

Portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina entre niños cubanos que asisten a círculos infantiles

Gilda Toraño, Dianelys Quiñones, Ibis Hernández, Tatiana Hernández, Isis Tamargo y Susana Borroto

Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas. Instituto Pedro Kourí. Ciudad de la Habana, Cuba.

FUNDAMENTO. Recientes pero escasos informes de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM) entre niños no expuestos a los factores de riesgos asociados con su adquisición, nos indujeron a investigar su circulación en la comunidad.

PACIENTES Y MÉTODOS. Durante los meses de septiembre y octubre de 1997 se tomaron exudados nasales y faríngeos a 358 niños menores de 5 años, atendidos en tres círculos infantiles del municipio Marianao de la Ciudad de La Habana, Cuba. Las cepas de *S. aureus* aisladas fueron caracterizadas por susceptibilidad a antimicrobianos utilizando el método de Kirby-Bauer. Se confirmó la resistencia a la meticilina a través del método "Oxacillin Salt-Agar Screening-Plate" recomendado por el Comité Nacional de Procedimientos Estándar del Laboratorio Clínico.

RESULTADOS. El 18,7% de los niños portaban cepas de *S. aureus* en el tracto respiratorio superior. En el 2,2% eran cepas de SARM. Los índices más altos de resistencia se revelaron para la eritromicina (50,7%) y tetraciclina (29,9%). Todas las cepas fueron susceptibles a la ciprofloxacina.

CONCLUSIONES. Nuestros resultados proporcionan evidencias sobre el aislamiento de cepas de SARM entre niños sanos atendidos en círculos infantiles, e indican la posibilidad de que éstas se establezcan y diseminen de forma acelerada en la comunidad.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, portadores nasales.

Nasal carriers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Cuban children attending day-care centers

BACKGROUND. Recent but scarce reports of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) among children without risk factors associated with its acquisition prompted us to investigate its presence in the community.

PATIENTS AND METHODS. During the September and October months in 1997, nasal and pharyngeal swabs were obtained from 358 children aged less than five years who attended three day-care centers in the Marianao Area, La Habana City, Cuba. The isolated *S. aureus* strains were characterized for antimicrobial sensitivity using the Kirby-Bauer method. Methicillin resistance was confirmed by the "Oxacillin Salt-Agar Screening-Plate" method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

RESULTS. 18.7% of children were carriers of *S. aureus* in the upper respiratory tract; 2.2% of children carried MRSA strains. The highest resistance levels corresponded to erythromycin (50.74%) and tetracycline (29.9%). All tested strains were sensitive to ciprofloxacin.

CONCLUSIONS. Our results provide evidence on the recovery of MRSA strains among healthy children attending day-care centers and are suggestive of a rapid colonization and spread of these microorganisms in the community.

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, nasal carriers.

Introducción

Durante los últimos 20 años las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM) han emergido como importantes patógenos, principalmente en infecciones nosocomiales. Los factores de riesgo que se asocian con este tipo de cepas incluyen las hospitalizaciones prolongadas, las intervenciones quirúrgicas, la permanencia en Unidades de Cuidados Intensivos, el uso irracional de antibióticos y la proximidad a personal médico u otros pacientes colonizados o infectados por cepas de SARM, pues los portadores nasales son reconocidos como un elemento esencial en la epidemiología de las infecciones estafilocócicas¹⁻⁴.

Los informes de cepas de SARM adquiridas en la comunidad son menos frecuentes y se describen fundamental-

Correspondencia: MSc G. Toraño.
Instituto Pedro Kourí.
Autopista Novia del Mediodía km 6 1/2 Apartado 601.
Marianao 13, Ciudad de la Habana, Cuba.
Correo electrónico: gilda@ipk.sld.cu

Manuscrito recibido el 20-3-2001; aceptado el 13-6-2001.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 367-370

mente en epidemias originadas entre individuos consumidores de drogas intravenosas u otras sustancias por vía parenteral⁵. Investigaciones recientes muestran un incremento en la proporción de adultos y pacientes pediátricos, quienes no han tenido contacto previo con instituciones de salud y sufren, sin embargo, infecciones debidas a SARM^{6,7}. Los hallazgos de cepas de este tipo, fundamentalmente entre niños no expuestos a los factores antes mencionados, han originado importantes polémicas porque difieren sustancialmente del conocimiento adquirido hasta el momento sobre su comportamiento epidemiológico y microbiológico².

