

Diseminación de *S. pyogenes* al personal y familiares de niños portadores nasofaríngeos de una guardería

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBO IMSS)

²Laboratorio de Microbiología Molecular, CIBO IMSS

Guadalajara, Jalisco, México

Comunicación con: Alberto Villaseñor-Sierra.
Tel: (33) 3668 3000, extensión 31953.
Fax: (33) 3618 1756.
Correo electrónico: avillase@prodigy.net.mx

Proyecto autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Universidad Autónoma de Guadalajara (registro 2100-01-189), del CLIS del CIBO (2004-1305-02) y financiado en parte por el Grant FOFOI 2004/126

RESUMEN

Objetivo: evaluar prevalencia y diseminación de *S. pyogenes* en nasofaringe de niños de guardería, personal que los atiende y familiares.

Métodos: encuestas microbiológicas con cultivos de nasofaringe al inicio del estudio, y cuatro y siete meses después (306 cultivos en niños, 73 en el personal). Se tomaron cultivos en familiares directos de los niños con cultivo positivo. La diferenciación genética de las cepas se hizo comparando el patrón de RFLP del regulón Vir.

Resultados: Primera encuesta: la prevalencia de *S. pyogenes* en niños, personal y familiares fue de 10, 0 y 4 %. Tres pares de niños amigos de salones distintos compartieron estreptococos clonas I, II y III; se aisló clona VII de un familiar. Segunda encuesta: prevalencia de 4, 0 y 0 %. Dos amigos de un mismo salón portaban clona I y dos de otra sala, clona V. Tercera encuesta: prevalencia de 2, 4 y 14 %. La hermana (que no asistía a la guardería) de un niño con clona II tuvo la misma clona; en un miembro del personal se aisló clona III.

Conclusiones: el aislamiento simultáneo de clonas idénticas en niños ocurrió en parejas de amigos. Los resultados podrían aplicarse para rápida identificación y manejo de los contactos de casos con infección estreptocócica.

SUMMARY

Objective: to evaluate the prevalence of nasopharyngeal *S. pyogenes* (SP) carriers among children attending a day care center (DCC) and the spread of specific clones (SC) among caretakers and relatives.

Methods: nasopharyngeal cultures were performed in children with SP positive culture (306), family members (51) and caretakers (73) at time-0, four and seven months later. Differences among SP strains were determined. Descriptive statistics and Fisher exact test were performed.

Results: SP prevalence in carrier children, caretakers and relatives was 10, 0 and 4 %. Three pairs of children, from two different classrooms, shared SP strains SC I, II and III. A clone VII was isolated from a relative. In the second survey, the SP prevalence was 4, 0 and 0 %. Two classmates shared clone I and other two from a different classroom shared clone V. In the third, the prevalence was 2, 4 and 14 %. Strains of clones II and VII were isolated from children. A sister of one child, who did not attend to DCC, was a carrier of clone II found in her brother. Clone III was isolated in one caretaker.

Conclusions: the SP carrier prevalence was similar to other reports. The sharing of identical clones of SP was found among children in close physical contact.

Recibido: 25 de enero de 2007

Aceptado: 23 de mayo de 2007

Introducción

Streptococcus pyogenes o estreptococo β-hemolítico del grupo A (EβHGA) puede producir una amplia variedad de infecciones locales y sistémicas.¹ En niños de guarderías puede ocasionar un estado de portador,² pero también es responsable de brotes de infección perianal, nasofaringitis, escarlatina y está asociado a complicaciones de varicela.³⁻⁶ Se ha informado que los brotes inician a partir de una sola

clona virulenta de *S. pyogenes* capaz de diseminarse no solo de manera “horizontal” a otros niños,⁷ sino incluso a los trabajadores de la guardería y a otros miembros de la familia.^{8,9}

Aunque es poco conocida la relevancia de ser portador nasofaríngeo de cepas EβHGA, algunos investigadores han establecido que no plantea ningún riesgo para quien las porta como para sus contactos,¹⁰ mientras que otros refieren que los portadores de una clona virulenta podrían tener un

