

Frecuencia de estreptococos betahemolíticos y títulos de antistreptolisina O en estudiantes del Estado Aragua, Venezuela.

Frequency of betahemolytic streptococci and antistreptolysin O titers in students from Aragua, Venezuela.

Rev. Salus.UC. 20(1):7-12.2016

María Chacón Herrera¹, Clara Gutiérrez¹, Luis Pérez-Ybarra^{1,2}, Anita Serino¹, Mellani Scotti¹.

RESUMEN

Para determinar la frecuencia de estreptococos betahemolíticos (EBH) y el valor referencial de los títulos de antistreptolisina O (ASTO) en estudiantes, con edades comprendidas entre 10 a 15 años del municipio Girardot, estado Aragua, se recolectaron hisopados faríngeos y muestras de sangre de 204 escolares. El hisopo se empleó para el cultivo bacteriológico y posterior identificación de los serogrupos de EBH. La sangre se utilizó para determinar los títulos de ASTO. Se estableció el nivel de referencia de ASTO siguiendo el protocolo C28 A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute. Se determinó la concordancia de los resultados de los títulos de la prueba de aglutinación con los resultados de los cultivos. 21,1% de los cultivos resultaron positivos (n=43). 37,20% de los aislados correspondieron a EBH del grupo B, 25,58% del grupo A, 23% del grupo G, 12% del grupo F y 2% del grupo C. El valor referencial de ASTO fue hasta 800 UI.mL⁻¹, valor que difiere del señalado por el equipo diagnóstico empleado. No se observó concordancia entre los resultados positivos del cultivo bacteriológico y los títulos de ASTO ($\kappa=0,0403$; $p=0,6061$), lo cual indica que ambas pruebas son discordantes y arrojan resultados diferentes.

Palabras claves: *Streptococcus pyogenes*, Estreptococos betahemolíticos; valor de referencia.

ABSTRACT

Throat swabs and blood samples were collected from 204 students to determine the frequency of betahemolytic streptococci (BHS) and ASO titers in students aged 10 to 15 years from the Girardot municipality in Aragua State. The swabs were used for bacterial culture and subsequent BHS serogroups identification. Blood samples were used to determine ASO titers. The ASO reference level was established following the C28 A3 protocol from Clinical and Laboratory Standards Institute. The concordance of the agglutination test titers results with the culture results was determined. 43 cultures were positive with a BHS frequency of 21.1%. 37.20% of the isolates were group B beta-hemolytic streptococci, 25.58% group A, 23% group G, 12% group F and 2% group C. The ASO reference value was up to 800 UI.mL⁻¹, which differs from the value indicated by the diagnostic equipment used. There is no agreement among the positive results of bacterial culture and ASO titers ($\kappa=0.0403$, $p=0.6061$), indicating that both tests are discordant and yield different results.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, betahemolytic streptococci, reference value.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pyogenes es el agente causal más frecuente de faringitis bacteriana. Otros grupos de estreptococos betahemolíticos (EBH), específicamente los del grupo B, C y G, han sido implicados en casos de faringitis esporádicas en niños y adultos (1).

La faringitis se desarrolla generalmente entre 2 a 4 días después de la exposición al patógeno, con inicio brusco de dolor de garganta, fiebre, malestar general y cefalea. A pesar de estos síntomas y signos clínicos, resulta difícil distinguir la faringitis estreptocócica de la faringitis viral (2).

El diagnóstico definitivo de la infección estreptocócica aguda puede hacerse mediante la demostración de la bacteria por medio de cultivo bacteriológico. A menudo no se puede establecer esta evidencia, ya sea porque se han utilizado antibióticos o porque la bacteria no se encuentra en la faringe, como sucede en los casos subagudos y crónicos, en las secuelas postestreptocócicas no supurativas (3).

Otra herramienta de la cual se dispone para el diagnóstico es la serología. El diagnóstico serológico de las infecciones por estos microorganismos está basado en la respuesta inmune contra los productos extracelulares del EBHGA (4). En este

¹ Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas "Dr. Carlos Palacios". Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias de la Salud, sede Aragua. Universidad de Carabobo. La Morita, Edo. Aragua. Venezuela.

² Departamento de Ciencias Básicas. Facultad de Ciencias de la Salud, sede Aragua. Universidad de Carabobo. La Morita, Edo. Aragua. Venezuela.

Autor de Correspondencia: Luis Pérez-Ybarra.