El objetivo del presente estudio fue investigar, por vez primera en Cuba, la circulación de cepas resistentes a la metilina entre los portadores nasofaríngeos de *S. aureus*. Nos propusimos además conocer la tasa de portadores nasofaríngeos de *S. aureus* en niños menores de 5 años de edad atendidos en círculos infantiles, así como su distribución por grupos de edades, la relación con síntomas respiratorios sugestivos de una infección vírica en el momento de la toma de muestra, y la influencia del exudado nasal y faríngeo en el aislamiento de este microorganismo a partir del tracto respiratorio superior (TRS).

Materiales y métodos

Durante los meses de septiembre y octubre de 1997 se tomaron exudados nasales y faríngeos a 358 niños entre 2 y 5 años de edad, procedentes de tres círculos infantiles del municipio Marianao de Ciudad de La Habana, Cuba. A todos los niños incluidos en el estudio se les tomaron ambos tipos de exudados. Se efectuó una encuesta en el momento de la toma de las muestras para conocer sobre antecedentes de neumonía, otitis media aguda u otras infecciones respiratorias, y tratamiento con antibióticos en los últimos 6 y 3 meses respectivamente.

Para el aislamiento de *S. aureus* se utilizaron placas de agar sangre de carnero al 5% y la incubación se realizó a 37 °C durante 24 horas. Se consideraron cultivos positivos aquéllos en los que al menos pudo observarse una colonia sugerente de *S. aureus* en algún cuadrante de la placa de cultivo. La identificación de cada aislamiento se llevó a cabo por las características del cultivo, coloración de Gram, prueba de la catalasa y prueba de la coagulasa en tubo, según lo recomendado por el Manual de Microbiología Clínica de la Sociedad Americana de Microbiología⁸. Como método complementario se utilizó la aglutinación al látex (Staphaurex-Wellcogen). Las cepas fueron conservadas a -70°C en caldo tripton-soya (Oxoid) con glicerol al 15%.

La susceptibilidad a los antimicrobianos se determinó por el método de difusión en discos o Kirby-Bauer, utilizando los procedimientos descritos por el Comité Nacional para Procedimientos Estándar del Laboratorio Clínico (NCCLS)⁹. La selección de los antibióticos (oxacilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, eritromicina y ciprofloxacina) se basó en las recomendaciones de este mismo documento.

Las cepas que desarrollaron zonas de inhibición del crecimiento ≥ 10 mm alrededor del disco de oxacilina fueron consideradas presuntamente SARM⁹, pero la resistencia a la oxacilina fue confirmada aplicando el método "Oxacillin Salt-Agar Screening-Plate", empleando placas de agar Mueller-Hinton (Oxoid) suplementadas con NaCl (4%, 0,68 mol/l) y una concentración de oxacilina de 6 µg/ml¹⁰. Utilizamos como controles las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y ATCC 43300, la incubación de las placas se realizó a 35 °C durante 24 horas.

En el análisis estadístico se realizó un estudio de corte transversal y los resultados obtenidos fueron procesados estadísticamente aplicando la prueba del χ^2 .

Resultados

Del total de niños estudiados el 54,2% correspondió al sexo masculino y el 45,8% al sexo femenino. La edad media fue de 3 años y 3 meses y osciló en un rango entre 2 y 5 años. De ellos, 67 niños portaban *S. aureus* en el TRS, resultando una tasa de portador del 18,7%.

En la tabla 1 se observa el estado de portador según los grupos etarios. El porcentaje mayor de colonización se presenta entre los niños cuya edad oscila entre 4 y 5 años, lo cual fue estadísticamente significativo ($\chi^2 = 16,24$; $p < 0,05$).

La tabla 2 muestra la frecuencia de aislamiento de *S. aureus* según la técnica empleada para la obtención de la muestra del TRS (exudado nasal y exudado faríngeo). Con el exudado nasal se obtuvo una recuperación significativamente mayor (78,6%) de *S. aureus* ($\chi^2 = 45,71$; $p < 0,05$). El exudado faríngeo sólo permitió un 17,9% de aislamiento.

En 102 de los niños incluidos en el estudio (28,5%) se observó tos y rinorrea blanquecina (síntomas y signos sugestivos de una infección respiratoria vírica)¹¹ en el momento de la toma de la muestra, pero todos presentaban buen estado general. Sólo el 13,7% de estos niños portaban *S. aureus*, no existiendo asociación estadísticamente significativa ($\chi^2 = 2,33$; $p > 0,05$).

