

Influencia del sitio de muestreo en niños sanos en la detección de portadores de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*

DIANELYS QUIÑONES PÉREZ,* ISIS TAMARGO MARTÍNEZ,* SUSANA M. BORROTO GUTIÉRREZ,*
KIOMI FUENTES GORT,* MIRIAN PÉREZ MONRÁS,* OXANDRA RODRÍGUEZ*

RESUMEN

Antecedentes: *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* colonizan las membranas mucosas de la nasofaringe y la orofaringe de niños sanos; en la actualidad son las principales bacterias patógenas responsables de la morbilidad y mortalidad debidas a infecciones respiratorias agudas en el mundo. **Objetivo:** evaluar la influencia del sitio de muestreo en el aislamiento de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* del tracto respiratorio superior en niños sanos. **Material y métodos:** se estudiaron 358 niños sanos de tres guarderías del municipio de Marianao, en la Ciudad de La Habana. A cada niño se le realizó exudado nasal y faríngeo. Se compararon los porcentajes de aislamiento de ambos gérmenes por medio de las dos técnicas utilizadas. **Resultados:** en 13.1% de los niños se aislaron ambos microorganismos. Con el exudado nasal se aisló *S. pneumoniae* en 15.1% de los niños, a diferencia del exudado faríngeo, con el que tal agente se aisló en 4.5% de los participantes. En 64.2% de los niños se aisló *H. influenzae* con el exudado faríngeo, mientras que con el nasal sólo se aisló en 37.7%. Se halló pobre concordancia entre los dos sitios de muestreo para el aislamiento de *H. influenzae*, y ninguna concordancia para el aislamiento de *S. pneumoniae*, ni para la ocurrencia de ambos gérmenes en un mismo niño. **Conclusiones:** se demostró la importancia del sitio de toma de la muestra en el aislamiento de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* del tracto respiratorio superior, así como la influencia del exudado nasal y faríngeo en la detección de estados de portador de estos gérmenes.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, niños sanos, niños portadores, muestreo.

ABSTRACT

Background: *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* colonize the mucosal membrane of the nasopharynx and throat of healthy children, and constitute the main pathogen bacteria responsible of morbidity and mortality due to acute respiratory infections in the world. **Objective:** To assess the influence of the sample site on the isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from the upper respiratory tract in healthy children. **Material and methods:** We studied 358 healthy children from three day care centers in Marianao, City of Habana. Nasal and throat swabs were taken from each of them. Percentages of isolation of both germs by the two sampling technique were compared. **Results:** In 13.1% of children both microorganisms were isolated. By nasal swab *S. pneumoniae* was isolated in 15.1% of children, unlike throat swab, which reported *S. pneumoniae* isolation in 4.5%. In 64.2% of children *H. influenzae* was isolated by throat swab, while by nasal swab this agent was isolated in 37.7%. It was found a poor coincidence between both sites of sample for *H. influenzae* isolation and there was no coincidence for *S. pneumoniae* isolation, nor for the presence of both germs in a same child. **Conclusions:** The importance of the sample site in the isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* from the upper respiratory tract is demonstrated, as well as the influence of the nasal and throat swab on the detection of carrier status of both germs.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, healthy children, carrier children, sample.

* Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Cuba.

Correspondencia: Dra. Dianelys Quiñones Pérez. Laboratorio Nacional de Referencia de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Novia del Mediodía km 6, PO BOX 601. Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: dia@ipk.sld.cu

Recibido: septiembre, 1999. Aceptado: febrero, 2000.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* colonizan las membranas mucosas de la nasofaringe y la orofaringe de niños sanos;^{1,2} son los principales patógenos responsables de la gran

morbilidad y mortalidad debidas a infecciones respiratorias agudas bacterianas (IRAB) en todo el mundo. Se han identificado diversos factores de riesgo, como la colonización del tracto respiratorio superior (TRS) y las cortas edades (de cuatro meses a seis años).^{3,4}

Describir el proceso de colonización de la nasofaringe y la orofaringe por parte de *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, y determinar el papel de diversos factores más, como las infecciones virales concurrentes o el tratamiento previo con antibióticos, son los objetivos centrales de la investigación de la patogénesis de las infecciones clínicas causadas por estos microorganismos.⁵⁻⁸

Algunos de los factores que influyen en las tasas de aislamiento encontradas en estudios con portadores de estas bacterias son el sitio de procedencia de la muestra, o sitio anatómico explorado, y las diferencias en las técnicas de cultivo.¹ En Cuba, como en América Latina, las técnicas más usadas para aislar *S. pneumoniae* y *H. influenzae* del TRS son el exudado nasal y faríngeo. Aunque los métodos bacteriológicos para el cultivo de estos microorganismos son bien conocidos, los reportes de la influencia del sitio del muestreo para el aislamiento del TRS son escasos y controvertidos.