Palabras clave

S. pyogenes
jardines infantiles
enfermedades
nasofaríngeas

Key words

S. pyogenes
child day care centers
nasopharyngeal diseases

riesgo elevado para desarrollar infecciones invasivas, con lo que se justificaría el uso "profiláctico" de antimicrobianos.^{11,12} Esta discrepancia podría deberse a la dificultad para diferenciar entre las siguientes categorías:

1. *Portadores posinfección* (portan una cepa virulenta por un periodo de tiempo largo posterior a una infección).
2. *Contacto* (portan una cepa virulenta por un corto periodo después de la exposición a un caso).
3. *Portadores sanos* (portan una cepa no virulenta de manera transitoria).¹³

Entre los métodos moleculares más utilizados para la genotipificación de *S. pyogenes*, la secuenciación del gen *emm* (que expresa la proteína M) es el estándar de oro. Sin embargo, requiere tiempo prolongado y equipos costosos. Un método opcional es el estudio de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) del regulón Vir mediante la utilización de las enzimas de restricción HaeIII y Hinf I. Éste es un método sencillo, rápido, económico y altamente discriminatorio, ya que incluye los polimorfismos de cinco genes de virulencia (*virR*, *fcr-A*, *emm*, *enn* y *scp-A*). La facilidad de interpretación (comparación de patrón de 4 a 8 bandas de 200 a 4000 pares de base [pb]), su costo, rapidez y que solo requiere un equipo de reacción en cadena de polimerasa, lo hace una herramienta de vigilancia epidemiológica muy útil. Además, tiene una excelente correlación con los resultados obtenidos mediante el estándar de oro (secuenciación del gen *emm*)^{14,15} y es utilizado como único método en estudios en Alemania, Japón y Rumania.¹⁶⁻¹⁸

El objetivo del presente estudio fue identificar a niños portadores de cepas *S. pyogenes* de una guardería del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Guadalajara, Jalisco, México, y evaluar la diseminación de cepas idénticas en empleados y familiares directos.

Métodos

Mediante un diseño longitudinal y prospectivo se realizó una encuesta microbiológica para búsqueda de *S. pyogenes* a través de cultivo nasofaríngeo en tres momentos distintos (tiempo cero, cuatro y siete meses después) en 95, 97 y 114 niños de la guardería participativa U-1048 del IMSS en Guadalajara. El estudio fue realizado previo consentimiento informado a los padres o tutores legales de los

menores y de acuerdo con las normas para investigación en seres humanos de Helsinki.

Fueron positivos para la bacteria 10/95 (10%), 4/97 (4%) y 2/114 (2%), respectivamente. Durante la primera encuesta se tomó cultivo faríngeo en 22 familiares de 8/10 niños positivos para *S. pyogenes* (durante las primeras 24 horas de identificación del niño con cultivo positivo) y en 25 miembros del personal de la guardería. En la segunda encuesta se obtuvo cultivo faríngeo en 22 familiares de los cuatro niños con aislamiento de estreptococo (en las primeras 43 horas) y en 26 miembros del personal. En la última encuesta se tomó cultivo faríngeo en tres familiares de dos niños con aislamiento de *S. pyogenes* (en las primeras 36 horas), cuatro familiares de un miembro del personal de la guardería que resultó positivo para la bacteria y a 22 miembros del personal.

Los cultivos fueron tomados con un hisopo estéril de algodón, transportados en medio Stuart,¹⁹ sembrados en gelosa sangre de carnero a 5% e incubados a 37 °C y 5% de CO₂. La identificación de *S. pyogenes* se llevó a cabo por métodos estándares.²⁰

■ *Identificación de cepas con similitud genética.* Para conocer si las cepas de *S. pyogenes* aisladas de manera simultánea de niños y familiares tenían relación genética, se identificaron los polimorfismos presentes en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de una parte del genoma (regulón Vir) de acuerdo con la técnica descrita por Gardiner y Hartas.^{21,22} Brevemente la extracción de ADN se realizó por técnica alcalina de acuerdo al procedimiento de Chassy;²³ la amplificación del regulón Vir mediante PCR y su digestión enzimática con HaeIII y Hinf I fue efectuada de acuerdo con la técnica de Hartas y colaboradores.²² Los productos digeridos se corrieron en un gel de agarosa (NuSieve®, Rockland MD, EUA) a 2.5% y las bandas obtenidas entre 200 y 4000 pb se compararon visualmente entre cada cepa. Se consideraron cepas de una misma clona si la totalidad de las bandas eran iguales y se clasificaron con números romanos progresivos según el orden de su identificación.