En la tabla 3 se resumen los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para los 67 aislamientos de *S. aureus* recuperados. Todas las cepas fueron susceptibles a la ciprofloxacina y los índices más altos de resistencia se revelaron para la eritromicina (50,7%), tetraciclina (29,9%) y oxacilina (20,9%). Este último valor significa que 14 niños colonizados por *S. aureus* portaban cepas de SARM, detectadas por el método de difusión en disco, lo que se corresponde con 14 cepas aisladas en todos los casos a partir de exudados nasales. Sin embargo, con el empleo del método "Oxacillin Salt-Agar Screening-Plate" determinamos que 8 de estas cepas toleraron una concentración mínima inhibitoria (CMI) = 6 µg/ml de oxacilina, lo que represen-

TABLA 1. Estado de portador de *Staphylococcus aureus* según grupos etarios, en los 358 niños incluidos en el estudio

Microorganismo	Aislamientos por grupos etarios									
	2 años-<3 años N=80		3 años-<4 años N=118		4 años-<5 años N=144		5 años N=16		Total de niños 358	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>S. aureus</i>	6	7,5%	17	14,4%	40	27,7%	4	25,0%	67	18,7%

$\chi^2 = 16,24$; $p < 0,05$.

TABLA 2. Distribución de cepas de *Staphylococcus aureus* según la procedencia de la muestra

Microorganismo	Exudado nasal		Exudado faríngeo		Total de cepas
	Nº	%	Nº	%	
<i>S. aureus</i>	55	78,6	12	17,9	67

$\chi^2=45,71$; $p<0,05$.

ta un 11,9% de colonización por SARM entre los niños que portaban cepas de *S. aureus* (67 niños), pero sólo un 2,2% de niños colonizados por SARM en el grupo total incluido en nuestro estudio (358 niños). Nos parece importante destacar que todas las cepas definidas como resistentes a la oxacilina, lo fueron también para la eritromicina y tetraciclina.

Discusión

La colonización de la mucosa nasal humana por *S. aureus* establece un estado de portador que predispone subsecuentemente a una infección⁹. Internacionalmente se conoce muy poco sobre la circulación de este agente entre niños sanos que asisten a círculos infantiles, instituciones cerradas donde se establece un contacto estrecho entre los niños, entre éstos y sus educadoras, y posteriormente con los miembros de sus familias. Nuestra investigación es la primera de este tipo que se realiza en Cuba.

En el 15%-44% de la población general se describe colonización nasal por *S. aureus*, pero la prevalencia de portadores varía ampliamente en correspondencia con la población estudiada. Las tasas más altas de portadores se han encontrado en neonatos, pacientes hemodializados, diabéticos, pacientes con sida, pacientes hospitalizados y en aquellos que usan drogas por vía parenteral¹⁻⁴. Esto puede justificar el bajo porcentaje de colonización encontrado por nosotros (18,7%) pues los niños incluidos en el estudio no estaban expuestos a los factores de riesgo antes mencionados.

El uso de antibióticos es también considerado como un factor de riesgo para la colonización de la cavidad nasal por *S. aureus*³, en nuestro estudio sólo el 1,8% de los niños recibió tratamiento en los 3 meses precedentes a la toma de la muestra.

TABLA 3. Resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por el método de Kirby-Bauer, para las 67 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de los exudados nasales y faríngeos realizados a niños cubanos sanos

Antimicrobiano	Número de cepas resistentes	Resistencia %
Oxacilina	14*	20,9
Trimetoprin-sulfametoxazol	6	9,0
Tetraciclina	20	29,9
Cloranfenicol	7	10,4
Gentamicina	4	6,0
Eritromicina	34	50,7
Ciprofloxacina	—	—

*Todas las cepas resistentes a oxacilina lo fueron también para eritromicina y tetraciclina. Las cifras en negra resaltan los porcentajes de resistencia para observados para oxacilina, tetraciclina y eritromicina.

Según los grupos etarios establecidos en nuestro estudio la tasa más alta de portador se encontró en niños comprendidos entre 4 y 5 años de edad. No sabemos de otras investigaciones que relacionen la colonización del TRS por *S. aureus* con diferentes grupos de edades, pero teniendo en cuenta que la colonización del TRS por *S. aureus* puede ser persistente en el 20%-35% de los individuos, con una duración de varios meses a años portando la misma cepa¹², no podemos plantear que la edad de 4-5 años constituya un factor de riesgo para el estado de portador por dicho agente.

El exudado nasal permitió una mayor recuperación de *S. aureus* que el exudado faríngeo, lo que está estrechamente relacionado con la habilidad de esta bacteria de adherirse más a la cavidad nasal, la cual constituye su nicho ecológico fundamental^{13,14}. Bibel et al proponen que *S. aureus* se une a las células epiteliales nasales a través del ácido teicoico el cual funciona como una adhesina¹⁵. Otras sustancias presentes en el tracto respiratorio constituyen también potenciales ligandos para *S. aureus*: IgA secretoria y glucolípidos^{16,17}.

