación de la sensibilidad a Ampicilina en disco

- 1.- Se seleccionan colonias puras sospechosas de *Haemophilus influenzae*.
- 2.- Una vez aislado e identificado *Haemophilus influenzae* se sembró en medio líquido y el inoculó se ajusta a una turbiedad equivalente al tubo 0.5 del nefelómetro de Macfarland.
- 3.- Preparar placas con medio de Müller – Hinton adicionado de 15 mg/ml. de NAD, 15 mg/ml. de hemina y 5 mg/mL de extracto de levadura, con un pH final de 7.2 – 7.4.
- 4.- Sembrar el inóculo bacteriano ajustado sobre toda la superficie de las placas, con ayuda de un hisopo, se colocan los discos de Ampicilina y se incuban en atmósfera parcial de CO₂ durante 16 a 18 horas.
- 5.- Se busca la presencia de halos de inhibición alrededor de los discos, cuyos diámetros se miden en mm. Los resultados se interpretan de acuerdo con los valores determinados especialmente para *Haemophilus influenzae*.

B-lactamasa:

Los antibióticos β -lactámicos actúan sobre la pared celular bacteriana bloqueando su síntesis por lo que se obtiene un efecto bacteriostático y más tarde bactericida.

Su excelente efecto antimicrobiano se ve limitado por la existencia de β -lactamasas producidas por una gran variedad de microorganismos, entre los cuales se encuentra *Haemophilus influenzae*, estas enzimas rompen eficientemente el anillo β -lactámico con la producción de ácido penicilínico, lo que causa mucho de los fracasos terapéuticos con el uso de penicilinas, ampicilinas, cefalosporinas

La resistencia a los β -lactámicos puede estar codificada genéticamente en el cromosoma bacteriano o bien por plásmidos; en este caso, se permite la transferencia de la resistencia entre bacterias de la misma especie u aún entre las bacterias de diferentes géneros y especies..

Preparación del reactivo: Mezclar 2 ml de una solución al 0.5% de rojo de fenol con 16.6 ml de agua destilada estéril y añadir la mezcla a una solución que contenga 20 millones de unidades de Penicilina G, se adiciona Hidróxido de sodio 1 M gota a gota hasta que la solución vire a un color violeta (aproximadamente pH 8.5) la solución se divide de inmediato en porciones de 0.5 mL y es conservada en tubos de tapón de rosca.

Procedimiento

- 1.- Sumergir tubos capilares (0.7 a 1 mm de diámetro externo) en la solución de penicilina – rojo de fenol. Dejar que el tubo se llene por capilaridad hasta una altura de 1 a 2 cm
- 2.- Cargar la punta del tubo capilar con material de varias colonias ó con una suspensión gruesa de *Haemophilus influenzae* desarrolladas en la superficie de una placa de agar, de modo que se forme un tapón bacteriano en la parte inferior del tubo. Se debe cuidar que no quede aire atrapado entre la solución y las bacterias.
- 3.- Como control negativo colocar otro capilar de reactivo de rojo de fenol, pero sin penicilina y como control positivo, otro capilar con una suspensión de una cepa conocida de *Haemophilus influenzae* productora de β - lactamasa y el reactivo completo.
- 4.- Incubar los tubos capilares con mezclas a temperatura ambiente en posición vertical, fijando el extremo vacío del tubo capilar a un bloque de plastilina.
- 5.- Interpretación: Si el organismo produce β -lactamasa la solución vira al amarillo brillante en 5 a 15 minutos, los organismos β -lactamasa negativos no provocan cambios en el medio o bien solo producen a tono rosado.

D) *Staphylococcus aureus*

El producto clínico se sembró en agar sal y manitol

Se incubó a 37°C durante 24 horas.

La colonia grande, lisa, brillante y generalmente pigmentada se les realiza la prueba de coagulasa a las colonias que dan fermentación al manitol.

Las cepas coagulasa negativas se les realizó la prueba de sensibilidad a la novobiocina.

Prueba de la coagulasa.

La coagulasa es una proteína de composición química desconocida, que tiene actividad similar a la protombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, lo que da como resultado la formación de un coágulo visible en los sistemas apropiados. Se piensa que in vivo la coagulasa produce una barrera de fibrina en la localización de la infección estafilocócica. Esto probablemente desempeña cierto papel en la limitación de abscesos(p. Ej., carbunclos y furúnculos). La prueba de la coagulasa sirve para identificar *Staphylococcus aureus* y diferenciarlo de otros estafilococos.

Procedimiento

- 1.- Utilizar un cultivo en caldo BHI de 18 a 24 horas de la bacteria problema. Simultáneamente se debe contar con cepas testigo positivas.
- 2.- Mezclar 0.5 mL de plasma reciente de humano o de conejo, sin diluir, con un volumen igual de testigo o del problema.
- 3.- Incubar a 37° C y se examinan entre 1 y 4 horas para buscar la formación de un coágulo.
- 4.- Los tubos negativos deben conservarse durante la noche a temperatura ambiente y examinarse a la mañana siguiente.

Sensibilidad a la novobiocina

Los estafilococos coagulasa negativos pueden dividirse en especies sensibles y resistentes a la novobiocina. Entre las especies resistentes se encuentra *S saprophyticus* es el único que puede recuperarse en el hombre como causante de infecciones en el tracto urinario.

Procedimiento

- 1.- Sembrar la cepa de *Staphylococcus* coagulasa negativa masivamente en medio de Müeller-Hinton.
- 2.- Colocar un disco de novobiocina de 5 mg. Cualquier halo de inhibición es indicio de sensibilidad.