E-mail: imperez4@uc.edu.ve

Recibido: 01/07/15

Aprobado: 22/02/16

sentido, la determinación de los títulos de antiestreptolisina O (ASTO) es la prueba más utilizada en los laboratorios clínicos y de investigación, ya que este anticuerpo es fácil de cuantificar y de estandarizar y, además, ha sido mundialmente estudiado como respuesta a una infección estreptocócica en el humano y tiene una función utilitaria en el diagnóstico de fiebre reumática (5).

Más del 80% de aquellos pacientes con faringitis por estreptococo del grupo A tienen un título elevado de ASTO, y aquellos infectados con estreptococos betahemolíticos del grupo C y G (EBHGC, EBHGG) también pueden experimentar un aumento en los títulos de ASTO, debido a que los del grupo C elaboran una estreptolisina O idéntica al del grupo A, y los del grupo G, una semejante antigénicamente (1). Los títulos de ASTO aumentan 7 a 10 días después de la infección inicial por estreptococo beta hemolítico y alcanzan la máxima respuesta entre la tercera y la sexta semana. Los títulos de estos anticuerpos comienzan a declinar después de 6 a 8 meses en la mayor parte de infecciones no complicadas, pero pueden permanecer indefinidamente elevados en algunos individuos. El significado de esto no es bien comprendido, lo cual genera confusión entre los clínicos (6).

Los anticuerpos producidos frente a los estreptococos son capaces de desarrollar secuelas no supurativas postestreptocócicas, tales como la glomerulonefritis postestreptocócica, que puede aparecer luego de infecciones de la garganta o de la piel causada por cepas nefritógenas. Y también la fiebre reumática aguda (FRA), que sigue a infecciones de la garganta y con una tasa importante de morbilidad y mortalidad en países en desarrollo (7).

Un tratamiento efectivo contra la faringitis estreptocócica reduce el riesgo de sufrir fiebre reumática en un 90%, pero un 10% de los casos pueden permanecer como portadores asintomáticos (8, 9). La tasa de colonización varía con la edad, estación del año y ubicación geográfica, siendo los niños en edad escolar el grupo poblacional más importante en relación con el estado de portador asintomático, aunque esta condición también se ha encontrado en la población adulta (10). Los portadores asintomáticos no experimentan elevación de anticuerpos contra el estreptococo cuando se comparan con los títulos obtenidos en la fase convaleciente de la enfermedad (11).

En Venezuela, Hernández et al. (12), determinaron los títulos de ASTO y la frecuencia de EBH en 125 escolares sanos de dos instituciones educativas del municipio Francisco Linares Alcántara; reportando un aislamiento de EBH de 1,6%, aislando EBHGC y F en 0,8% cada uno. Asimismo, 88,8% de los niños presentaron títulos menores de 166 Unidades-Todd.mL-1 y 10,4% un título de 333 Unidades-Todd.mL-1, estableciendo este último como posible valor referencial para la población en estudio. Este difiere de lo señalado por los equipos diagnósticos utilizados en el país, que son instaurados en otros países y con muestras de adultos.

En Venezuela, no existen valores referenciales de ASTO propios para cada región y la determinación de los mismos se realiza mediante pruebas comerciales que son elaboradas y ensambladas en otros países, empleándose el valor referencial recomendado por el fabricante. Ha sido establecido en otra zona geográfica y generalmente en adultos, no quedando reflejada la población infantil ni adolescente. Por estas razones, el propósito de esta investigación fue determinar la frecuencia de estreptococos betahemolíticos y los títulos de ASTO en estudiantes con edades comprendidas entre 10 a 15 años residentes del municipio Girardot, Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una investigación de tipo descriptivo y de corte transversal durante los meses de febrero a junio 2013. La población estuvo constituida por 897 estudiantes inscritos en cinco instituciones, dos públicas y tres privadas, ubicadas en el municipio Girardot del estado Aragua, Venezuela. Para la determinación de los niveles de referencias de antiestreptolisina O en pacientes sanos se siguió el procedimiento del protocolo C28-A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute (13), el cual establece que dicha determinación se debe realizar con base en una muestra de al menos 120 individuos. En ese sentido, la muestra quedó constituida por 204 individuos del grupo etario de 10 a 15 años de edad, previniendo la aparición de datos extremos, para que de esta manera si estaban presentes poder descartarlos, garantizando que el tamaño de muestra de trabajo fuese siempre igual o mayor a 120 individuos. Se entendió por dato extremo aquel que se encuentra muy alejado de la mayoría de los valores en una muestra aleatoria. Sin embargo, en el siguiente estudio no aparecieron tales datos (14).