Como es bien conocido las infecciones víricas del TRS predisponen a una infección bacteriana al favorecer la colonización del mismo por dichas bacterias¹⁸. Experimentos *in vitro* han demostrado que el virus de la influenza incrementa la adhesión de *S. aureus* al TRS¹⁷. En nuestra investigación, el grupo de niños con síntomas y signos sugestivos de infección vírica fue menos propenso a portar *S. aureus*, lo que puede estar relacionado con una baja circulación del virus de influenza en el período de estudio. Durante 1997 en Cuba se produjo la mayor circulación de este virus en los meses de verano (marzo-julio), con un pico máximo en junio, y la población adulta entre 25-59 años resultó la más afectada¹⁹.

Por otra parte, la resistencia encontrada para la eritromicina y tetraciclina es en nuestra opinión preocupante, sobre todo porque los aislamientos fueron obtenidos de portadores sanos, y porque las cepas que resultaron resistentes a ambos antibióticos lo fueron también para la oxacilina. Estos antimicrobianos se cuentan entre los más utilizados para el tratamiento de las infecciones estafilocócicas, y por consiguiente entre los recomendados para su monitorización por el NCCLS⁹. Ha sido ya demostrado por otros autores que las cepas de SARM aisladas de infecciones hospitalarias se comportan como multirresistentes, manifestando en su mayoría sólo sensibilidad para la vancomicina y para alguno de los otros antibióticos ensayados^{2, 20-22}. Es realmente alarmante que las cepas de SARM aisladas en la comunidad manifiesten patrones de multirresistencia frente a los antimicrobianos, como sucede en nuestro caso.

La demostración de la circulación de cepas de SARM entre niños no expuestos a los factores de riesgo asociados a su adquisición fue observada anteriormente por Herold et al, durante una investigación realizada en el hospital pediátrico de la universidad de Chicago²². Sus hallazgos fueron cuestionados por Boyce² con un llamamiento a la reflexión sobre los términos *infecciones nosocomiales* e *infecciones adquiridas* en la comunidad, pues en dicho estudio las cepas fueron obtenidas de exudados realizados a niños recientemente ingresados en el hospital por diversas causas. En nuestro trabajo las cepas de SARM fueron recuperadas de niños sanos a quienes visi-

tamos en sus propios círculos infantiles, por lo que, sin lugar a dudas, podemos aseverar que proceden de la comunidad.

Una investigación similar a la nuestra llevada a cabo en Dallas demostró un 24% y 3% de colonización nasal por SARM entre los niños atendidos en dos círculos infantiles que incluyeron en su estudio⁷. El porcentaje de colonización obtenido por nosotros (2,2%) y el demostrado por estos autores se encuentran en el mismo rango del observado para estudios realizados en unidades hospitalarias (8%-23%)^{23,24}. Aunque sólo investigamos un grupo relativamente pequeño de portadores nasofaríngeos, nuestros resultados se suman a las evidencias que comienzan a señalar a SARM como un patógeno también importante en el ambiente extrahospitalario, con transmisión entre niños sanos que asisten a círculos infantiles, los cuales pueden contribuir a su diseminación en la comunidad²⁵.

Según experiencias en adultos que adquirieron el estado de portador de cepas de SARM mientras estuvieron hospitalizados en una primera oportunidad, y que en el momento de su rehospitalización estaban colonizados por la misma cepa, se conoce que el tiempo de duración de éstas en la nasofaringe puede ser de hasta de 3,5 años²⁶. En niños se sabe que entre un 13%-53% permanecen como portadores de este tipo de cepas tras una hospitalización, y que una proporción de ellos desarrolla colonización nasal y/o faríngea, hasta 1 año después de su estancia en el hospital²². De acuerdo con este conocimiento nuestros resultados podrían ser explicados de dos formas no excluyentes:

1. Las cepas de SARM aisladas pueden haber sido transferidas a los niños por familiares u otros adultos relacionados con su atención, quienes a su vez pueden haber padecido infecciones por este tipo de cepas, haber estado hospitalizados, o sencillamente ser trabajadores de salud pública quienes a su vez estuvieron en contacto con pacientes portadores de SARM⁷ (elementos que no se consideraron en la encuesta realizada).

2. Existen otros factores de riesgo hasta ahora no descritos, para cuyo reconocimiento será necesaria la realización de un estudio más amplio en la comunidad, dirigido a determinar la prevalencia de portadores nasofaríngeos de *S. aureus* y a la búsqueda de SARM. La alarmante demostración de la circulación de este tipo de cepas entre niños sanos así lo exige.