■ *Definición y manejo de estado de portador.* Con la finalidad de establecer si los niños o adultos tenían una infección por estreptococo o solo eran portadores, se comparó la frecuencia de casos con un cultivo positivo con y sin síntomas de infección aguda de vías respiratorias. Todos los niños con cultivo positivo para EβHGA fueron manejados con penicilina G benzatínica por los médicos de su correspondiente Unidad de Medicina Familiar.

■ *Análisis de datos.* Se realizaron estadísticas descriptivas (frecuencias, promedio) y comparativas (prueba exacta de Fisher).

Resultados

■ *Aislamiento de S. pyogenes.* Durante la primera encuesta (tiempo 0), *S. pyogenes* se aisló en 10/95 (10 %) niños, en 1/22 (4 %) familiares y en ninguno de los 25 miembros del personal de la guardería. En 10 niños de cuatro salones diferentes se aislaron estreptococos de las clonas I, II, III, IV y VI. En el salón 1, una pareja de amigos compartió estreptococos de la clona III; otra pareja también de amigos tuvo estreptococos de la clona I y en otro niño se aisló un estreptococo de la clona IV. En el salón 2, una pareja de amigos compartió estreptococos de la clona II. En el salón 3, a un niño se le aisló estreptococo de la clona I y a otro de la clona VI. En el salón 4, a un solo niño se le aisló estreptococo de la clona II. Al padre de un niño del salón 1 en quien se aisló un estreptococo clona III, se le aisló un estreptococo de la clona VII. Dos

hermanos ubicados en los salones 1 y 4 fueron portadores de estreptococos de las clonas I y II, respectivamente (cuadro I, figura 1).

En la segunda encuesta (a los cuatro meses), *S. pyogenes* se aisló en 4/97 (4 %) de los niños, en ninguno de los 22 familiares y en ninguno de los 26 miembros del personal de la guardería. Las cuatro cepas aisladas de los niños fueron de clonas distintas (I y V). La clona I se aisló de dos niños de la sala 3, mientras que la clona V se aisló en dos niños de la sala 1.

Durante la última encuesta (siete meses) se identificaron cuatro cepas de estreptococos genéticamente diferentes (II, III y VII). En dos niños se aislaron estreptococos de las clonas II y VII y pertenecían a las salas 4 y 1, respectivamente. Una hermana (que no asistía a la guardería) de un niño con el estreptococo de la clona II de la sala 4, también se le aisló uno de la clona II. Un adulto del personal era portador de un estreptococo III no relacionado al de los niños (cuadro I).

■ *Identificación de portadores de S. pyogenes.* No hubo diferencias significativas en el aislamiento de estreptococos en niños con y sin síntomas de

Mayra Guadalupe Quiñonez-Alvarado et al. Diseminación de S. pyogenes en una guardería

Cuadro I
EβHGA y clonas aisladas en niños y personal de una guardería, así como familiares de niños con cultivo positivo en tres momentos

	Tiempo cero				Cuatro meses				Siete meses			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Niños												
Prevalencia de EβHGA	10/95 (10 %) Salón				4/97 (4 %) Salón				2/114 (2 %) Salón			
Clonas de EβHGA	III+, III I*, I, IV	II, II	I, VI	II*	V, V	I, I			VII			II†
Personal												
Prevalencia de EβHGA	0/25 (0 %) Salón				0/26 (0 %) Salón				1/22 (4 %) Salón			
Clonas de EβHGA												III‡
Familiares												
Prevalencia de EβHGA	1/22 (4 %) Salón				0/22 (0 %) Salón				1/7 (14 %) Salón			
Clonas de EβHGA	VII+‡											II†, ‡

*, † = hermanos,

‡ = salón de referencia del familiar del niño con aislamiento del EβHGA o sitio de trabajo del personal en contacto con los niños

IAVRS (prueba exacta de Fisher, $p = 0.52$), por lo que fueron considerados portadores faríngeos.