Para la selección de la muestra se utilizó un método de muestreo no probabilístico de tipo intencional, también conocido como muestreo a juicio u opinático (15); donde la selección de los elementos o individuos fue realizado con base a los siguientes criterios de inclusión: adolescentes con edades comprendidas entre 10 y 15 años, sin síntomas de infección faríngea actual, sin tratamiento actual con antibiótico, que no hayan recibido tratamiento con antimicrobiano en los últimos 15 días. Respetando las normas éticas concordantes con el Código de Ética para la Vida del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de la República Bolivariana de Venezuela (16), se solicitó el consentimiento informado de participación en la investigación a sus representantes legales con anterior notificación del propósito de la investigación. Previo a la ejecución del estudio, se obtuvo la aprobación del consentimiento informado por parte del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas (Biomed UC).

Para la identificación de los EBH y la determinación de los títulos de ASTO, a cada uno de los participantes del estudio

se le realizó un hisopado faríngeo y la extracción de una muestra de sangre por punción venosa sin anticoagulante.

El hisopado faríngeo se procesó de manera convencional, empleando un hisopo estéril el que se incubó en caldo (Todd Hewitt) a 35°C por 4 horas, luego se sembró en agar al 5% de sangre de carnero y se incubó a 35°C por 24 a 48 horas en ambiente de microaerofilia (5-10% de CO₂)(17). Se seleccionaron colonias betahemolíticas sospechosas y se realizó la coloración de Gram y la prueba de la catalasa (2). La identificación definitiva se efectuó mediante la prueba de aglutinación pasiva (indirecta) reversa, basada en la detección de antígenos polisacáridos de la pared celular correspondientes a los grupos A, B, C, D, F y G según las instrucciones del kit comercial (Oxoid Streptococcal Grouping Kit, USA).

Para la determinación de los títulos de ASTO mediante aglutinación (pasiva) indirecta, empleando el kit comercial Teco Diagnostics, cuya reacción se fundamenta en la interacción entre la estreptolisina O conjugada a las partículas de látex con los anticuerpos correspondientes contenidos en el suero, lo cual formó aglutinación, evidenciándose por la presencia de acúmulos visibles. Las muestras con resultados positivos en el procedimiento cualitativo, fueron diluidas 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64 con el buffer provisto en el kit. El título correspondió a la mayor dilución del suero que presentó aglutinación. La sensibilidad de la prueba es de 200 Unidades Internacionales.mL⁻¹, (UI.mL⁻¹), por lo que se multiplicó el inverso del título por la sensibilidad para estimar la concentración relativa.

Para el análisis de los resultados, se empleó la estadística descriptiva, construyéndose las distribuciones de frecuencias absolutas y relativas. La determinación de los valores referenciales se realizó calculando el título de ASTO correspondiente al percentil 95.

Para determinar la concordancia de los resultados de los títulos de la prueba de aglutinación con los resultados de los cultivos de exudado faríngeo, se construyó una tabla de contingencia (18) de dimensión 2x2 y se determinó el coeficiente κ (kappa) de Cohen, considerando que la concordancia es pobre $\kappa \leq 0,2$, débil $0,2 < \kappa \leq 0,4$, moderada $0,4 < \kappa \leq 0,6$, buena $0,6 < \kappa \leq 0,8$ y muy buena $0,8 < \kappa \leq 1$, construyéndose además los intervalos para κ al 95% de confianza (19).

Se aplicó la prueba exacta de Fisher (19) para verificar si la frecuencia de estudiantes con cultivo bacteriano positivo está relacionada con el tipo de escuela (pública o privada) o con el género (masculino o femenino). Los datos se procesaron utilizando el software estadístico Statxact 9.0 bajo ambiente de Windows.

RESULTADOS

La muestra estuvo constituida por 204 estudiantes con edades entre 10 y 15 años de edad. De ellos, 106

comprendieron estudiantes del género femenino (52%) y 98 pertenecieron al género masculino (48%). De la muestra estudiada, 96 (47%) eran estudiantes de colegios públicos y 108 (53%) de colegios privados.

La Tabla 1 muestra la distribución de los estudiantes de acuerdo a las edades y el género. El promedio general de las edades fue $12,5 \pm 1,5$ años. Asimismo, hubo un predominio de alumnos con 10 años ($n=79$; 38,9%) con respecto al total estudiantes incluidos en la investigación y, además, se evidencia un mayor porcentaje ($n=22$; 57,9%), ($n=13$; 56,5%), ($n=41$; 51,9%) del género femenino con 11, 12 y 10 años, respectivamente.

Tabla 1. Distribución de acuerdo a la edad y género de los escolares de 10 a 15 años participantes en el estudio, municipio Girardot, estado Aragua, 2013.

