



CAPÍTULO 6

CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS QUE CAUSAN INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS EN LOS NIÑOS: CONSIDERACIONES ACTUALES PARA SU DIAGNÓSTICO

Lúcia Martins Teixeira, Ph.D.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen una de las causas principales de morbilidad y mortalidad infantil en la mayor parte del mundo. Se calcula que más de cuatro millones de niños menores de 5 años mueren cada año debido a alguna IRA. Esto representa cerca de 30% de los 14,25 millones de defunciones anuales de niños de ese grupo de edad registradas en el mundo en desarrollo cada año (1, 2).

La mayoría de las muertes relacionadas con las IRA se atribuye a infecciones agudas graves de las vías respiratorias inferiores, especialmente la neumonía de causa bacteriana (3-5). Sin embargo, debido a la gran variedad de agentes microbianos capaces de ocasionar cualesquiera de los síndromes respiratorios, no es fácil evaluar la función cuantitativa de cada microorganismo patógeno específico como causante de una IRA. Para obtener un diagnóstico etiológico exacto sería necesario tener acceso a laboratorios de diagnóstico clínico dotados del equipo necesario para aislar e identificar bacterias y agentes no bacterianos, por medio de procedimientos estandarizados en todo el mundo. Como estas condiciones no siempre se dan, especialmente en los países menos desarrollados, la magnitud de los problemas generales y específicos causados por las IRA podría ser mayor de lo que sugieren los datos disponibles.

Por otro lado, muchas de las bacterias que ocasionan las IRA se pueden aislar como parte de la flora normal de personas sanas. En ciertas circunstancias, probablemente relacionadas con daño anterior del epitelio respiratorio o debido a la pérdida de inmunidad del huésped, estos microorganismos colonizadores son capaces de causar enfermedad.

Sin embargo, a pesar de los obstáculos para definir con precisión la causa, es obvio que las

bacterias figuran prominentemente -desempeñando funciones tanto de primero como de segundo orden- en las infecciones agudas de las vías respiratorias superiores e inferiores.

Las infecciones bacterianas de las vías respiratorias pueden agruparse conforme a su sintomatología y al compromiso anatómico. Algunos de los agentes causales se asocian con síndromes específicos (5-11).

Las infecciones agudas de las vías respiratorias superiores generalmente son benignas, transitorias y remiten espontáneamente, aunque en algunos casos, como la epiglotitis y la laringotraqueítis, pueden ser enfermedades graves en niños pequeños y neonatos. La mayoría de los casos graves de epiglotitis bacteriana se deben a *Haemophilus influenzae*. Otras infecciones bacterianas graves de las vías respiratorias superiores son la tos ferina, causada por *Bordetella pertussis*, y la difteria, causada por *Corynebacterium diphtheriae*. La faringitis, una de las infecciones bacterianas más comunes, especialmente en el grupo de edad pediátrica, suele ser causada con más frecuencia por *Streptococcus pyogenes*. Aunque a menudo se aíslan *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* de especímenes nasofaríngeos y de la garganta, no se ha demostrado que causen faringitis. Sin embargo, el ser portador de cualquiera de estos microorganismos, así como de *Neisseria meningitidis*, puede tener importancia clínica para algunos pacientes o sus contactos. *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* son responsables de la gran mayoría de los casos de sinusitis. Las bacterias patógenas más comunes obtenidas del oído medio de niños con otitis media aguda son *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *Branhamella catarrhalis*.

La neumonía es la principal infección de las vías respiratorias inferiores, con características mucho más graves que la mayoría de las infecciones agudas de las vías respiratorias superiores. Los agentes causales de las neumonías adquiridas en la comunidad varían según la edad y el estado de salud del paciente, pero se considera que la mayoría de los casos son bacterianos. La determinación del agente causal de neumonía en los niños es un problema de diagnóstico especial, pues raras veces puede obtenerse especímenes representativos apropiados y la sensibilidad de los hemocultivos es baja en términos generales. En un afán por evitar este problema, en varios estudios recientes se ha investigado la causa de la neumonía bacteriana en niños demostrando la presencia de antígenos específicos de agentes causales en secreciones respiratorias, suero y orina, o estudiando las reacciones de anticuerpos (12-18). Algunos de estos estudios han revelado que alrededor de la mitad de los niños con neumonía adquirida en la comunidad sufre infecciones mixtas, lo que hace resaltar la naturaleza polimicrobiana de las IRA en la niñez (14, 18).

En lugares más desarrolladas del mundo se han definido mejor las causas de IRA grave en los lactantes menores (5, 11, 19). Al nacer, cuando el recién nacido es susceptible a microorganismos adquiridos del aparato genital de la madre, predominan como agentes causales estreptococos del grupo B, *Escherichia coli* y otros gramnegativos como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* y otros; *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia* y otros estreptococos y estafilococos. Hacia el tercer mes de vida, el cuadro clínico parece ser igual que el de los lactantes mayores: *S. pneumoniae* y *H. influenzae* son las bacterias dominantes.

Se cuenta con menos información de los países en desarrollo. La mayoría de los estudios se ha basado en hospitales, y sugieren que *S. aureus*, *Klebsiella sp.*, *E. coli* y *Salmonella sp.* son las causas más frecuentes en el primer mes de vida, seguidas de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* que se convierten muy poco después en los microorganismos patógenos dominantes. Se ha indicado que *S. aureus* y *K. pneumoniae* son las bacterias patógenas más frecuentes en ciertas comunidades del Tercer Mundo (20, 21), lo cual probablemente guarda relación con el uso indiscriminado de antibióticos. La elevada prevalencia de la malnutrición también puede ser un factor que contribuye a la aparición de esos agentes "necrosantes" de neumonía. En consecuencia, las diferencias en los resultados de distintas regiones subrayan cuan inadecuada es la extrapolación masiva de datos microbiológicos de una comunidad a otra y destacan la necesidad local de una vigilancia microbiológica frecuente de las infecciones respiratorias agudas.

En este capítulo resumimos algunas de las características de las principales bacterias que causan las IRA contraída por los niños en la comunidad. También se presentan comentarios sobre las estrategias generales para detectarlas e identificarlas a nivel de laboratorio clínico. Para información detallada sobre estos temas, los lectores deben referirse a las publicaciones específicas (22, 23).

II. OBSERVACIONES GENERALES SOBRE LOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ESPECÍMENES PARA DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El aislamiento y la identificación de un posible microorganismo patógeno en el sitio de la infección es ideal para establecer la causa de las IRA. Varios pasos son cruciales para hacer un diagnóstico correcto y preciso: selección, recolección y transporte (si fuera necesario) adecuados del espécimen o especímenes, así como la selección de los medios de cultivo y procedimientos apropiados para el aislamiento e identificación.