E) *Neisseria meningitidis*

La muestra debe de sembrarse de inmediato, si no es posible se recomienda utilizar medios de transporte.

Sembrar el producto clínico en un medio selectivo como el Thayer Martín (el medio debe de estar a temperatura ambiente).

Incubar las cajas a 37° C y a una atmósfera parcial de CO₂ del 5% durante 24 a 48 horas.

A las colonias sospechosas se les realizan las siguientes pruebas.

Oxidasa.

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como último eslabón de la cadena de respiración aerobia; transfieren electrones (hidrógeno) al oxígeno, con la formación de agua. El sistema citocromo se encuentra en microorganismos aerobios, o microaerófilicos y anaerobios facultativos, de tal forma que la prueba de la oxidasa es importante para identificar microorganismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados. La prueba tiene su mayor utilidad para diferenciar colonias sospechosas de pertenecer a otros géneros como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Campylobacter* y *Pasteurella*.

La prueba de citocromo oxidasa utiliza ciertos colorantes como el que sustituye al oxígeno como aceptante artificial de electrones. En estado reducido, el colorante es incoloro; sin embargo, en presencia de citocromo oxidasa y de oxígeno atmosférico la *p*-fenilendiamina se oxida y forma azul de indofenol.

Procedimiento.

1.- Preparar una solución de clorhidrato de di o tetrametil *p*- fenildiamina al 1% en agua destilada (reactivo de Oxidasa)

2.- Se cubren las colonias con el reactivo.

3.- Una reacción positiva se caracteriza por la aparición de un color rosa.

Si se emplea la sal dimetilada, el color rosa cambia pasando gradualmente desde rosa a marrón y finalmente a púrpura oscuro casi negro.

4.- Una alternativa que evita matar las bacterias es la de colocar unas gotas del reactivo de Oxidasa sobre una tira de papel filtro haciendo uso de una asa de preferencia no metálica o de platino (existen tiras comerciales), se toma una porción de las colonias y se frota sobre el papel, la reacción colorida deberá aparecer sobre el papel.

Utilización de carbohidratos:

La técnica convencional para la identificación de especies de *Neisseria* utiliza un medio base de agar semi-sólido-cistinadigerido triptico (CTA) que contiene 1% de hidratos de carbono y rojo de fenol como indicador de pH. La batería habitual de pruebas incluye CTA-glucosa, CTA-maltosa, CTA-sacarosa, CTA-lactosa, además de un control de CTA sin hidratos de carbono.

Procedimiento.

- 1.- El método habitual para practicar la prueba hace uso del medio CTA (agar cistina – digerido triptico) adicionado al carbohidratos correspondiente esterilizado por filtración en una concentración del 1%.
- 2.- La inoculación para pruebas bioquímicas no deben hacerse con colonias de primo asilamiento si no a partir de resiembras de gelosa – chocolate de varias colonias escogidas, incubadas a 37° C hasta 48 horas.
- 3.- El inóculo con que se siembran los medios con carbohidratos debe de ser abundantes y depositados a 2-3 mm por debajo de la superficie de la gelosa.
- 4.- Incubar a 37° C de 24 a 48 horas y buscar el viraje de rojo al amarillo en el tercio superior del tubo de medio CTA como consecuencia de la acidificación por la acción de los resultados.