Edad (años)	10	11	12	13	14	15
F	41 (51,9%)	22 (57,9%)	13 (56,5%)	10 (45,5%)	13 (48,1%)	7 (46,7%)
M	38 (48,1%)	16 (42,1%)	10 (43,5%)	12 (54,5%)	14 (51,9%)	8 (53,3%)
Total	79	38	23	22	28	15

F=Femenino, M=Masculino

De los 204 exudados faríngeos, hubo un crecimiento de EBH en 43 de las muestras analizadas (21,1%). En la figura 1, se presenta la distribución de los EBH aislados en los alumnos de las diferentes instituciones objetos de estudio, donde se observó un predominio de EBH del grupo B (EBHGB, $n=16$; 37,20%), seguido del grupo A (EBHGA, $n=11$; 25,58%) y del grupo G (EBHGG, $n=10$; 23,25%).

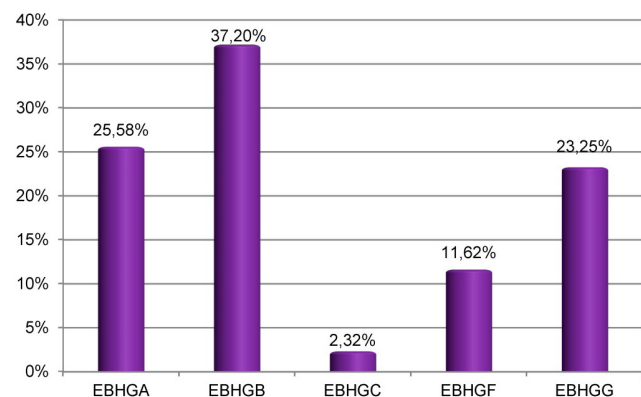


Figura 1. Distribución de estreptococos beta-hemolíticos aislados de los exudados faríngeos en estudiantes de 10 a 15 años de edad del municipio Girardot, estado Aragua.

La distribución porcentual de los títulos de antiestreptolisina O hallados mediante la prueba de aglutinación, reveló que la totalidad de los estudiantes examinados presentaron títulos iguales o menores a 800 UI.mL⁻¹, ver figura 2. Este título se corresponde con el percentil 95 y constituye el valor referencial obtenido mediante la aplicación de esta prueba.

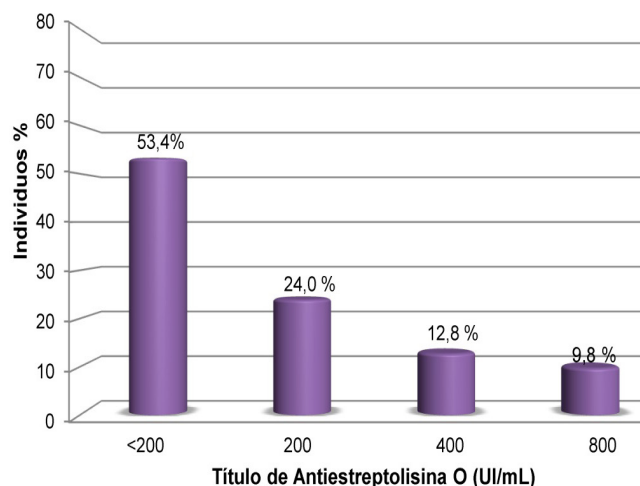


Figura 2. Distribución de títulos de antiestreptolisina O en estudiantes de 10 a 15 años de edad del municipio Girardot, estado Aragua.

La prueba de concordancia basada en el coeficiente kappa (κ) de Cohen mostró que no existe acuerdo o concordancia entre los resultados positivos del cultivo bacteriológico y los títulos de ASTO ($\kappa=0,0403$; $p=0,6061$), $IC(\kappa)95\% = (-0,0764; 0,1570)$, lo cual indica que ambas pruebas son discordantes y arrojan resultados diferentes. Los resultados de ambas pruebas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Prueba de concordancia entre los resultados positivos del cultivo bacteriológico y los títulos de ASTO.

Cultivo	Prueba de Aglutinación		Total
	Negativa	Positiva	
Negativos	88	73	161
Positivos	21	22	43
Total	109	95	204

$\kappa=0,0403$; $p=0,6061$; $IC(\kappa)95\% = (-0,0764; 0,1570)$.

En la tabla 3 se presentan los resultados de la prueba exacta de Fisher para las variables género y tipo de colegio y los resultados del cultivo bacteriano, adicionalmente se presentan las odds-ratio y los correspondientes intervalos al 95% de confianza, en la misma se observa que no se encontraron asociaciones significativas entre los resultados del cultivo y las variables género y tipo de colegio.