Diferentes clases de hisopos, como los de punta de algodón, dacrón o alginato de calcio, son apropiados para recoger especímenes de las vías respiratorias superiores para el diagnóstico de la mayoría de las bacterias. Si se mantiene húmedo el hisopo, no se necesita tomar más precauciones para los especímenes, que se inoculan dentro de las cuatro horas siguientes a su recolección. Una vez transcurrido ese período, debe usarse cierto tipo de medio de transporte para mantener su viabilidad y evitar el crecimiento excesivo de contaminantes. Se exceptúan los hisopos usados para la detección de estreptococo del grupo A, pues este microorganismo es sumamente resistente a la desecación y permanecerá viable hasta 48 horas en un hisopo seco. Los hisopados de garganta (exudado faríngeo) sirven para recuperar estreptococos β -hemolíticos, especies de *Haemophilus* y *C. diphtheriae*. Se recomiendan hisopados nasofaríngeos para obtener especímenes de *B. pertussis* y especies de *Neisseria*.

Para el diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores, los especímenes deben incluir esputo, líquido pleural (de haberlo) y sangre. Los lavados bronquiales, la aspiración

traqueal, la aspiración pulmonar, la toracentesis, la aspiración pulmonar percutánea y la biopsia del pulmón deben considerarse cuando sea necesario y adecuado, pues son buenos representantes del sitio de la infección. Sin embargo, como algunos de estos procedimientos implican posibles técnicas invasivas, se ven con cierta reserva.

Los resultados de los cultivos de esputo son sumamente polémicos cuando se emplean para el diagnóstico de infecciones agudas de las vías respiratorias inferiores de adultos o niños. En estos últimos es más crítico todavía, pues generalmente no se puede obtener esputo de niños menores de cinco años (pues los niños pequeños ingieren sus secreciones), y también porque tienen una tasa alta de colonización de las vías respiratorias superiores por importantes agentes de infecciones agudas de las vías respiratorias inferiores, como *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Sin embargo, un frotis de esputo teñido por el método de Gram ayuda a obtener información inmediata sobre la posible bacteria patógena; la presencia de un número considerable de microorganismos asociados o ingeridos por leucocitos polimorfonucleares sugiere el microorganismo patógeno probable, mientras que la presencia de células epiteliales indica que el espécimen es más representativo de las vías respiratorias superiores y, en consecuencia, no debe considerarse satisfactorio para el diagnóstico.

Ya existen pruebas de diagnóstico rápidas para la detección de antígenos específicos de varias bacterias que causan IRA en secreciones y humores corporales, como suero y orina. La mayoría se basa en pruebas de aglutinación de partículas (látex o células *S. aureus*) o de inmunosorción enzimática (ELISA). El éxito de estos métodos serológicos es todavía limitado, y ellos presentan además dificultades técnicas. En particular, se recomiendan cuando el paciente ya ha recibido tratamiento antimicrobiano y por lo tanto, es poco probable el aislamiento satisfactorio de bacterias. También se dispone de pruebas basadas en la tecnología del ADN, algunas de las cuales están en vías de desarrollo.

III. *BORDETELLA PERTUSSIS*

La *Bordetella pertussis* es una pequeña bacteria gramnegativa cocoidea u ovoide en forma de bastoncillo que se encuentra encapsulada y es un aerobio estricto. El agente causal de la tos ferina produce varios factores de virulencia, como son la toxina de la tos ferina (PTX, una toxina ADP-ribosilante), toxina de adenilato ciclasa (CYA), proteína de la membrana exterior (pertactina), fimbrias, hemaglutinina filamentosa y hemolisina (24). La tos ferina, una infección sumamente contagiosa en todo el mundo, es principalmente una infección de los niños, sumamente peligrosa en los primeros 6 meses de vida. En contraste con la situación en los países que cuentan con programas generalizados de vacunación, la tos ferina continúa siendo una importante causa de enfermedad de la niñez en las regiones donde no se sigue fielmente estos procedimientos. Parece que la creciente incidencia de tos ferina observada recientemente en los países desarrollados se debe a una disminución en el uso de vacunas, más bien que a cambios en la virulencia de la bacteria (25, 26).

La tos ferina se puede diagnosticar con rapidez por un procedimiento de inmunofluorescencia directa en hisopados nasofaríngeos. El agar de Bordet-Gengou recién preparado es el medio preferido para aislar la *B. pertussis*. Hay otros medios que también son útiles (24). Los especímenes deben sembrarse directamente sobre los medios en placas, si fuera posible, pues el microorganismo es extremadamente delicado. La *B. pertussis* por lo general comienza a multiplicarse después de tres a cuatro días de la incubación a 37°C, en forma de colonias pequeñas y transparentes. El rendimiento de los cultivos positivos de casos clínicos de tos ferina puede variar de 20 a 98%, según la etapa de la enfermedad, el tratamiento anterior del paciente y las técnicas de laboratorio. Recientemente se estudió la sensibilidad antimicrobiana de *B. pertussis* (27). La resistencia a los agentes antimicrobianos es rara, y posiblemente esté limitada a la tetraciclina. La eritromicina todavía se considera el medicamento preferido para el tratamiento. Sin embargo, la eficacia de los medicamentos antimicrobianos en los pacientes durante la fase paroxísmica de la enfermedad no es convincente y tiene poca influencia en su curso.

IV. CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

El *Corynebacterium diphtheriae* es una bacteria grampositiva pleomórfica inmóvil, de forma en bastoncillo, que se tiñe metacromáticamente por el método de Albert-Laybourn. Algunas cepas producen una toxina potente que causa difteria. La incidencia de la difteria disminuyó notablemente debido a la vacunación masiva que tuvo lugar después de la Segunda Guerra Mundial, por lo que es una enfermedad rara en las poblaciones inmunizadas. Con anterioridad, la difteria era una enfermedad típica de niños. Sin embargo, todavía es endémica en regiones de África, Asia y América del Sur (28-31).

El diagnóstico confirmatorio de la difteria depende de que se detecten cepas toxigénicas de *C. diphtheriae* en especímenes de la piel, la nariz o la garganta, en combinación con signos clínicos. Los enfoques terapéuticos específicos en general se basan en resultados clínicos y epidemiológicos, porque cualquier retraso representa un riesgo grave para el paciente. Sin embargo, el diagnóstico exacto depende del aislamiento del microorganismo o de la detección de producción de toxina diftérica.

El examen de frotis directos de lesiones diftéricas sigue siendo un complemento importante, aunque a menudo inexacto del examen clínico. Se debe notificar al laboratorio la posibilidad de difteria, para que emplee los procedimientos y medios de cultivo pertinentes. Los especímenes deben sembrarse en placas sobre agar sangre de carnero (para ayudar en el diagnóstico diferencial de infección estreptocócica), así como sobre medios especiales para aislar *C. diphtheriae*, tal como el de Loeffler o el medio inclinado de Pai, así como en una placa de agar de cisteína-telurito. La recuperación de *C. diphtheriae* mejora cultivando especímenes de la garganta y la nasofaringe de pacientes infectados.