DIAFRAMA I

EXUDADO FARÍNGEO

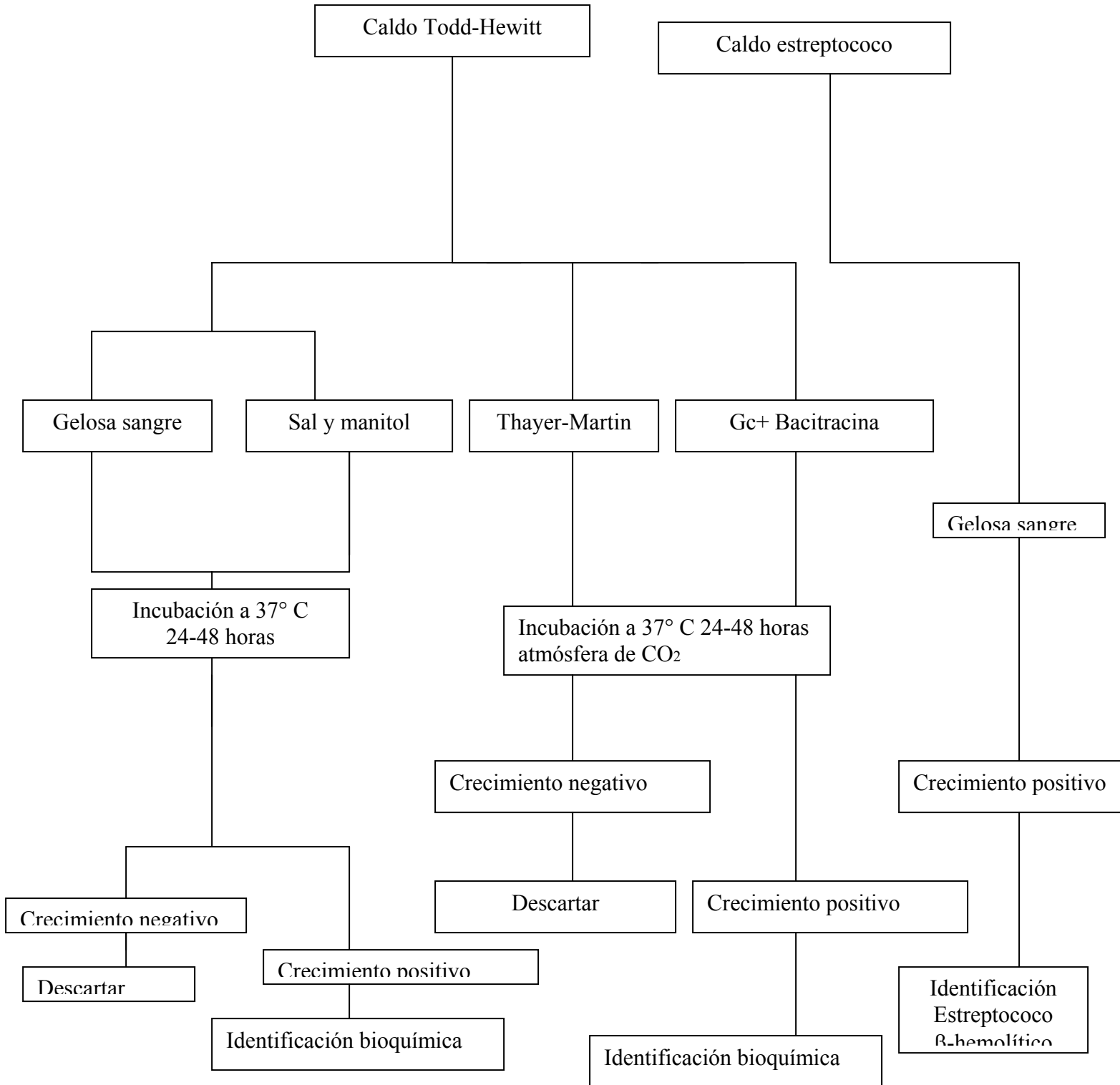


DIAGRAMA II
IDENTIFICACIÓN

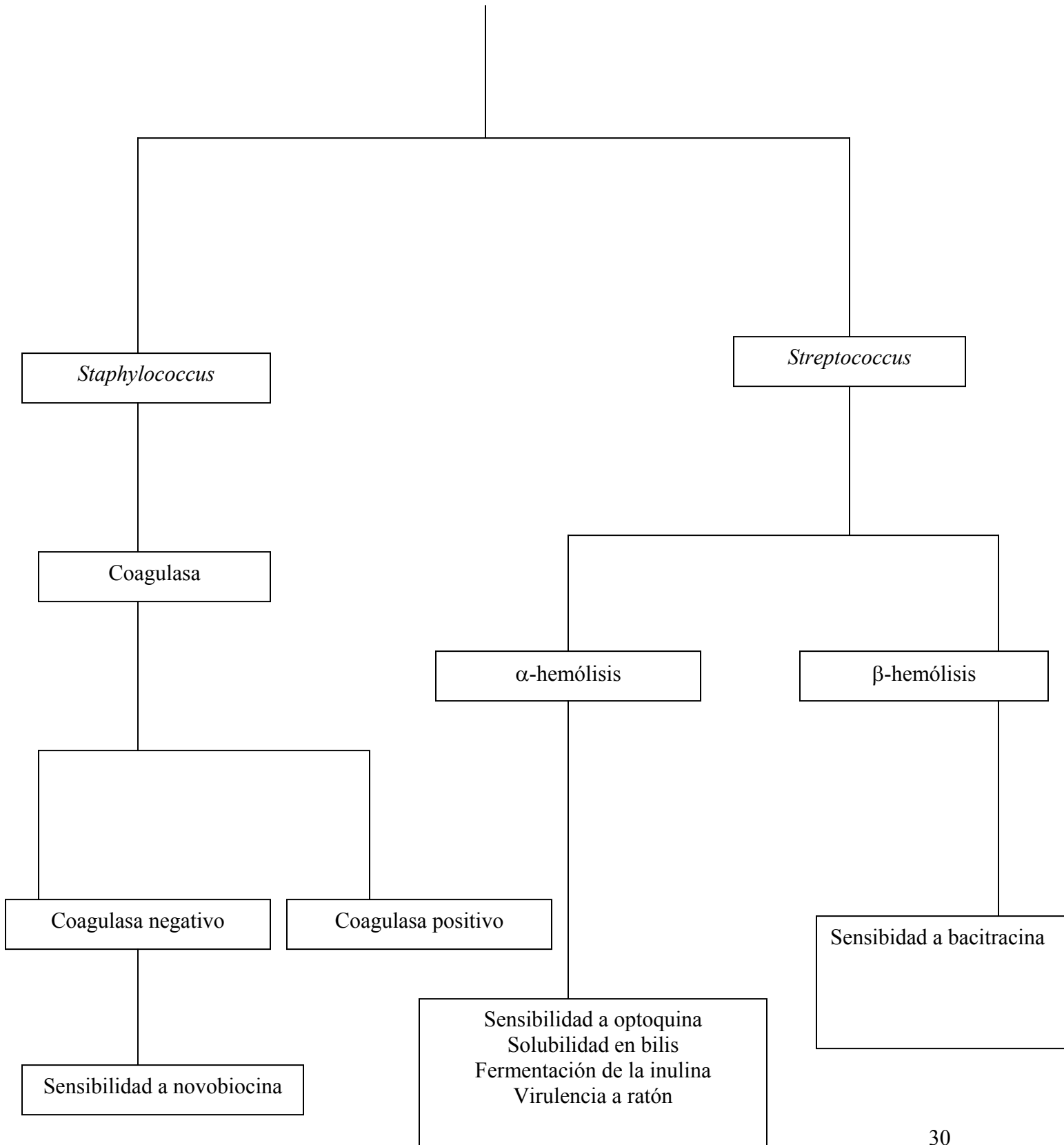
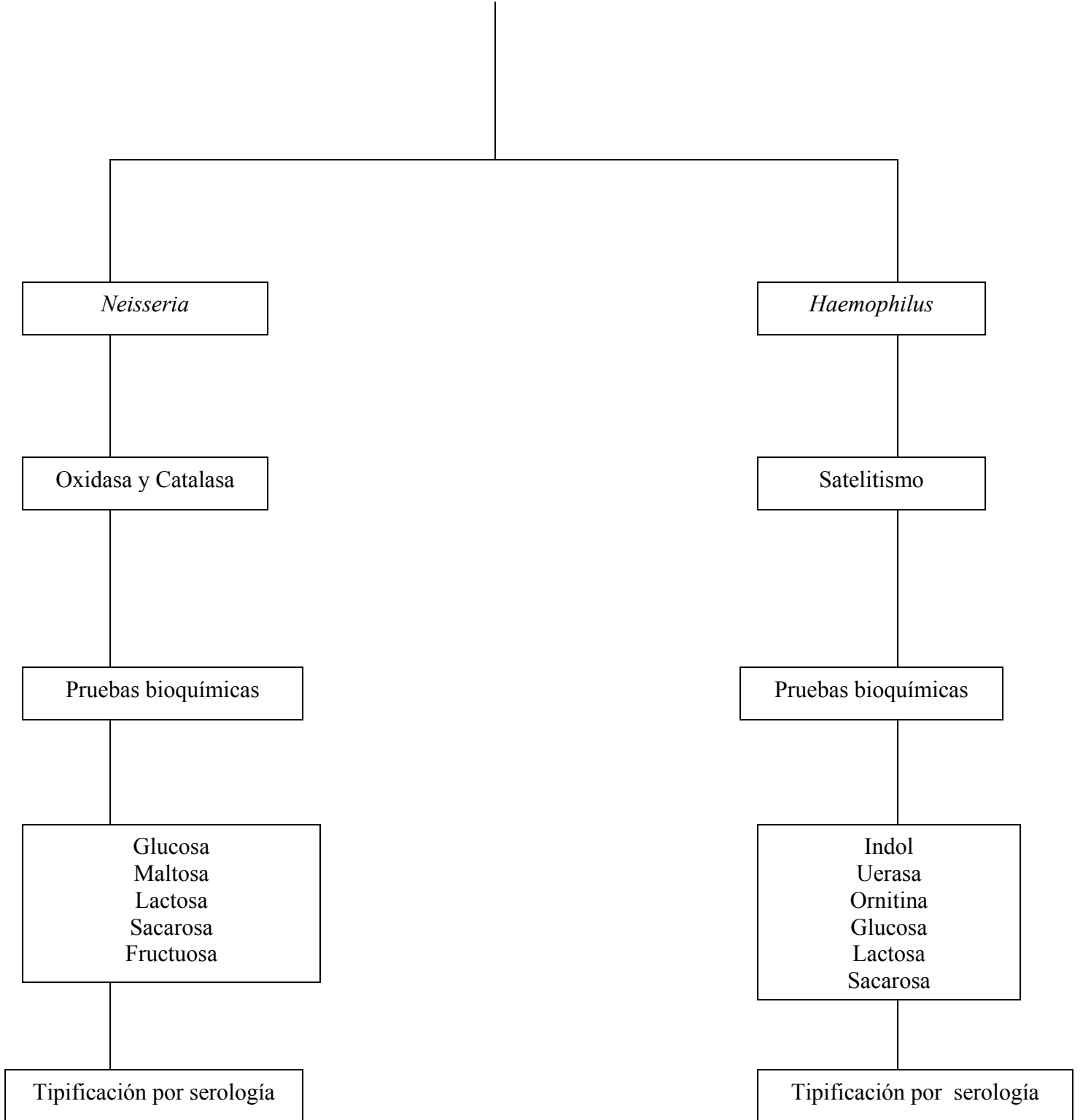


DIAGRAMA III
IDENTIFICACIÓN



RESULTADOS

Se estudiaron 300 muestras de exudado faríngeo de niños menores de cinco años, aparentemente sanos, provenientes de los centros de desarrollo infantil (CENDIS). “Margarita Salazar deErro y Laura Pérez de Batiz” de IPN.

Aislándose 51 cepas de *Staphylococcus aureus* (15 %), 18 de *Streptococcus pyogenes* (6%), 13 de *Streptococcus pneumoniae*,(4%). 12 de *Neisseria meningitidis* (4%) y 62 de *Haemophilus influenzae* (20%) (cuadro 1).

Se realizó la tipificación serología de *Neisseria meningitidis* obteniéndose que cinco cepas correspondiendo al serotipo B y siete al serotipo C.

Solamente dos cepas de *Streptococcus pneumoniae* fueron patógenas al ser inoculadas al ratón. Estas cepas no pudieron ser identificadas por serología, debido a que no se contó con el antisuero específico. Solo se tipifico con suero polivalente.