Nuestros resultados sientan las bases para emprender estudios similares en otros círculos infantiles cubanos, y proporcionan evidencias acerca de la posibilidad de que cepas de SARM comienzan a circular y establecerse de forma importante en la comunidad (tal y como sucedió en la década de los 50 con las cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina²⁷), señalando así la necesidad de establecer estrategias de control para prevenir su diseminación.

Bibliografía

- Boyce J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: detection, epidemiology, and control measures. *Infect Dis Clin North Am* 1989; 3: 901-913.

- Boyce J. Are the epidemiology and microbiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* changing? *JAMA* 1998; 279: 623-624.
- Nur Y, Vandenberg M, Yusuf M, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal Carriage of Multiresistant *Staphylococcus aureus* Among Health Care Workers and Pediatric Patient in Two Hospitals in Mogadishu, Somalia. *J Infect Dis* 1997; 1: 186-191.
- Casewell M, Hell R. The Carrier State: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18 Suppl A: 1-12.
- Craven D, Rixigen A, Goularte T, McCabe W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia linked to intravenous drug abusers using gallery. *Am J Med* 1986; 80: 770-776.
- Layton M, Hierholzer W, Patterson J. The evolving epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 12-17.
- Adcock P, Pastor P, Medley F, Patterson J, Murphy T. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in two Child Care Centers. *J Infect Dis* 1998; 178: 577-580.
- Kloos W, Barreman T. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R, ed. *Manual of Clinical Microbiology* (6th ed). Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999; 282-298.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial disk Susceptibility Test. NCCLS Document M2-A7. Villanova, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. NCCLS Document M7-A5. Villanova, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
- Hernández H. Resfriado común. En: Benguini Y, López A, Schmunis G, Yunes G, eds. *Infecciones respiratorias en niños*. Washington, DC: OPS, 1997; 167-180.
- Shuter J, Hatcher V, Lowy F. *Staphylococcus aureus* Binding to Human Nasal Mucin. *Infect Immun* 1996; Jan: 310-318.
- Casewell M. The Nose: an underestimated source of *Staphylococcus aureus* causing wound infection. *J Hosp Infect* 1998; 40: S3-S11.
- Hudson I. The Efficacy of Intranasal Mupirocin in The prevention of Staphylococcal Infections: a review of recent experience. *J Hosp Infect* 1994; 27: 81-98.
- Bibel D, Aly R, Shinefield H, Maibach H, Straus W. Importance of the Keratinized Epithelial Cell in Bacterial Adherence. *J Invest Dermatol* 1982; 79: 250-253.
- Biesbrok A, Reddy M, Levine M. Interaction of Salivary Mucin-Secretory Immunoglobulin A complex With Mucosal Pathogens. *Infect Immun* 1991; 59: 3.492-3.497.
- Krivan H, Roberts D, Ginsburg V. Many Pulmonary Pathogenic Bacteria Bind Specifically to The Carbohydrate Sequence Gal Nace1-4 Gal Found in Some Glycolipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6.157-6.161.
- Hakansson A, Kidd A, Wadell G, Sabharwal H, Svanborg C. Adenovirus Infection Enhances *In Vitro* Adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1994; 62(7): 2.707-2.714.
- Cancio R. Detección de virus Respiratorios en Ciudad de La Habana durante el período 1995-1997. Tesis para optar por el Título de Especialista de Primer Grado en Microbiología. Ciudad de la Habana, 1998.
- Coimbra M, Teixeira L, Ramos R, Predari S, Castellano L, Famiglietti A, et al. Spread of the Brazilian clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. *J Med Microbiol* 2000; 49: 187-192.
- Vardhan M, Agarwal D, Hunter P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Delhi teaching hospital. *J Hosp Infect* 2000; 46(2): 158-159.
- Herold B, Immuergluck L, Maranan M. Community-Acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Children with No Identified Predisposing Risk. *JAMA* 1998; 279: 623-624.
- Hsu C. Serial Survey of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Among Residents in a Nursing Home. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991; 12: 416-421.
- Bradley S, Terpenning M, Ramsey M. Methicillin resistant staphylococcus aureus: colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med* 1991; 115: 417-422.
- Holmes S, Morron A, Pic Kening L. Children care practices: effects of social change on the epidemiology of infections diseases and antibiotic resistance. *Epidemiol Rev* 1996; 18: 10-28.
- Sanford M, Widmen A, Bale M, Jones R, Weszel R. Efficient Detection and Long-term Persistence of the Carriage of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1994; 1.123-1.128.
- Barrett F, Mc Geher R, Finland M. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital: bacteriologic and epidemiologic observations. *N Engl J Med* 1968; 279: 441-448.