La identificación de los bacilos de la difteria se basa en varias características fisiológicas; todas las cepas recuperadas deben examinarse por medio de valoraciones *in vitro* o *in vivo* para detectar su toxigenicidad (30, 32-34). La valoración de virulencia *in vitro* más común es la prueba de inmunodifusión de Elek y sus variantes. La producción de toxina diftérica también puede detectarse con pruebas en cultivo de tejidos. Los ensayos *in vivo*, como la prueba de confrontación con cobayo y la de piel de conejo, se consideran sumamente sensibles. Aunque los antibióticos como la penicilina y la eritromicina, se emplean para la erradicación de *C. diphtheriae*, no son un sustituto para el tratamiento específico de difteria con antitoxina.

V. *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

El *Haemophilus influenzae* es responsable de un número elevado de infecciones invasivas anualmente, incluyendo bacteriemia, meningitis y neumonía. Esta especie se considera como la segunda causa más importante de neumonía bacteriana en varias partes del mundo (34-36). Las infecciones agudas de las vías respiratorias causadas por *H. influenzae* incluyen no solo neumonía (a menudo con empiema) y epiglotitis, sino también mastoiditis, sinusitis y otitis media. Una de las características más sorprendentes de las infecciones por *H. influenzae* es la relación entre la edad y la susceptibilidad. Las infecciones invasivas predominan durante la edad de inmunodeficiencia humoral relativa (3 meses a 3 años). La incidencia de la neumonía es mayor en los niños menores de 5 años, con una máxima entre los 4 y los 7 meses de edad.

El *H. influenzae* es un cocobacilo pleomórfico gramnegativo que resulta sumamente difícil de cultivar y se presenta en forma encapsulada o no encapsulada. Las cepas aisladas de infección invasiva suelen ser encapsuladas. Estas se dividen en seis tipos capsulares (del a al f) conforme a sus polisacáridos. El serotipo b es responsable de la mayoría de las enfermedades invasivas en los niños (34-37). Las cepas no encapsuladas normalmente habitan en la nasofaringe y raras veces causan enfermedades bacteriémicas o neumonía en los niños, aunque son una causa importante de otitis media, sinusitis e infecciones de la mucosa de las vías respiratorias superiores.

Para hacer el diagnóstico en el laboratorio debe obtenerse especímenes representativos del sitio infectado. Debido a la dificultad de trabajar con *H. influenzae* y también a que éste muere rápidamente en el material clínico, tanto a la temperatura ambiente como refrigerado, los especímenes deben cultivarse de inmediato. La mayoría de los medios convencionales de agar no apoya la multiplicación de esta bacteria, y por eso los especímenes deben sembrarse en estrias en un agar de chocolate, en el medio de Levinthal u otros medios idóneos, y luego incubarse durante 18 a 24 horas en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂. Como la mayoría de las infecciones por *H. influenzae* está relacionada con bacteriemia, las muestras sanguíneas son fuentes importantes para el aislamiento. La identificación se basa en pruebas para demostrar la necesidad específica de los factores X y V, y en otras pruebas fisiológicas. La identificación serológica se realiza utilizando antisueros específicos para los antígenos capsulares (37).

La ampicilina era el medicamento preferido para el tratamiento de las infecciones por *H. influenzae*, hasta que surgieron cepas resistentes. La resistencia a la ampicilina en *Haemophilus* se debe principalmente a la producción de B-lactamasa, por lo que se puede detectar con facilidad y rapidez mediante una prueba de producción de B-lactamasa. También se sigue recibiendo informes sobre la resistencia a otros medicamentos, como cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina (34, 38-39). Ha causado inquietud el descubrimiento de cepas resistentes a la ampicilina y el cloranfenicol en diferentes partes del mundo (34). En algunas regiones, el surgimiento de estas cepas de resistencia múltiple ha obligado a emplear otro tipo de antimicrobianos, tales como la nueva y más costosa tercera generación de cefalosporinas. La mayoría de las cepas es sensible a la segunda y tercera generación de cefalosporinas, amoxicilina/ácido clavulánico, algunas quinolonas y macrólidos.

VI. *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Aunque ahora se considera como una bacteria, por muchos años se pensó que el *M pneumoniae* era un virus. Los micoplasmas se consideran como las bacterias autorreplicantes más pequeñas y simples. A diferencia de otros procariones, no tienen paredes celulares, por lo que forman parte de la clase *Mollicutes*. La forma celular básica de los micoplasmas en cultivo es cocoidea, pero también ocurren formas alargadas o filamentosas. Una de las características distintivas más útiles de los micoplasmas es la forma peculiar de huevo frito de las colonias en la superficie de los medios de agar (40).

Datos actuales sugieren que el *M pneumoniae* puede estar involucrado en 5 a 30% de todos los casos de neumonía contraída en la comunidad (41-43). La distribución por edades de los pacientes es una característica interesante de las infecciones por *M pneumoniae*. Un informe reciente ha revelado que las infecciones por *M pneumoniae* son más frecuentes en los niños pequeños (3 a 6 años) que en los de otras edades y en adultos (43). Sin embargo, estos datos contrastan con el concepto anteriormente aceptado de que *M pneumoniae* ocurre con más frecuencia en los niños en edad escolar y los adultos jóvenes, de 5 a 19 años (44). Por otro lado, el *M pneumoniae* no parece observarse con frecuencia en lactantes menores de 6 meses, lo que sugiere inmunidad conferida por la madre. Los datos sobre la incidencia de infecciones por micoplasma probablemente se ajustarán más a la realidad cuando se cuente con técnicas de diagnóstico más sencillas y se generalice su uso.

El cultivo es esencial para el diagnóstico definitivo en el laboratorio. Un medio ordinario para micoplasma consta de infusión de corazón, peptona, extracto de levadura, sales, glucosa o arginina y suero de ternero o caballo. Se agrega penicilina u otras sustancias como agentes selectivos para evitar la hiperproliferación de bacterias de crecimiento rápido presentes en los especímenes (40). Las secreciones de las vías respiratorias se inoculan en un medio difásico selectivo hecho de caldo de micoplasma y agar y complementado con glucosa y rojo de fenol como indicadores del crecimiento. El caldo del medio difásico se debe subcultivar en agar de

micoplasma cuando ocurre un cambio de color, o a intervalos semanales por un mínimo de ocho semanas. Las colonias que aparecen en la superficie del agar pueden identificarse como *M pneumoniae* mediante pruebas serológicas con anticuerpos específicos. Los métodos para el diagnóstico rápido, como la detección directa del microorganismo en el esputo por medio de inmunofluorescencia, microscopio electrónico o prueba ELISA, se encuentran en diversas etapas de desarrollo (40, 45). Nuevos enfoques basados en el uso de sondas específicas de ADN son prometedores y se espera que superen las dificultades encontradas en el cultivo y serodiagnóstico de infecciones (46).

En general, los micoplasmas son sensibles a la mayoría de los antibióticos de amplio espectro, como el cloranfenicol y la tetraciclina, pero resistentes a los medicamentos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, como las β -lactamasas (47). La tetraciclina combinada con eritromicina reduce la duración de los síntomas en los pacientes con infección por *M pneumoniae*. Sin embargo, al tratamiento eficaz de los síntomas generalmente no le sigue la erradicación del microorganismo del huésped infectado.