Con respecto a *Haemophilus influenzae*, los serotipos encontrados fueron el B (12.9%), el D (19.35%), el “E” (11.3%), el “F” (14.5%) y los serotipos no identificados fueron 41% (cuadro 2)

La prueba de β -lactamasa fue realizada para las cepas de *Haemophilus influenzae* dando positivas en 11.3% (cuadro2)

Cuadro 1 microorganismos aislados en 300 cultivos de exudado faríngeo de niños aparentemente sanos		
Microorganismo	Frecuencia	Porcentaje %
<i>Staphylococcus aureus</i>	61	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	40	14
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	7	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	13	4
<i>Streptococcus pyogenes</i>	18	6
<i>Haemophilus influenzae</i>	62	24
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	29	10
<i>Neisseria meningitidis</i>	12	4
<i>Neisseria lactamica</i>	35	12
<i>Neisseria sicca</i>	13	4
<i>Neisseria perflava</i>	8	3
<i>Neisseria flava</i>	2	1

Cuadro 2 Serotipos encontrados, producción de β -lactamasa y resistencia a ampicilina de *Haemophilus influenzae*

Sserotipo	Frecuencia	Porcentaje%
B	8	13
D	12	19
E	7	11
F	9	15
Serotipo no tipificable	26	42
Producción de β -lactamasa	7	11
Resistencia a ampicilina	54	87

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En las infecciones respiratorias agudas (IRA), los virus son frecuentemente los agentes primarios y las bacterias como : *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Neisseria meningitidis*, que se encuentran en las vías respiratorias superiores en el portador pueden complicar y agravar la infección para desembocar en una enfermedad más severa como la neumonía, meningitis, fiebre reumática, otitis media, laringotraqueitis, etc.

En nuestro país son pocos los estudios realizados en menores de cinco años y las cepas mencionadas se aislaron en este trabajo en el mismo grupo etario.

Los resultados obtenidos en este, variaron un poco con relación a los datos publicados por Guiscafre y colaboradores (1993), en donde *Haemophilus influenzae* serovar B estuvo presente en el 8.7% de los exudados faríngeos provenientes de niños de guarderías del IMSS, el porcentaje de la resistencia de ampicilina fue de 84%. Los datos obtenidos en este trabajo para esta cepa fue de 12.9% del serovar B y la resistencia al mismo antibiótico fue de 87.1 %.

Otros estudios efectuados en tres estancias infantiles, en el estado de Puebla, Juárez y colaboradores (1996) demostró una tasa de colonización por *Haemophilus influenzae* no tipificable de 72.7%.

Estos resultados nos indican que la prevalencia de la colonización de *Haemophilus influenzae* al nivel de la nasofaringe varía considerablemente en niños que se encuentran en guarderías. Probablemente la posibilidad de adquirir y ser colonizado por *Haemophilus influenzae* se incrementa por el tipo de convivencia en guarderías, la cual favorece de manera muy eficiente la diseminación de patógenos de persona a persona.

La meningitis por *Haemophilus influenzae* en Estados Unidos se presenta por debajo de los dos años de edad y anualmente se reportan 10,000 casos en este país. Por tal motivo se considera importante la detección de portadores menores de cinco años.

Por otra parte esta bacteria produce infecciones que se observan con mayor frecuencia en lactantes y en niños que carecen de anticuerpos específicos, así mismo los menores de edad no responden de manera adecuada cuando sufren una infección o son inmunizados con el polisacárido capsular de polirrifosfato (PRP), esta es la edad de mayor riesgo, por lo que un buen número de investigadores están trabajando en un inmunogeno eficaz que confiera protección.

Streptococcus pneumoniae: La región nasofaríngea es un reservorio para esta bacteria y en muchos individuos permanece en esta región constituyéndose en los portadores asintomático. *Streptococcus pneumoniae* es el agente bacteriano que comúnmente causa infecciones severas del tracto respiratorio de los niños y es una importante causa de meningitis, sepsis e infecciones invasivas. *Streptococcus pneumoniae* lo reportan algunos trabajos como Nandi-Lozano (1999) con un 20.4% y un estudio hecho en Portugal que reporta 47% (2000). Lo que contrasta con los resultados obtenidos en este trabajo que fue de 4.2% lo que puede explicarse, ya que en este estudio se trabajo con niños clínicamente sanos.

Por tal motivo es de vital importancia la determinación de la prevalencia de portadores asintomático de *Streptococcus pneumoniae* ya que se ha demostrado que hay una estrecha relación entre portadores y la incidencia de enfermedades invasivas.

Con respecto a *Streptococcus pyogenes* se aisló un 5.9% que cae en los límites bajos con los reportados por Pichero y colaboradores que reportan una prevalencia del 5 al 15 % de *Streptococcus pyogenes* en individuos sanos.

Es importante la detección de *Streptococcus pyogenes*; debido a que en países del tercer mundo, del 25 al 40% de todas las enfermedades cardiovasculares son debidas a las fiebres reumáticas aguda, y se estima que el 1% de los escolares entre 5 y 15 años padecen esta enfermedad.

La fiebre reumática aguda se define como una secuela de una infección de las vías respiratorias altas.

El estudio faríngeo es necesario para el diagnóstico de una infección de vías respiratorias altas por *Streptococcus pyogenes*. Cuando se prescribe un tratamiento para todas las amigdalitis, se reporta que hay un sobre tratamiento del 85 % en niños y un 95 % en adultos. El uso indiscriminado de la penicilina aumenta el riesgo de efectos colaterales a este fármaco y provoca alteraciones innecesarias de la biota microbiana.

Staphylococcus aureus se aisló en un 15.51 %, variando un poco con los datos reportados por Giono y colaboradores que estudiaron niños de 1 a 4 años y que encontraron una incidencia de 21%.