Discusión

La prevalencia de portadores de *S. pyogenes* encontrada tanto en los niños como en los familiares fue similar a la señalada en otros estudios de grupos de edad similares.^{24,25} La disminución progresiva en la prevalencia de aislamiento de *S. pyogenes* durante las tres encuestas microbiológicas podría estar relacionada con el tratamiento antimicrobiano que recibieron aquellos con cultivo positivo.

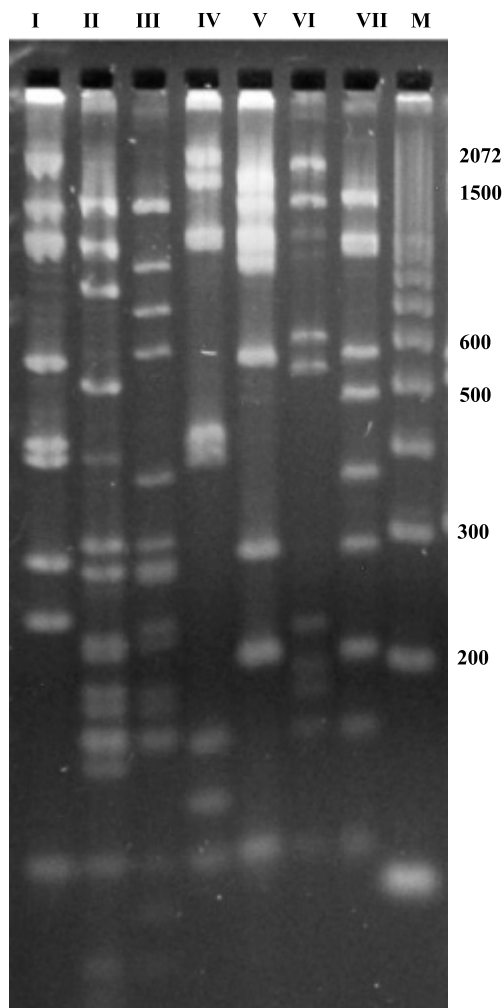


Figura 1. Patrón de RFLP del regulón Vir de las siete clonas de E β HGA identificadas en las tres encuestas realizadas. Con números romanos (I-VII) las clonas identificadas y con M, el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb)

La evaluación genética de las cepas aisladas de *S. pyogenes* permitió evidenciar que aunque hubo varios niños con aislamiento simultáneo de cepas del mismo género y especie (*Streptococcus pyogenes*), éstas mostraron heterogeneidad genética importante. Ésta parece ser una característica de las cepas aisladas de portadores.²⁶

Respecto a la diseminación de cepas genéticamente relacionadas entre los familiares y el personal de la guardería, en las tres encuestas pudimos constatar que con excepción del aislamiento de estreptococo en la hermana de un niño atendido en la misma, el resto de familiares adultos y de los trabajadores de la guardería en los que se aisló alguna cepa de estreptococo, ésta no tuvo relación genética con las aisladas simultáneamente en los niños. Esto evidencia que en el presente estudio, la transmisión de los estreptococos de niños portadores hacia los miembros adultos de la familia y trabajadores de la guardería es un fenómeno poco probable.