El objetivo de este estudio fue comparar el porcentaje de aislamiento de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* de la cavidad nasal y faríngea, analizando la influencia del sitio de la toma de la muestra. Esto aportará, con seguridad, datos valiosos para emprender nuevos estudios de portadores de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en otros ambientes infantiles, instituciones consideradas como un factor de riesgo muy importante en la epidemiología de las infecciones respiratorias agudas.^{9,10}

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 358 niños sanos de entre dos y cinco años de edad, procedentes de tres centros infantiles del municipio de Marianao, de la Ciudad de La Habana, Cuba. La investigación se efectuó entre los meses de septiembre y octubre de 1997. Se obtuvieron dos muestras diferentes del TRS (exudados nasal y faríngeo) de cada niño, según las técnicas descritas en la literatura.¹¹

Aislamiento

Se utilizaron placas de agar-sangre de carnero al 5% y placas de agar-chocolate con 300 mg/L de bacitracina enriquecido con 10% de un suplemento de crecimiento

producido a partir de lisado de sangre de carnero y extracto de levadura, elaborado en el laboratorio de infecciones respiratorias agudas bacterianas del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí para el aislamiento de *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, respectivamente. La incubación se realizó en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 35°C durante 24 horas.

Se consideró cultivo positivo si pudo observarse, al menos, una colonia sugerente de *S. pneumoniae* o *H. influenzae* en algún cuadrante de la placa de cultivo.

Identificación

Se identificó *S. pneumoniae* de acuerdo con las características culturales, la alfa-hemólisis, la tinción de Gram, la prueba de sensibilidad a la optoquina y, cuando ésta fue dudosa, con la prueba de la solubilidad en bilis. Se diagnosticó *H. influenzae* con base en las características del cultivo, la tinción de Gram, la prueba de la oxidasa, el fenómeno de satelitismo y los requerimientos de factores V y X. Hasta su estudio, las cepas se conservaron a -70°C en caldo de infusión de cerebro y corazón con glicerol 15%.

Análisis de los resultados

Se realizó un estudio de corte transversal donde se compararon los porcentajes de aislamientos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* según el tipo de exudado realizado. El análisis estadístico se efectuó calculando el índice de concordancia y el índice de Kappa para la comparación de dos muestras relacionadas y para el análisis cruzado, con el paquete estadístico Epi Info 6.4.

RESULTADOS

El 54.2% de los niños estudiados fue del sexo masculino y el 45.8% del femenino. La edad media fue de tres años y tres meses, pero hubo niños de entre dos y cinco años.

En 13.1% de los niños estudiados (47/358) se aislaron los dos microorganismos; de los niños colonizados por *H. influenzae*, 18.6% portaban también *S. pneumoniae* (47/253). En tanto, de los colonizados por este último, 71.2% portaban también *H. influenzae* (47/66). No obstante, en el cuadro 1 se muestra que no se estableció una relación entre ambos gérmenes en un mismo niño (Kappa = 0.003). El índice de concordancia general fue de 37.1% (133/358).

Entre el exudado nasal y el faríngeo, *S. pneumoniae* se aisló con mayor frecuencia en el primero (15.1 y

Cuadro 1. Número de niños de acuerdo con el germen aislado de la muestra faríngea o nasal

| | | H. influenzae | | Total |
|---------------|---|---------------|-----|-------|
| | | + | - | |
| S. pneumoniae | + | 47 | 19 | 66 |
| | - | 206 | 86 | 292 |
| Total | | 253 | 105 | 358 |

Concordancia: 37.1
 Coeficiente de Kappa: 0.003
 $p = 0.457$

4.5%, respectivamente). Se realizó una tabla de contingencia de 2×2 para calcular la relación entre el aislamiento en exudado nasal y faríngeo y se comprobó que no hubo asociación entre ambas pruebas para el aislamiento de dicho germen (Kappa = 0.04). Se demostró un índice de concordancia general de 82.6% (cuadro 2).