Existe un gran porcentaje de portadores asintomático de *Staphylococcus aureus* que lo albergan en la cavidad nasofaríngea y que constituyen un problema en la transmisión de la enfermedad.

Las fosas nasales son el sitio habitual donde se aloja el estafilococo, pero también pueden encontrarse en la piel, en las membranas de las mucosas y ocasionalmente en el intestino.

Con respecto a *Neisseria meningitidis* se aisló en 3.9 % siendo los serotipos B y C los encontrados. En nuestro país no existen estudios para *Neisseria meningitidis* como portadores en niños menores de cinco años, por tal motivo es muy importante determinar la incidencia de esta bacteria, ya que es uno de los agentes causales de meningitis bacteriana. Este tipo de infección se presenta con frecuencia en invierno y primavera, siendo cuatro los serotipos de meningococos responsables de la mayor parte de los casos. Las epidemias son con frecuencia se relacionan con los serotipos A y C, mientras la enfermedad esporádica se asocia con el serotipo B, la meningitis meningocócica es una de las más temidas. Se presenta como un padecimiento agudo fulminante, acompañado de fiebre, malestar general, cefalea y púrpura. Aproximadamente el 50 % de pacientes hospitalizados fallecen, algunos de ellos dentro de un periodo de 24 horas después del inicio de los síntomas.

Los resultados de este estudio nos permiten caracterizar los patrones de colonización de los niños que asisten a guarderías. La colonización de mucosas de niños sanos es un evento que favorece la transmisión de microorganismos a otros individuos sanos susceptibles, facilita la infección a sitios anatómicamente adyacentes y sirve como sitio probable de invasión que antecede a una infección sistémica.

Los niños que acuden a guarderías pueden tener más exposición a antibióticos. Por tal motivo las guarderías representan un factor de riesgo para ser portador de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina.

La mayor incidencia reportada en guarderías podría ser explicada por las características de estos ambientes, como serían sus condiciones higiénicas y el tener áreas pobremente ventiladas: estos factores facilitan la diseminación de patógenos respiratorios.

Otro factor importante está relacionado con la edad de los niños, ya que tienen contactos frecuentes con otros niños, comparten juguetes, tosen y eliminan secreciones nasales en estrecha proximidad.

CONCLUSIONES

Se tuvo 40% de aislamientos de microorganismos patógenos en niños menores de cinco años asintomáticos

La prevalencia de microorganismos patógenos en niños menores de cinco años asintomáticos fue:

Streptococcus pyogenes 6%

Streptococcus pneumoniae 4%

Streptococcus aureus 16%

Haemophilus influenzae 20%

Neisseria meningitidis 4%

Se encontraron dos cepas de *Streptococcus pneumoniae* virulentas que representan un riesgo potencial para los individuos de donde se obtuvieron y así mismo para la comunidad.

El serotipo B de *Haemophilus influenzae* se encontró en un 13%, la prueba de β -lactamasa resulto positiva en el 11% y la resistencia a la ampicilina fue de 88%

De *Neisseria meningitidis* los serotipos B y C fueron los más frecuentes.

Referencias

1. Organización Panamericana de la Salud. El control de las infecciones respiratorias agudas en los sistemas locales de salud. Washington, DC. USA: OPS/HCP/ARI/95,05;1995.
2. Infecciones respiratorias agudas .Guía diagnóstica-terapéutica. Rev Med IMSS.2003;36(29):123-140.
3. Cabrera-Contreras R, Rincon-Vázquez M, Irigoyen-Coria A. Nuevas perspectivas en el estudio de las infecciones respiratorias agudas. Arch Med Fam 2002; 4(3):109-112.
4. Flores-Hernández S, Trejo-Pérez JA, Reyes-Morales H, Pérez-Cuevas R, Guiscafré-Gallardo H. Guía diagnóstica, tratamiento y prevención de infecciones respiratorias agudas. Rev Med IMSS 2002; 41 (supl): S3-S14.
5. Nandi-Lozano E, Espinosa LE, Viñas-Flores L, Avila-Figueroa C, Infección respiratoria aguda en niños que acuden a un centro de desarrollo infantil. Salud Publica Mex 2002; 44:201-206.
6. Pérez-Cuevas R, Cuevas J,Bojslil R. Guiscafré H. Calidad de la atención médica en niños hospitalizados por infección respiratoria. Bol Med Hosp Infant Méx 1995;52:342-349.
7. Rossi F. resistencia bacteriana en infecciones respiratorias en América Latina XI Congreso Panamericano de Infectología, 2003.
8. Mussher D. Howw contagious are common respiratory tract infections. N Engl J Med 2003; 348 (13): 1256-1266.
9. Robinson J. Enfermedades infecciosas en escuelas y jardines maternas. Pediatr Rev 2001;22:39-46.
10. García M. Ordobás M, Calvo C, González M, Aguilar J, Arregui A, et al. Infecciones virales de vía respiratoria inferior en lactantes hospitalizados: etiología, características clínicas y factores de riesgo. An Esp Pediatr 2001;55:101.
11. Organización Panamericana de la Salud. Atención del niño con infección respiratoria aguda. Washington DC;OPS,1992.
12. Anuario estadístico, 1997. Dirección General de Estadística e Informática. México:Secretaria de Salud;1997.
13. Valdespino JI, García MA. Consideraciones clínico-epidemiológicas de las infecciones respiratorias agudas y crónicas. INDRE, SSA 1994:107-112
14. WHO. Facts and figures on acute respiratory infections in children. ARI Bulletin.Genev: World Health Organiz;1995.
15. Phelan PD. Respiratory infections in childhood. Curr Opin.in Infect Dis.1992;5:158-163.
16. OPS. Enfermedades transmisibles. Control de las Infecciones Respiratorias Agudas. 1997:1-7.
17. Mohler AM. Treatment of streptococcal pharyngitis. Am Fam Physician. 2002;65 (7): 1280.
18. Alós JL, Aracil B, Oteo J, Torres C, Gómez-Garcés JL and the Spanish Group for the study of infection in the Primary Health Care Setting. High prevalence of eritromycin-resisttant and miocamycin-susceptible *Streptococcus pyogenes*: results