Por el contrario, entre los niños pudimos observar que el fenómeno de compartir cepas de estreptococo genéticamente relacionadas no fue amplia o aleatoria, sino dependiente del grado de cercanía (física y de frecuencia de interacción), característica de los amigos que compartían alimentos, juguetes y bebidas. Esto sugiere que la transmisión de cepas de *S. pyogenes* en portadores sanos requiere un contacto estrecho y continuado entre pares.²⁷

Una aplicación práctica de nuestros resultados es que permite mostrar lo infundado del temor de los padres que atribuyen al personal de las guarderías las constantes infecciones de vías respiratorias que padecen sus hijos. Además, y conociendo que el estado de portador nasofaríngeo de clonas virulentas de *S. pyogenes* en niños de guarderías es el precedente en el desarrollo de brotes de enfermedad local (faringoamigdalitis) o invasiva (síndrome de choque tóxico, fascitis necrotizante),²⁸ los resultados del presente estudio podrían anticipar que los “amigos cercanos” de algún niño con infección estreptocócica son los sujetos “blanco” para la toma racional de cultivos nasofaríngeos o el manejo con antimicrobianos de los mismos. Aunque no existe una recomendación definitiva para su uso con la finalidad de erradicar el estado de portador nasofaríngeo en niños atendidos en guarderías en contacto con un caso de infección invasiva por estreptococo, el consenso es respetar la decisión del médico tratante.²⁹

Una posible limitante de nuestro estudio es que con la metodología utilizada para identificar clonas de *S. pyogenes* no pudimos establecer genotipos (fuera del objetivo del estudio).

Conclusiones

La prevalencia de aislamiento de *S. pyogenes* en niños de guardería fue similar a otros estudios realizados en poblaciones con edades similares. Cuando la hubo, la diseminación de cepas genéticamente relacionadas entre los niños ocurrió entre amigos cercanos, mientras que no fue el caso para otros miembros adultos de la familia o los trabajadores de la guardería. Nuestros resultados podrían aplicarse para una rápida identificación y manejo oportuno de los “contactos” de casos con infección estreptocócica localizada o invasiva.

Agradecimientos

Nuestro reconocimiento al trabajo realizado por la química farmacobióloga Lilia Asenett Fernández Velasco en la toma de muestras, la identificación microbiológica y seguimiento de los pacientes del presente estudio.

Referencias

1. Stevens DL. Group A beta-hemolytic streptococci: virulence factors, pathogenesis, and spectrum of clinical infections. En: Stevens DL, Kaplan EL, editors. Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis. New York, NY: Oxford University Press; 2000. p. 19-36.
2. Yagupsky P, Landau D, Beck A, Dagan R. Carriage of *Streptococcus pyogenes* among infants and toddlers attending day-care facilities in closed communities in Southern Israel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14(1):54-58.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of invasive group A *Streptococcus* associated with varicella in a childcare center-Boston, Massachusetts, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46(40):944-948.
4. Saxén H, Muotiala A, Rostila T, Vuopio-Varkila J. Outbreak of perianal *Streptococcus pyogenes* infection in a day-care center. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16(2):247-249.
5. Hsueh PR, Teng LJ, Lee PI, Yang PC, Huang LM, Chang SC, et al. Outbreak of scarlet fever at a hospital day care centre: analysis of strain relatedness with phenotypic and genotypic characteristics. *J Hosp Infect* 1997;36(3):191-200.
6. Smith TD, Wilkinson V, Kaplan EL. Group A streptococcus associated upper respiratory tract infections in a day-care center. *Pediatrics* 1989; 83(3):380-384.