VII. *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

El *Streptococcus pneumoniae* sigue siendo una causa principal de neumonía, meningitis y otitis media en personas de todas las edades; se considera la bacteria que más frecuentemente causa neumonía adquirida en la comunidad. Se estima que en Estados Unidos cada año ocurren aproximadamente de 500.000 a 1.000.000 de casos de neumonía neumocócica con 50.000 defunciones. Se calcula que en los países en desarrollo ocurren alrededor de 1.000.000 de defunciones por año entre niños menores de 5 años debido a la neumonía neumocócica (48).

Los neumococos también son la causa más frecuente de otitis media y bacteriemia, y un agente importante de sinusitis en los niños. La falta de datos exactos impide los cálculos de las tasas de enfermedades neumocócicas en los niños. Sin embargo, hay pruebas que sugieren que la mayoría de los niños sufre alguna clase de infección neumocócica durante su vida. Aproximadamente 80% de todos los niños presenta al menos un ataque de otitis media antes de los 3 años de edad (49) y los neumococos son responsables de casi la mitad de estos casos. A pesar de la existencia de un gran volumen de información, se ignoran muchos aspectos de las infecciones neumocócicas. En efecto, la continua frecuencia y gravedad de estas infecciones, así como la aparición reciente de cepas de neumococo resistentes a los antimicrobianos, subrayan la necesidad de entender mejor estas infecciones, así como el desarrollo y el uso de medidas terapéuticas y preventivas más apropiadas.

El aislamiento de los neumococos de ciertas secreciones corporales establece un diagnóstico firme de IRA. Por lo tanto, deben cultivarse especímenes como la sangre, el líquido pleural y los derrames del oído medio. Se desconoce la prevalencia exacta de la bacteriemia asociada con neumonía neumocócica. Solo en una minoría de estos casos se demuestra bac-

teriemia. En consecuencia, aunque se cree que la bacteriemia ocurre en todos los pacientes de neumonía neumocócica, debe de ser transitoria. Algunas de las posibles limitaciones para la detección son el momento de los cultivos, el volumen de sangre extraída para el cultivo y las características propias de la infección (49).

El *S. pneumoniae* es un coco grampositivo que generalmente se presenta en pares (diplococo) y ocasionalmente en cadenas cortas. Es una bacteria frágil y difícil de cultivar. El crecimiento óptimo ocurre en una atmósfera rica en CO₂. Uno de los mejores medios para el aislamiento de *S. pneumoniae* es el caldo de tripticosa soya (TSB, usado para hemocultivos) o agar con 5% de sangre de oveja o de caballo (TSA, usado para cultivar otros especímenes). También puede usarse agar chocolate. Los hemocultivos deben subcultivarse en placas de agar dentro de las 12 a 18 horas posteriores a la incubación. Los neumococos aparecen como pequeñas colonias mucoides grisáceas rodeadas de una zona verdosa de β -hemólisis. A medida que envejece el cultivo, las colonias se aplanan y la parte central se hunde. La identificación presuntiva de *S. pneumoniae* se basa en los resultados de la sensibilidad a la optoquina y en las pruebas de solubilidad de bilis (50). La identificación puede confirmarse mediante reacción serológica con un antisuero polivalente que contiene anticuerpos para los diferentes serotipos (conocido como omnisuero).

Aunque se reconocen más de 80 serotipos diferenciados de neumococos, basados en las diferencias de los polisacáridos capsulares, relativamente pocos tipos causan infección grave. La distribución de serotipos neumocócicos asociados con enfermedad puede variar conforme a diversos parámetros, entre ellos la zona geográfica, el período de análisis y el grupo de edad. Los resultados de vigilancia realizada en países más desarrollados sugieren que la distribución de serotipos asociada con infección en los niños es diferente de la observada en adultos. Los serotipos 1, 3, 4, 6, 7, 9, 14, 18, 19 y 23 son los más frecuentes en las enfermedades de niños (51-53). Todos están incluidos en la vacuna antineumocócica polivalente (23 serotipos) actualmente en uso. Sin embargo, no se recomienda esta vacuna para los niños menores de 2 años de edad, pues no estimula una respuesta inmunitaria adecuada en los niños pequeños (49, 54). Actualmente se desarrollan nuevas vacunas antineumocócicas, incluida una en que varios polisacáridos capsulares se conjugan con proteínas portadoras. Las vacunas basadas en proteínas o conjugados tienen probabilidad de ser más inmunógenas en los niños pequeños y en las personas con respuesta inmunitaria atenuada (48).

Un aspecto importante en el control de las infecciones neumocócicas está relacionado con los cambios en la sensibilidad de los neumococos a agentes antimicrobianos. Un mayor porcentaje de cepas se está haciendo resistente a varios antimicrobianos, especialmente a la penicilina, según informes de partes del mundo tanto desarrolladas como en desarrollo (55-58). Además de la sensibilidad reducida a la penicilina, se ha notificado resistencia a cloranfenicol, eritromicina, trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina y otros medicamentos. Los niños más pequeños que han estado tomando medicamentos antimicrobianos durante mucho tiempo, y los que asisten a guarderías infantiles tienen más probabilidades de sufrir una infección causada por una cepa de neumococo resistente.

El desarrollo de la resistencia generalizada a la penicilina y la reciente descripción de la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación entre los neumococos son motivo de seria preocupación dada la repercusión adversa de esta característica en el tratamiento y control de las infecciones. En consecuencia, se precisa una vigilancia completa de las modalidades de farmacoresistencia de este microorganismo, a fin de guiar los esfuerzos de prevención y control. Se ha recomendado a los laboratorios clínicos que examinen todos los cultivos importantes de *S. pneumoniae* para determinar la resistencia a la penicilina. Este examen selectivo se puede hacer modificando la prueba de sensibilidad de disco y usando oxacilina (1 µg) (59).

VIII. *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

La faringitis estreptocócica del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), es una de las infecciones bacterianas más frecuentes, especialmente en el grupo de edad pediátrica. La incidencia máxima es al comienzo de la edad escolar (entre 5 y 8 años), aunque todos los grupos son susceptibles (48, 60).

El diagnóstico basado únicamente en resultados clínicos, puede ser sumamente inexacto debido a la superposición con IRA causada por otros agentes, entre ellos los virus. Por consiguiente, la confirmación de la presencia de estreptococos del grupo A en las vías respiratorias superiores es importante para el diagnóstico y tratamiento correctos de esta infección. Se ha establecido métodos convencionales y rápidos para el diagnóstico de laboratorio. Sin embargo, varios factores todavía pueden presentar serios impedimentos al tratamiento satisfactorio de las IRA por estreptococos del grupo A y la subsiguiente prevención de secuelas no supurativas —fiebre reumática y glomerulonefritis— especialmente en los países menos desarrollados.