- of a multicenter study performed in 1998 in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:605-609.
19. Hayes CS, Williamson H Jr. Management of group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis. *Am Fam Physician*.2001;63 (8):1557-1564.
 20. YanJJ,Wu HM, Huang AH, Fu HM, Lee CT, Wu JJ. Prevalence of policlonal mef A-containing isolates among erythromycin-resistant group A streptococci in southern Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 2000;38:2475-2479.
 21. Brooks, Geo F, Janet S,Butel, y Stephen A, Morse, Jawetz, Mebrick y Aldelbergs. *Microbiología Médica* 22 Edición, 2001
 22. Koneman EW, Allen DS, Downen VR. Fonda NM, Sommers HM. Winn WC. *Diagnostic Microbiology*, 10a Ed. Philadelphia: Lippincott Co. 2002.
 23. Viciano M,García-López V, Mariscal A, Sánchez- BernalA, Clavijo E, Martín E, et al. Aspectos biológicos y clinicoepidemiológicos de los aislados de *Streptococcus pneumoniae* durante dos años, *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:13-17.
 24. Kastenbauer S, Pfister HW: Pneumococcal meningitis in adults; spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* 2003;126:1015-1025.
 25. Koedel U, Scheld W, PfisterH, Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2002;2:721-726.
 26. Wubbet L.et al. Etiology and treatment of community-acquired pneumonia in ambulatory children. *Pediatr infect. Dis J*. 1999; 18:98-104.
 27. Infecciones respiratorias agudas. Programa de atención a la salud del niño. Manual de procedimientos técnicos. 1998 Consejo Nacional de Vacunación. Secretaria de salud.
 28. Hadad P, Repka T, Weisdorf D. Penicillium resistant *Streptococcus pneumoniae* septic shock and meningitis complicating chronic graft versus host disease a case report and review of the literature. *Am J Med* 2002;113:152-155.
 29. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Informe del Laboratorio de Infección Respiratoria Aguda. Secretaria de Salud. México DF 1994.
 30. Guiscafré H., Pérez-Cuevas R.,Reyes H.,et. al avances de los criterios diagnósticos y terapéuticos en las infecciones respiratorias agudas. *Gas Med. Mex* 1992; 128;565-571.
 31. Flore H. Trejo J. A.,Reyes H., Pérez C.R., et. Al. Diseño y aplicación de una guía clínica para la atención apropiada para la atención apropiada en las infecciones respiratorias agudas. *Gac. Med. Méx.*1999; 135:121-137.
 32. Infecciones respiratorias agudas.Programa de atención a la salud del niño. Manual de procedimientos técnicos.1998. Consejo Nacional de Vacunación. Secretaria de Salud.
 33. Sosa JE, Giono CS, Escobar Gutiérrez A. Manual de Procedimientos para el aislamiento de *Haemophilus influenzae*. Publicación Técnica del INDRE N° 19. México, DF: Secretaria de Salud 1992.
 34. Villaseñor SA, Avila Figueroa C., Santos P.I. Impacto de las infecciones por *Haemophilus influenzae* en niños mexicanos,*Bol. Med. Hospital Infantil México*1993;50:415-421.
 35. Guiscafre GH,García-Melgar M, Jaime CM, Trejo AC,García M, Hernández. Frecuencia de *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina y de *Streptococcus*