En cuanto al *H. influenzae*, se aisló más de la cavidad faríngea (64.2%) que de la nasal (37.7%). Como se observa en el cuadro 3, existió una pobre relación entre ambas pruebas (Kappa = 0.26). Se demostró un índice de concordancia general de 60.6%.

DISCUSIÓN

La biota bacteriana del tracto respiratorio del ser humano es muy variable. Ahí se adquieren, eliminan y readquieren por algún tiempo diversas bacterias. Por ello mismo, la colonización de las vías respiratorias altas por parte de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* se observa con frecuencia, en especial en niños menores de cinco años de edad.¹²

Cuadro 2. Número de niños portadores de *S. pneumoniae* en exudado nasal vs faríngeo

| | | Exudado faríngeo | | Total |
|---------------|---|------------------|-----|-------|
| | | + | - | |
| Exudado nasal | + | 4 | 50 | 54 |
| | - | 12 | 292 | 304 |
| Total | | 16 | 342 | 358 |

Concordancia: 82.6
 Coeficiente de Kappa: 0.04
 $p = 0.128$

Cuadro 3. Número de niños portadores de *H. influenzae* en exudado nasal vs faríngeo

| | | Exudado faríngeo | | Total |
|---------------|---|------------------|-----|-------|
| | | + | - | |
| Exudado nasal | + | 112 | 23 | 135 |
| | - | 118 | 105 | 223 |
| Total | | 230 | 128 | 358 |

Concordancia: 60.6
 Coeficiente de Kappa: 0.26
 $p = 0.000$

Muchos niños son portadores de varias especies bacterianas al mismo tiempo, lo cual dificulta la identificación de las mismas en un nicho ecológico, pues cepas con un denso crecimiento hacen más difícil la detección de aquellas que crecen sólo a baja densidad.¹³ En este estudio, el aislamiento simultáneo de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* se manifestó en 13.1% de los niños incluidos. Esta simultaneidad de aislamientos de los dos microorganismos en un mismo niño, aun sin relación, sugiere que algunas bacterias colonizadoras podrían incrementar, en efecto, el riesgo de colonización por parte de otros gérmenes patógenos.¹³

Montgomery y col. encontraron una relación estadísticamente significativa en los aislamientos simultáneos de dichos gérmenes del TRS.¹³ De los niños colonizados por *H. influenzae*, en 18.6% se aisló también *S. pneumoniae*. Otros autores, como Mogdasy y col.,¹⁴ han reportado aislamientos simultáneos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en el TRS en 20.4%. Gratten y col.¹⁵ observaron, en un estudio realizado en 1994, que 20% de los niños portaban neumococo y más de la mitad estaban colonizados por *H. influenzae*; nuestros hallazgos coincidieron con tales resultados, pues 71.2% de los niños que analizamos estaban colonizados por *S. pneumoniae* y *H. influenzae*.

El bajo porcentaje de aislamiento simultáneo de estos microorganismos pudiera ser resultado de una competencia por la colonización del TRS y quizás por un denso crecimiento de bacterias relativamente no patógenas que pueden conferir alguna protección contra cepas más virulentas.¹

El grado de dificultad de la recolección de la muestra afecta la calidad de la misma, lo cual se acentúa, en particular, al realizar el exudado faríngeo en niños pequeños. Este estudio se efectuó con niños menores de cinco años de edad, pero, al parecer, este factor no influyó de manera desfavorable en los resultados, pues

se contó con personal capacitado que practicó una correcta toma de las muestras.

Los resultados de nuestro estudio indican que *S. pneumoniae* se aísla con mayor frecuencia del cultivo nasal, en tanto que *H. influenzae* se encuentra en mayor cantidad en el orofaríngeo. Estudios previos^{1,7} han encontrado resultados similares.