Una tinción por el método de Gram de especímenes obtenidos de secreciones o lesiones de las vías respiratorias superiores no es de gran ayuda para el diagnóstico. Para el efecto, los hisopados de la garganta deben sembrarse en placas sobre agar sangre de oveja a 5% (preparado en una base con poca o ninguna azúcar, tal como el agar de tripticasa soya). También se puede usar otra sangre animal para proporcionar los nutrientes requeridos por *S. pyogenes*. Las colonias beta hemolíticas de cocos grampositivos negativos para la catalasa pueden identificarse presuntivamente como *S. pyogenes* usando el disco de bacitracina o las pruebas de PYR (50).

Los estreptococos del grupo A son positivos en ambas pruebas. La agrupación serológica empleando antisero específico para carbohidratos del grupo A, permite la identificación confirmatoria del aislado. La serotipificación T y M basada en la detección específica de antígenos proteínicos se puede hacer en laboratorios de referencia.

Estos procedimientos, especialmente la tipificación M, pueden proporcionar información importante para el rastreo de brotes y la vigilancia de la distribución de diferentes serotipos

conforme a la región geográfica y el grupo de edad, por ejemplo. La detección de antígenos de estreptococo del grupo A en especímenes de la garganta, representa uno de los adelantos más importantes en el diagnóstico rápido de la faringitis. Se ha realizado inmunofluorescencia directa en frotis, ya sea antes o después del cultivo para enriquecer el microorganismo. En los últimos años, esta técnica se ha sustituido por varios productos disponibles en el mercado que emplean tecnologías de aglutinación de partículas o inmunoválculo enzimático (61). Estos reactivos permiten la detección del antígeno del grupo A en el breve plazo de 10 minutos. Una prueba rápida para detectar la presencia de estreptococos del grupo A en hisopados de garganta puede ser el método favorito en determinar situaciones, como en centros de pacientes ambulatorios (donde estos quizás no regresen después de la visita) o cuando el paciente ya ha sido tratado con antimicrobianos.

La penicilina sigue siendo el medicamento preferido para el tratamiento de la faringitis estreptocócica (60), aunque puede fracasar en erradicar la bacteria hasta en 30% de los pacientes. También se recomienda la eritromicina, pero se ha notificado un número creciente de cepas resistentes a este medicamento. Las cefalosporinas orales y parenterales pueden ser tan eficaces o más que la penicilina o la eritromicina para producir curaciones clínicas y microbiológicas.

En cultivos de exudado faríngeo también pueden encontrarse otros grupos serológicos de estreptococo β -hemolítico, como B, C, F y G. Se ha notificado faringitis causada por estos grupos, especialmente el C y el G, pero la información todavía es muy limitada (62, 63).

IX. OTRAS CAUSAS BACTERIANAS DE LAS IRA

Se han mencionado otras bacterias como posibles causas de faringitis, entre ellas especies similares a *Corynebacterium* [por ej., el *Arcanobacterium (Corynebacterium) haemolyticum*], el *S. aureus* e incluso gramnegativas, como *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*. Sin embargo, no existen pruebas firmes de su participación en un número apreciable de casos (5, 6, 48), por lo que en estos momentos no se recomienda la búsqueda sistemática de bacterias en el laboratorio, salvo estreptococo β -hemolítico, del grupo A, como causa de faringitis, excepto en circunstancias especiales y después de discutirlo con el clínico correspondiente.

Como ya se ha indicado, en la garganta frecuentemente se encuentran ciertos agentes clásicos de neumonía o meningitis, como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis*, pero no está claro su papel como agentes causales de las infecciones en este sitio.

También se harán comentarios en relación con otras seis especies o grupos de bacterias que son causa comprobada o posible de IRA, especialmente de neumonía en los niños: *Branhamella (Moraxella) catarrhalis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y bacilos gramnegativos.

Los microorganismos *Branhamella (Moraxella) catarrhalis* son cocos gramnegativos que se asemejan morfológicamente a las células de *Neisseria*. La observación de la morfología de la colonia, la presencia o ausencia de pigmento y la capacidad para crecer en medios selectivos comúnmente empleados para *Neisseria* patogénica pueden ser útiles en la diferenciación. Considerado al principio como un microorganismo comensal, *B. catarrhalis* recientemente ha obtenido nuevo reconocimiento como un microorganismo patógeno respiratorio importante que causa otitis media aguda y sinusitis y, con menos frecuencia, infecciones broncopulmonares (64, 65). Estudios recientes han señalado que el estado de portador de *B. catarrhalis* se presenta especialmente en los niños muy pequeños (5, 66) y es sumamente frecuente cuando hay síntomas de las vías respiratorias. Un alto porcentaje de cepas aisladas de *B. catarrhalis* produce β -lactamasa y por lo tanto, son resistentes a la penicilina y la ampicilina. Como la β -lactamasa producida por este agente puede contrarrestarse por un inhibidor de β -lactamasa como el ácido clavulánico, se recomienda la asociación de éste con ampicilina para el tratamiento. Por otro lado, los cultivos aislados siguen siendo sumamente sensibles a la eritromicina y trimetoprima-sulfametoxazol.

La *Chlamydia pneumoniae* (también conocida como el microorganismo TWAR) recientemente se designó como la tercera especie de *Chlamydia*, tras haber sido identificada inicialmente como *C. psittaci*. Este género contiene tres especies: *C. psittaci*, *C. trachomatis* y la recientemente descrita *C. pneumoniae*. Estas tres especies son capaces de causar neumonía en los seres humanos. Sin embargo, parece que tanto las vías de transmisión, como la población susceptible y el cuadro clínico difieren entre las tres especies. *C. pneumoniae* es la que se ha encontrado únicamente en los seres humanos como causa de IRA, especialmente neumonía leve a grave. Informes recientes estiman que cerca de 2 a 15% de las neumonías contraídas en la comunidad pueden atribuirse a *C. pneumoniae* (41, 67-69).

La *Legionella pneumophila* es un bacilo delgado, gramnegativo, algo pleomórfico, que se considera difícil de cultivar, pues no crece en la mayoría de los medios de cultivo empleados de ordinario en los laboratorios clínicos. Aunque la identificación exacta de la especie *Legionella* puede exigir más recursos, los laboratorios clínicos debieran poder aislarlo e identificarlo presuntivamente (70). Los miembros del género *Legionella* son afines a un medio acuoso y pueden encontrarse en el agua de lagos, estanques, agua para bañarse, tanques de agua caliente y depósitos de aire acondicionado. La incidencia de la legionelosis pediátrica se ha estudiado principalmente por medio de encuestas serológicas, tal como lo han hecho la mayoría de los estudios de población adulta. Sin embargo, parece que la *Legionella* raras veces causa neumonía en niños por lo demás sanos y se ha notificado de pocos casos comprobados por cultivo en niños inmunodeprimidos (70, 71). El cuadro clínico más común de la infección por *Legionella* es la neumonía aguda, que varía en cuanto a gravedad desde la afección leve hasta la neumonía multilobular mortal. Casi todos los casos de infección respiratoria por *Legionella* en los niños se han asociado con *L. pneumophila*. El diagnóstico de laboratorio puede hacerse mediante cultivo en medios especialmente diseñados, tales como el agar amortiguado de carbón vegetal y el extracto de levadura (BCYE), detección directa de los

antígenos por inmunofluorescencia directa y la demostración de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (72).