- pneumoniae* resistente a penicilina en portadores sanos. Arch Invest Med (Mex) 1993;12:141-151.
36. Villalobos VHE, Quintero MC, Palacio SG, González SN, Castañeda NJL, Factores relacionados con la mala evolución de los niños con neumonía comunitaria. Un estudio de casos y testigos en un hospital de tercer nivel de atención de la ciudad de México. Rev Enfer Infecc Pediatr 1995;1: 114-9.
 37. Juárez AE, Mancilla GS, López MA, Portillo GL, Sosa IEG. Portadores de *haemophilus influenzae* en tres estancias infantiles de la ciudad de Puebla. Bol Med Hosp Infant Mex 1996;53:548-553.
 38. Rios H, Leal A, De la Hoz F, et. at. Vigilancia centinela de IRA baja por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. IQEN 1997;2(15).
 39. Reyes H, Guiscafré H, Pérez-Cuevas R, Muñoz O, Giono S, Flores A, Asís I, Gutiérrez G. Diagnóstico de faringoamigdalitis estreptocócica: ¿criterio clínico o coaglutinación? Bol Med Hosp. Infant Mex 1991;48(9):627-636.
 40. Mulholland H K. Magnitude of the problem of childhood pneumonia. Lancet 1999;354:590-2
 41. Mulholland K, et al Randomised Trial of Hemophilus influenzae Type-b tetanus protein conjugate for prevention of pneumonia and meningitis in Gambian infants. Lancet 1997; 349: 1191-6.
 42. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephen DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. N Engl J Med 2003; 344(18):1378-1388.
 43. Almeida-González L, Franco-Paredes C, Pérez LF, Santos –Preciado JI. Enfermedad por meningococo, *Neisseria meningitidis* : perspectiva epidemiológica, clínica y preventiva. Salud Publica Mex 2004;46:438-450.
 44. Tikhomirov E, Santamaría M, Estévez K. Meningococcal disease : Public health burden and control. World Health Stat Q 1997; 50(3/4):170-177.
 45. Stephens DS. Uncloaking the meningococcus Dynamics of carriage and disease. Lancet 1999;353:941-942.
 46. Chessbrough JS Morse AP, Green DR. Meningococcal meningitis and carriage in western Zaire: A hypo endemic zone related to climate. Epidemiol Infect 1995;114:7
 47. Heiskanen Kosma T, et al. Etiology of childhood pneumonia. Serologic results of a prospective population based study: Pediatr Infect Dis J. 1998;17:986-91.
 48. Vela MC, Leal AL, Agudelo CI, Castañeda E. *Streptococcus pneumoniae*. Distribución de tipos capsulares. Susceptibilidad antimicrobiana y epidemiología molecular: experiencia de un grupo de trabajo colombiano. Médicas UIS1998; 12:289-98.
 49. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Recommended Childhood Immunization Schedule United States January-December 1999.
 50. Gadomski AM, Potential interventions for preventing pneumonia among young children: lack of effect of antibiotic treatment for upper respiratory infections. Pediatric Infectious Disease Journal 1993; 12: 115-120.
 51. Bisno AL. Streptococcus pyogenes, En: Mandell GL, Benett JE, ed. Enfermedades infecciosas, principios y practica. 3ª. Ed. Buenos Aires: Panamericana, 1990:1604-1610.

52. Anderson JS, Borica NJ, Rennerberg J. Evaluation of a Commercial Coaglutination Test for the Diagnosis of Group A Streptococcal Tonsillitis in family practice, *Scana J. Prim. Health care* 1992, 10:223-225.

(Anexo 1)

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL I. P. N.
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA INSTITUTO NACIONAL DE
DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICAS

INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS

1.-FICHA DE IDENTIFICACIÓN

NOMBRE-----EDAD-----SEXO-----

DOMICILIO-----

NOMBRE DEL PADRE O TUTOR-----

2.-CUADRO CLÍNICO

FECHA DE INICIO DE LA ENFERMEDAD-----

FIEBRE	()	DOLOR INTENSO	
ATAQUE AL		DE OÍDO	()
ESTADO GENERAL	()	SECRECIÓN POR	
CONGESTIÓN		OÍDO	()
NASAL	()	DOLOR DE	
DOLOR O ARDOR		GARGANTA	()
GARGANTA	()	DISFONÍA	()
TOS	()	TOS Y ESPUTO	
DOLOR LEVE DE OÍDO	()	PURULENTOS	()
		SIBILANCIAS O	
		ESTERTORES	()

LEVE () MODERADA () GRAVE ()

SIGNOS VITALES (DE INGRESO O EN LA PRIMERA CONSULTA):

TEMPERATURA-----FRECUENCIA RESPIRATORIA-----

FRECUENCIA CARDIACA-----PESO-----

-

TALLA-----

DIAGNOSTICO(S) DEL MEDICO-----

TRATAMIENTO(S)-----

CONTACTO CON PERSONAS CON SÍNTOMAS SIMILARES. SI () NO ()

3.-NIVEL SOCIOECONÓMICO

INGRESO ECONOMICO FAMILIAR (EL ULTIMO MES ANTERIOR AL ESTUDIO)

NUMERO DE CONVIVIENTES EN EL DOMICILIO FAMILIAR:

HASTA 3 PERSONAS ()

4-5 PERSONAS ()

6-7 PERSONAS ()

8-9 PERSONAS ()

10 O MAS PERSONAS ()

NUMERO DE CUARTOS QUE SE UTILIZAN COMO DORMITORIOS EN LA VIVIENDA.

1 CUARTO ()

2 CUARTOS ()

3 CUARTOS ()

4 CUARTOS ()

5 O MAS CUARTOS ()

TIPO DE CONSTRUCCIÓN DE LA VIVIENDA

TECHO

MAMPOSTERÍA ()

TEJA ()

LAMINA ()

MADERA ()

CARTÓN ()

PAREDES

MAMPOSTERÍA ()

MADERA ()

LAMINA ()

PISOS

CEMENTO ()

LADRILLO ()

PIEDRA ()

TIERRA ()

CONDICIONES DE VENTILACIÓN DE LA VIVIENDA:

BUENA (AL MENOS UNA VENTANA POR DORMITORIO) ()
MALA (SI TODO O ALGUN DORMITORIO NO TIENE VENTANAS ()

LA VIVIENDA FAMILIAR ES:

RENTADA ()
PRESTADA ()
PROPIA ()

NIVEL DE ESCOLARIDAD:

GRADO ESCOLAR	PADRE	MADRE
ANALFABETA	-----	-----
SOLO SABE LEER	-----	-----
PRIMARIA INCOMPLETA	-----	-----
PRIMARIA COMPLETA	-----	-----
SECUNDARIA O EQUIVALENTE	-----	-----
PREPARATORIA O EQUIVALENTE	-----	-----
LICENCIATURA	-----	-----
ESTUDIOS DE POSTGRADO	-----	-----

OCUPACIÓN DEL PADRE O TUTOR-----