Las diferencias en las preferencias de los sitios de colonización pudieran reflejar la habilidad de esas bacterias para adherirse a tipos diferentes de células mucosas, lo cual pudiera estar relacionado con la densidad del receptor y la receptividad de las células mucosas para la unión de *H. influenzae* y *S. pneumoniae* en la cavidad nasal y faríngea.¹⁶

Capeding y colaboradores evaluaron diferentes sitios de muestreo para la detección del estado de portador de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en niños,¹⁶ y reportaron tasas muy altas de aislamiento de *S. pneumoniae* en la cavidad nasal, en comparación con la orofaringe, al igual que en nuestro estudio. Sin embargo, observaron la misma frecuencia de aislamiento de *H. influenzae* en las dos muestras, a diferencia de nuestro estudio, donde obtuvimos un mayor porcentaje de aislamiento de esta bacteria en la cavidad orofaríngea. Este sitio de procedencia parece el óptimo para el aislamiento de *H. influenzae* en niños supuestamente sanos, como lo han planteado otros autores.¹⁷

Con este estudio se demuestra una vez más la factibilidad del exudado nasal y faríngeo en el aislamiento de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* del TRS, corroborando la importancia del sitio de procedencia de la muestra en los estudios de portadores, como lo han planteado algunos autores. Ambos métodos de obtención de especímenes son sencillos, económicos y de fácil realización, por lo cual son muy importantes para las instituciones que no cuentan con otros métodos de obtención de muestras, como el exudado y aspirado nasofaríngeo, que son más sensibles pero más molestos para el paciente y, en ocasiones, de difícil ejecución, debido a la falta de los recursos necesarios.

REFERENCIAS

- Rapola S, Salo E, Kiski P, Leinonen M, Takala A. Comparison of four different sampling methods for detecting pharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in children. *J Clin Microbiol* 1997;35:1077-9.
- Principi N. Current problems in the treatment of bacterial meningitis. *Minerva Pediatr* 1996;48(12):551-69.
- Benguigui Y, López FJ, Schmunis G, Yunes J. Infecciones respiratorias en niños. Washington, DC: AIEPI, 1997:45-47.
- Lankinen K, Leinonen M, Tupasi T, Haikala R, Rutu P. Pneumococci in nasopharyngeal samples from Filipino children with acute respiratory infections. *J Clin Microbiol* 1994;32(12):2948-52.
- Fairchok M, Ashton W, Fisher G. Carriage of penicillin resistant pneumococci in a military population in Washington DC: Risk factors and correlation with clinical isolates. *Clin Infect Dis* 1996;22:966-72.
- Kim P, Musher D, Glezen W. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution and the isolation of respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 1996;22(1):100-6.
- Gray B, Malcolme T, Hugh D. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: The effects of season and age on pneumococcal acquisition and carriage in the first 24 months of life. *Am J Epidemiol* 1982;116(4):692-703.
- Gudiol Munté F. Infecciones neumocócicas. En: Farreras P, Rozman C. *Medicina interna*. 13th ed. Madrid: Laveles, 1995:2267-8.
- Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Beratis NG, Spiliopoulou AE, Fasola EL, Bejaksouzian S, et al. Resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* from carriers attending day care centers in South Western Greece. *Clin Infect Dis* 1997;25:188-94.
- Steele RW, Warriors R, Unkel PJ, Foch BJ, Hawes RF, Sanjay S, et al. Colonization with antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease. *J Pediatr* 1996;128(4):531-4.
- Manual de operaciones y procedimientos diagnósticos. Laboratorio de infecciones respiratorias agudas bacterianas. IPK, 1997.
- Faden H. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J Infect Dis* 1997;175:1440-5.
- Montgomery J, Lehmann D, Smith T, Michael A, Joseph B, Luperra T, et al. Bacterial colonization of the upper respiratory tract and its association with acute lower respiratory tract infection in Highland children of Papua New Guinea. *Rev Infect Dis* 1990;12(suppl 8):S1006-16.
- Mogdasy MC, Camou, Fajardo C, Hortal M. Colonizing and invasive strains of *Streptococcus pneumoniae* in Uruguayan children distribution and patterns of antibiotic resistance. *Pediatr Infect Dis* 1992;11(8):48-52.
- Gratten M, Manning K, Dixon J, Morey F, Torzillo P, Hanna J, et al. Upper airway carriage by *Haemophilus influenzae* in Australian aboriginal children hospitalized with acute lower respiratory infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994;25(1):123-31.
- Capeding MRZ, Nohynek A, Sembrero LT, Pascual LG, Sunico ES, Esparar GA, et al. Evaluation of sampling sites for detection of upper respiratory tract carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among healthy Filipino infants. *J Clin Microbiol* 1995;33:3077-9.
- Faden H, Dunken KT, Millar GW. Nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in healthy children. *Epidemiol Infect* 1988;100:193-203.