Aunque la *Neisseria meningitidis* generalmente se asocia con el estado de portador asintomático en las vías respiratorias superiores, se ha notificado de pocos casos de neumonía causada por esta bacteria. En contraste con otros grupos serológicos de *N. meningitidis*, la enfermedad debida al grupo Y suele presentarse como neumonía (73, 74). En los niños pequeños, la neumonía puede ser parte de una enfermedad leve. La neumonía meningocócica ocurre en conjunción con meningococemia o meningitis en 8 a 15% de los casos. Los pacientes con IRA vírica previa corren peligro de contraer neumonía meningocócica. El diagnóstico es difícil, ya que el cultivo ordinario de esputo no incluye medios selectivos para los meningococos, por lo que generalmente se basa en el hemocultivo.

Se considera que las neumonías adquiridas en la comunidad causadas por *Staphylococcus aureus* son poco comunes en los países más desarrollados y generalmente ocurren después de la influenza o a partir de bacteriemia estafilocócica. Por otro lado, según datos procedentes de varias partes del mundo en desarrollo, se demostró que el *S. aureus* es responsable de un alto porcentaje de casos de neumonía (3, 21); además, el *S. aureus* es también una causa importante de neumonía nosocomial.

La neumonía y otras infecciones graves debidas a este microorganismo son motivo de preocupación, específicamente en los recién nacidos, así como en los niños con defensas de huésped alteradas o con infecciones respiratorias víricas previas, pues el curso de la enfermedad generalmente es grave (5, 11). Las penicilinas semisintéticas, como la nafcilina o la oxacilina, se emplean para el tratamiento de la neumonía por *S. aureus*. Sin embargo, con el número creciente de cepas resistentes a este medicamento, la vancomicina se está convirtiendo en el medicamento preferido (48).

Aunque los estreptococos del grupo B (*Streptococcus agalactiae*) están asociados con infecciones a cualquier edad, son más comunes en lactantes menores de 1 mes. Las infecciones por estreptococos del grupo B, incluyendo neumonía, bacteriemia y meningitis en el período neonatal, siguen siendo un asunto extremadamente importante a juzgar por lo notificado en zonas donde existen medios apropiados para la detección de esta bacteria (19, 24). Sin embargo, existe una escasez considerable de información sobre los efectos de las infecciones de neonatos por el grupo B en muchos países.

La mortalidad de las infecciones por el estreptococo del grupo B entre recién nacidos, puede llegar a 50%. La neumonía está asociada con las llamadas infecciones del grupo B de inicio temprano, que generalmente producen síntomas en las primeras seis ó 12 horas de vida. La diferenciación entre la neumonía estreptocócica del grupo B y el síndrome de dificultad respiratoria, a menudo resulta difícil (75). El diagnóstico preciso se basa en el aislamiento del microorganismo. Debe obtenerse hemocultivos en todos los neonatos con neumonía estreptocócica del grupo B. La bacteria también puede aislarse del líquido gástrico, el conducto auditivo, el cordón umbilical y las superficies de la piel, aunque los cultivos positivos de cualquiera de estos sitios solo representan pruebas sugestivas.

Los estreptococos del grupo B pueden cultivarse en una variedad de medios; el agar sangre es el más usado. También pueden ser útiles varios medios selectivos. Los laboratorios clínicos cuentan con métodos simples para la identificación presuntiva de estos estreptococos. Por lo tanto, una cepa de estreptococo, que generalmente presenta una zona angosta de β -hemólisis, resistente a la bacitracina y positiva para las pruebas CAMP o de hidrólisis de hipurato, puede identificarse presuntivamente como del grupo B (50, 75). La confirmación requiere la detección serológica del antígeno del grupo B. Los estreptococos del grupo B también pueden dividirse en siete serotipos (Ia, Ib/c, Ia/c, II, III, IV y V) basados en antígenos específicos de polisacárido. La serotipificación puede ser útil para detectar la fuente de la infección. Varias técnicas para la detección de antígenos en los humores corporales son útiles para proporcionar un diagnóstico etiológico rápido.

Aunque sensible a la penicilina, las cepas de estreptococos del grupo B necesitan concentraciones inhibitorias de este medicamento mayores que las requeridas por las cepas del grupo A (76). La mayoría de las cepas es sensible al cloranfenicol, la clindamicina y la eritromicina, pero resistente a la tetraciclina. Para el tratamiento se recomienda combinaciones de ampicilina o de penicilina con gentamicina, pues ejercen un efecto sinérgico sobre los estreptococos del grupo B, tanto *in vitro* como *in vivo*.

La neumonía causada por bacilos aerobios gramnegativos, como los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (principalmente *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Proteus*) y de las *Pseudomonas*, se ha convertido en un problema cada vez más importante en los últimos 20 años (77). Datos procedentes de los países más desarrollados indican que estos microorganismos solo causan una pequeña proporción de las neumonías adquiridas en la comunidad, pero son la causa notificada con más frecuencia de IRA en pacientes hospitalizados. Las infecciones agudas de las vías respiratorias inferiores, de las cuales de 40 a 70% es causado por bacilos aerobios gramnegativos, son la tercera infección nosocomial más común (78).

X. COMENTARIOS FINALES

Es difícil evaluar la comparación general de los resultados de diferentes estudios sobre la frecuencia de las diversas bacterias causales de las IRA, pues los enfoques metodológicos, tales como los procedimientos de laboratorio y las características de las poblaciones analizadas (por ejemplo, edad, salud y situación económica, entre otros) son muy diferentes entre sí. Sin embargo, puede inferirse de una revisión como ésta, que probablemente se han subestimado las diferencias regionales en la prevalencia de los microorganismos patógenos. Por otro lado, en los últimos años, en muchas partes del mundo se han observado cambios en varias características biológicas que pueden aumentar la virulencia de ciertas bacterias patógenas respiratorias. Por consiguiente, se hace evidente la necesidad de iniciar la normalización de los procedimientos y la creación de condiciones para la detección e identificación precisa en el laboratorio de los diversos microorganismos que pueden causar las IRA. Los cambios en las

características biológicas de las bacterias causales de las IRA, solo pueden detectarse y definirse manteniendo una continua vigilancia bacteriológica local. Esto sería una contribución importante, no solo para mejorar el diagnóstico etiológico preciso, sino también para un uso más racional y el desarrollo de métodos terapéuticos y profilácticos eficaces para un grupo de infecciones con tasas notablemente elevadas de morbilidad y mortalidad.