7. Engelgau MM, Woernle CH, Schwartz B, Vance NJ, Horan JM. Invasive group A streptococcus carriage in a child care centre after a fatal case. *Arch Dis Child* 1994;71(4):318-322.
8. Ichiyama S, Nakashima K, Shimokata K, Ohta M, Shimizu Y, Ooe K, et al. Transmission of *Streptococcus pyogenes* causing toxic shock-like syndrome among family members and confirmation by DNA macrorestriction analysis. *J Infect Dis* 1997; 175(3):723-726.
9. Gamba MA, Martinelli M, Schaad HJ, Streuli RA, DiPersio J, Matter L, et al. Familial transmission of a serious disease producing group A streptococcus clone: case reports and review. *Clin Infect Dis* 1997; 24(6):1118-1121.
10. Perry RF, Maher MT. Management of pharyngeal carriers of group A streptococcal organisms. *JAMA* 1997;277(15):1203-1204.
11. Krause RM, Rammelkamp CH Jr. Studies of the carrier state following infection with group A streptococci. II. Infectivity of streptococci isolated during acute pharyngitis and during the carrier state. *J Clin Invest* 1962;41:575-578.
12. Hamburger MG, Hamburger VJ. The problem of the dangerous carrier of hemolytic streptococci II. Spread of infection by individuals with strongly positive nose cultures who expelled large numbers of hemolytic streptococci. *J Infect Dis* 1945; 77:68-81.
13. Kaplan EL. The group A streptococcal upper respiratory tract carrier state: an enigma. *J Pediatr* 1980; 97(3):337-345.
14. Gardiner DL, Goodfellow AM, Martin DR, Sriprakash KS. Group A streptococcal Vir types are M-protein gene (emm) sequence type specific. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):902-907.
15. Gardiner DL, Sriprakash KS. Molecular epidemiology of impetiginous group A streptococcal infections in aboriginal communities of Northern Australia. *J Clin Microbiol* 1996;34(6):1448-1452.
16. Podbielski A, Flosdorff A, Weber-Heynemann J. The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes. *Infect Immunol* 1995;63(1):9-20.
17. Hong K. Characterization of group A streptococcal strains Sv and Su: determination of emm gene typing and presence of small Vir regulon. *Res Microbiol* 2000;151(1):29-36.
18. Surdeanu M, Shundi L, Straut M. Molecular subtyping of group A streptococcal strains based on virulence regulon polymorphism. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2000;59(1-2):89-102.
19. Johnson DR, Kaplan EL, Sramek J, Bicova R, Havlickova H, Motlova J. Specimen collection and

Mayra Guadalupe Quiñonez-Alvarado et al. Diseminación de *S. pyogenes* en una guardería

- transportation. En: Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections. Minneapolis, MN, USA: World Health Organization; 1996. p. 4-10.
20. Johnson DR, Kaplan EL, Sramek J, Bicova R, Havricek, J, Havlickova H, et al. Culture, recognition and storage. En: Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections. Minneapolis, MN, USA: World Health Organization; 1996. p. 11-22.
 21. Gardiner D, Hartas J, Currie B, Mathews JD, Kemp DJ, Sriprakash KS. Vir typing: a long-PCR typing method for group A streptococci. PCR Methods Appl 1995;4(5):288-293.
 22. Hartas J, Hibble M, Sriprakash KS. Simplification of a locus-specific DNA typing method (Vir typing) for *Streptococcus pyogenes*. J Clin Microbiol 1998; 36(5):1428-1429.
 23. Chassy BM. A gentle method for the lysis of oral streptococci. Biochem Biophys Res Commun 1976;68(2):603-608.
 24. Pichichero ME, Marsocci SM, Murphy ML, Hoeger W, Green JL, Sorrento A. Incidence of streptococcal carriers in private pediatric practice. Arch Pediatr Adolesc Med 1999;153(6):624-628.
 25. Yagupsky P, Landau D, Beck A, Dagan R. Carriage of *Streptococcus pyogenes* among infants and toddlers attending day-care facilities in closed communities in Southern Israel. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14(1):54-58.
 26. Nguyen L, Levy D, Ferroni A, Gehanno P, Berche P. Molecular epidemiology of *Streptococcus pyogenes* in an area where acute pharyngotonsillitis is endemic. J Clin Microbiol 1997;35(8): 2111- 2114.
 27. Villaseñor-Sierra A, Quiñonez-Alvarado MG, Caballero-Hoyos JR. Interpersonal relationships and group A streptococcus spread in a Mexican day-care center. Salud Publica Mex 2007;49(5): 323-329.
 28. Cockerill FR 3rd, MacDonald KL, Thompson RL, Roberson F, Kohner PC, Besser-Wiek J, et al. An outbreak of invasive group A streptococcal disease associated with high carriage rates of the invasive clone among school-aged children. JAMA 1997;277(1):38-43.
 29. The Working Group on Prevention of Invasive Group A Streptococcal Infections. Prevention of invasive group A streptococcal disease among household contacts of case-patients: is prophylaxis warranted? JAMA 1998;279(15):1206-1210.