XI. REFERENCIAS

1. Gwatkin DR. *How many die? A set of demographic estimates of the annual number of infant and child deaths in the world.* Am. J. Public Health 1980; 70: 1286-9.
2. World Health Organization, Global Medium-term Programme 13.7. *Acute respiratory infections.* Document TRI/ARI/MTP/83.1 Geneva: World Health Organization, 1983.
3. Berman S, McIntosh K. *Selective primary health care strategies for control of disease in the developing world.* XXI. Acute respiratory infections. Rev. Infect. Dis. 1985; 7: 674-91.
4. Pio A, Leowski J, Ten-Dam HG. *The problem of acute respiratory infections in children in developing countries.* WHO Document WHO/RSD/83.11, 1983.
5. Walter EB Jr, Shurin PA. *Acute respiratory infections.* In: Krugman S, Katz SL, Gershon AA, Wilfert CM, eds. Infectious diseases of children. St. Louis: Mosby-Year Book, 1992: 329-75.
6. Cherry JD. *Pharyngitis (pharyngitis, tonsillitis, tonsillopharyngitis, and nasopharyngitis).* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 159-166.
7. Cherry JD, Dudley JP. *Sinusitis.* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 142-148.
8. Feigin RD, Kline MW, Hyatt SR, Ford III KL. *Otitis media.* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 174-189.
9. Daum RS, Smith AL. *Epiglottitis (supraglottitis).* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 197-209.
10. Cherry JD. *Croup (laryngitis, laryngotracheitis, spasmodic croup, and laryngotracheobronchitis)* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 209-220.
11. Klein JO. *Bacterial pneumonias.* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 299-309.
12. Burman IA, Trollfors B, Andersson B, Henrichsen J, Juto P, Lagergard T, Mollby R, Norrby R. *Diagnosis of pneumonia by cultures, bacterial and viral antigen detection tests, and serology with special reference to antibodies against pneumococcal antigens.* J. Infect. Dis. 1991; 163: 1087-93.
13. Claesson BA, Trollfors B, Brolin I, Granstrom M, Henrichsen J, Jodal U, Juto P, Kallings I, Kanclerski K, Lagergard T, Steinwall L, Strannegard O. *Etiology of community-acquired pneumonia in children based on antibody responses to bacterial and viral antigens.* Pediatr. Infect. Dis. J. 1989; 8: 856-62.

14. Forgie IM, O'Neill K, Lloyd-Evans N, Leinonen M, Campbell H, Whittle C, Greenwood BM. *I. Etiology of acute lower respiratory tract infections in Gambian children. & II. Acute lower respiratory tract infection in children ages one to nine years presenting at the hospital.* *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1991; 10: 42-7.
15. O'Neill KP, Lloyd-Evans N, Campbell H, Forgie IM, Sabally S, Greenwood M. *Latex agglutination test for diagnosing pneumococcal pneumonia in children in developing countries.* *Br. Med. J.* 1989; 298: 1061-64.
16. Ramsey BW, Marcuse EK, Foy HM, Cooney MK, Allan I, Brewer D, Smith AL. *Use of bacterial antigen detection in the diagnosis of pediatric lower respiratory tract infections.* *Pediatrics* 1986; 8: 1-9.
17. Rusconi F, Rancilio L, Assael BM, Bonora G, Cerri M, Pietrogrande C, Razon S, Serafini L, Torti G, Vaggi D, Garlaschi C. *Counterimmunoelectrophoresis and latex particle agglutination in the etiologic diagnosis of presumed bacterial pneumonia in pediatric patients.* *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1988; 7: 781-85.
18. Ruuskanen O, Nohynek H, Ziegler T, Capeding R, Rikalainen H, Huovinen P, Leinonen M. *Pneumonia in childhood: etiology and response to antimicrobial therapy.* *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1992; 11: 217-23.
19. Christy C, Powell KR. *Pneumonia in children: tracking the cause.* *J. Resp. Dis.* 1987; 8: 65-73.
20. Adedoyin MA, Fagbule D. *Bacterial aetiology of pneumonia in young Nigerian children.* *Nig. J. Paediatr.* 1987; 14: 37-40.
21. Johnson A-W BR, Osinusi K, Aderere WI, Adeyemi-Doro FAB. *Bacterial aetiology of acute lower respiratory infections in pre-school nigerian children and comparative predictive features of bacteraemic and non-bacteraemic illnesses.* *J. Trop. Pediatr.* 1993; 39: 97-106.
22. Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991.
23. *Manual of laboratory procedures for diagnosis of respiratory bacterial pathogens.* Washington DC: BOSTID. *Research Grants Program on Etiology and Epidemiology of Acute Respiratory Infections in Children*, 1986.
24. Gilchrist MJR. *Bordetella.* In: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991: 471-77.
25. Gan VN, Murphy TV. *Pertussis in hospitalized children.* *Am. J. Dis. Child.* 1990; 144: 1130-34
26. Zackrisson G, Taranger J, Trollfors B. *History of whooping cough in nonvaccinated Swedish children, related to serum antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin.* *J. Pediatr.* 1990; 116: 190-94.
27. Hoppe JE, Hang A. *Antimicrobial susceptibility of Bordetella pertussis (part I).* *Infection* 1988; 16: 126-30.
28. Feigin RD, Stechenberg BW, Strandgaard BH. *Diphtheria.* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. *Textbook of pediatric infectious diseases.* Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 1110-16.
29. Rappuoli R, Perugini M, Falsen E. *Molecular epidemiology of the 1984-1986 outbreak of diphtheria in Sweden.* *N. Engl. J. Med.* 1988; 318: 12-14.

30. Camello TCE, Formiga LCD. *Identification of Corynebacterium diphtheriae by indirect immunofluorescence technique*. Rev. Microbiol., Sao Paulo, 1992; 23: 76-80.
31. Chen RT, Broome CV, Weinstein RA, Weaver R, Tsai TE. *Diphtheria in the United States, 1971-81*. Am. J. Public Health 1985; 75: 1393-97.
32. Krech T, Hollis DG. *Corynebacterium and related organisms*. In: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of clinical microbiology, 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991: 277-86.
33. Formiga LCD. *New possibilities for the laboratory diagnosis of diphtheria*. Braz. J. Med. Biol. Res. 1985; 18: 401-02.
34. Mendelman PM, Smith AL. *Haemophilus influenzae*. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 1117-40.
35. Munson RS Jr, Kaber, MH, Lenoir AA, Granoff DM. *Epidemiology and prospects for prevention of disease due to Haemophilus influenzae in developing countries*. Rev. Infect. Dis. 1989; 11: S588-97.
36. Woodhead M, MacFarlane JT. *Prospective study of the aetiology and outcome of pneumonia in the community*. Lancet 1987; 1: 671-74.
37. Kilian M. *Haemophilus*. In: Ballows A, Hausler WJ Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of clinical microbiology, 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991: 463-70.
38. Needham CA. *Haemophilus influenzae: antibiotic susceptibility*. Clin. Microbiol. Rev. 1988; 1: 218-27.
39. Doern GV, Jorgensen JH, Thornsberry C, Preston DA, Tubert T, Redding JS, Maher LA. *National collaborative study of the prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 1988; 32:180-85.
40. Kenny GE. *Mycoplasmas*. In: Ballows A, Hausler WJ Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of clinical microbiology, 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991: 478-82.
41. Fang GD, Fine M, Orloff J, Arisumi D, Yu VL, Kapoor W, Grayston JT, Wang SP, Kohler R, Muder RR, Yee YC, Rihs JD, Vickers RM. *New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy*. Medicine 1990; 69: 307-16.
42. Mansel JK, Rosenow EC, Smith TE, Martin JW Jr. *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*. Chest 1989; 95: 639-46.
43. Nagayama Y, Sakurai N, Yamamoto K, Honda A, Makuta M, Suzuki R. *Isolation of Mycoplasma pneumoniae from children with lower-respiratory-tract infections*. J. Infect. Dis. 1988; 157: 911-17.
44. Foy HM, Kenny GE, Cooney MK, Allan ID. *Long-term epidemiology of infections with Mycoplasma pneumoniae*. J. Infect. Dis. 1979; 139: 681-87.
45. Harris R, Marion BP, Varkanis G, Kok T, Lunn B, Martin J. *I. Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection. & II. Comparison of methods for the direct detection of specific antigen or nucleic acid sequences in respiratory exudates*. Epidemiol. Infect. 1988; 101: 685-94.

46. Kleemola SRM, Karjalainen JE, Raty RKH. *Rapid diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection: clinical evaluation of a commercial probe test.* J. Infect. Dis. 1990; 162: 70-5.
47. Kenny GE, Cartwright FD. *Susceptibility of Mycoplasma pneumoniae to several new quinolones, tetracycline, and erythromycin.* Antimicrob. Agents Chemother. 1991; 35: 587-89.
48. Facklam RR, Breiman RF. *Current trends in bacterial respiratory pathogens.* Am. J. Med. 1991; 91 (Suppl. 6A): 3S-11S.
49. Teele DW. *Pneumococcal infections.* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992: 1223-29.
50. Facklam RR, Washington II JA. *Streptococcus and related catalase-negative Gram-positive cocci.* In: Balows A, Hausler WJr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of clinical microbiology, 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991:238-57.
51. Klein JO. *The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children.* Rev. Infect. Dis. 1981; 3: 246-53.
52. Gray BM, Dillon HC. *Clinical and epidemiological studies of pneumococcal infections in children.* Pediatr. Infect. Dis. J. 1986; 5: 201-07.
53. Smart LE, Platt DJ, Timbury MC. *A comparison of the distribution of pneumococcal types in the systemic disease and the upper respiratory tract in adults and children.* Epidemiol. Infect. 1987; 98: 203-09.
54. Klein JO, Mortimer EA Jr. *Use of pneumococcal vaccine in children.* Pediatrics 1978; 61: 321-22.
55. Appelbaum PC. *Antimicrobial resistance in Streptococcus pneumoniae: an overview.* Clin. Infect. Dis. 1992; 15: 77-83.
56. Klugman KP. *Pneumococcal resistance to antibiotics.* Clin. Microbiol. Rev. 1990; 3: 171-96.
57. Mastro TD, Ghafoor A, Nomani NL, Ishaq Z, Anwar F, Granoff DM, Spika JS, Thornsberry C, Facklam RR. *Antimicrobial resistance of pneumococci in children with acute lower respiratory tract infection in Pakistan.* Lancet 1991; 337: 156-59.
58. Sessegolo JE, Fracalanza SEL, Oliveira CM, Teixeira LM. *Increasing penicillin resistance in pneumococci strains isolated in Brazil.* In: Orefici G, ed. New perspectives on streptococci and streptococcal infections. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fisher. Zbl. Bakt. 1992; Suppl. 22: 325-26.
59. National Committee for Clinical Laboratories Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.* 4th ed. Approved Standard M2-A4. Villanova, Pa: NCCLS, 1990.
60. Kaplan EL. *Group A streptococcal infections.* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1992: 1296-305.
61. Facklam RR. *Specificity study of kits for detection of group A streptococci directly from throat swabs.* J. Clin. Microbiol. 1987; 25: 504-08.
62. Turner JC, Hayden GE, Kiselica D, Lohr J, Fishburne CE, Murren D. *Association of group C B-hemolytic streptococci with endemic pharyngitis among college students.* J. Am. Med. Assoc. 1990; 264: 2644-47.
63. Gerber MA, Randolph ME, Martin NJ, Rizkallah ME, Cleary PP, Kaplan EL, Ayoub EM. *Community-wide outbreak of group G streptococcal pharyngitis.* Pediatrics 1991; 87: 598-603.

64. Catlin BW. *Branhamella catarrhalis: an organism gaining respect as a pathogen.* Clin. Microbiol. Rev. 1990; 3: 293-320.
65. Marchant CD. *Spectrum of disease due to Branhamella catarrhalis in children with particular reference to acute otitis media.* Am. J. Med. 1990; 88 (Suppl 5A): 5S-19S.
66. Vaneechoutte M, Verschraegen G, Claeys G, Weise B, Abeele AMVD. *Respiratory tract carrier rates of Moraxella (Branhamella) catarrhalis in adults and children and interpretation of the isolation of M. catarrhalis from sputum.* J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2674-80.
67. Campbell JF, Barnes RC, Kozarsky PE, Spika JS. *Culture-confirmed pneumonia due to Chlamydia pneumoniae.* J. Infect. Dis. 1991; 164: 411-13.
68. Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Hammerschlag MR, Schacter J. *Infection with Chlamydia pneumoniae in Brooklyn.* J. Infect. Dis. 1991; 163: 757-61.
69. Grayston JT, Campbell IA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH, Wang S-P. *A new respiratory tract pathogen: Chlamydia pneumoniae strain TWAR.* J. Infect. Dis. 1990; 161: 618-25.
70. Edelstein PH. *Legionnaires' disease, Pontiac fever, and related illnesses.* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992: 1141-49.
71. Kovatch AL, Jardine DS, Dowling JN, Yee RB, Pasculle AW. *Legionellosis in children with leukemia in relapse.* Pediatrics 1984; 73: 811-815.
72. Rodgers FG, Pasculle AW. *Legionella.* In: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of clinical microbiology, 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991: 442-53.
73. Hersh JH, Gold R, Lepow ML. *Meningococcal group Y pneumonia in an adolescent female.* J. Pediatr. 1979; 64: 222-24.
74. Baltimore RS, Feldman HA. *Meningococcal infections.* In: Evans AS, Brachman PS, eds. Bacterial infections of humans. Epidemiology and control. New York: Plenum Medical Book Company, 1991: 425-442.
75. Yagupski P, Menegus MA, Powell KR. *The changing spectrum of group B streptococcal disease in infants: an eleven-year experience in a tertiary care hospital.* Pediatr. Infect. Dis. J. 1991; 10: 801-08.
76. Anthony BE. *Group B streptococcal infections.* In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 1305-16.
77. Hessen MT, Kaye D. *Gram-negative bacilli: the seeds of pneumonia.* J. Respir. Dis. 1987; 8: 105-14.
78. Centers for Disease Control. *National nosocomial infections Study Report. Annual Summary 1984.* Morbid. Mortal. Weekly Rep. 1986; 35: 1755-2955.