Tabla 3. Prueba exacta de Fisher para las variables género y tipo de colegio y los resultados del cultivo bacteriano.

Variable	N	Categoría base	OR	$IC[OR]_{95\%}$	p valor
Género	204	Femenino	0,9603	0,4632 – 1,9955	1,0000 ^{NS}
Colegio	204	Público	0,8119	0,3909 – 1,6852	0,6073 ^{NS}

Nota: (*) Asociación significativa al 5%. (NS) Asociación no significativa al 5%. Se indica la categoría base. Las asociaciones significativas se refieren a la categoría base y a un resultado positivo en el cultivo bacteriano.

DISCUSIÓN

Al procesar los 204 exudados faríngeos se obtuvo una frecuencia de 21,1% de portadores asintomáticos de estos microorganismos. El resultado obtenido superó al reportado previamente en Venezuela (9,4%) (20). Inferior a la reportada en Argentina (26%) (21) y similar a la descrita en Cádiz (21,3%) (22); mayor a la notificada en Colombia (23), Cuba (24) y la India (10), 19,8%, 17,3% y 7,7% respectivamente.

El 25,58% del total de los aislados corresponden a *Streptococcus pyogenes* o EBHGA. La frecuencia de colonización encontrada es superior a la reportada por investigadores de otras latitudes, quienes indican un aislamiento de EBHGA en individuos sanos entre 6 a 18% (22,25). En Venezuela, la frecuencia de EBHGA reportada es de 11%; valor inferior al obtenido en esta investigación (20).

El estreptococo del grupo B representó el grupo más aislado con un porcentaje de 37,20%. Valor que superó al obtenido por Gutiérrez et al. (20), quienes reportaron un 26% de aislamientos de EBHGB en escolares de 10 a 15 años. La frecuencia de EBHGB obtenida en esta investigación es mayor a la reportada en otras regiones, en donde el aislamiento es escaso, así tenemos frecuencias en España de un 5,9% de aislamiento (22), siendo aún menor en la India con un 3,8% (10). El EBHGB es el primer agente causal de sepsis y meningitis neonatal precoz, así como también de infecciones puerperales, sin embargo, esta bacteria puede colonizar las vías respiratorias altas y causar faringitis en niños y adultos (26).

Es conocido desde hace varios años la implicación del estreptococo beta-hemolítico del grupo C en casos de faringitis estreptocócica (27), por lo que su aislamiento en portadores asintomáticos reviste gran importancia clínica. En Venezuela, los últimos trabajos refieren una frecuencia que oscila entre 0,8% y 5% (12, 20). En el presente estudio se obtuvo un 2% de recuperación de EBHGC, resultado similar al descrito anteriormente. Valores superiores fueron reportados en España y en la India con aislamientos de 14,71% y 18,3% respectivamente (22, 28).

El estreptococo beta-hemolítico del grupo F se aisló en un 12% de los exudados, porcentaje similar al reportado por Gutiérrez et al. (20); por el contrario, el estudio realizado en la India, superó a lo obtenido en esta investigación con un porcentaje de aislamiento de EBHGF de 53,8% (10). EBHGF ha sido implicado en un caso de otomastoiditis crónica colestomatosa, patología comúnmente originada por bacterias Gram negativas y anaeróbicas (29).

Respecto al EBHGG, el porcentaje de aislamiento obtenido en la presente investigación, se ubicó en 23%, un porcentaje similar al reportado en la India (19,8%) (10), y menor al descrito en Cuba 49% (24). Esta bacteria fue considerada por muchos años como no patógena o flora normal de los

humanos, pero ya se ha implicado en casos de faringitis en niños y adultos como también en otros procesos infecciosos de piel y tejidos blandos, lo que le suma gran importancia desde el punto de vista clínico (30).

La frecuencia de portación de EBH varía dependiendo de la edad, estación climática, ubicación geográfica y prevalencia de infecciones estreptocócicas (24). La identificación de portadores sanos de EBH puede ser de utilidad al detectar y tratar a estos portadores, reduciendo la diseminación de los EBH; disminuyendo así la frecuencia de infección faríngea en la comunidad.

Al analizar las 204 muestras de sueros, el resultado de los títulos de ASTO por el método de aglutinación reveló un valor referencial hasta 800 UI.mL^{-1} . Estos datos son discordantes con la literatura revisada, ya que en Venezuela, Gutiérrez et al. (20), establecieron un valor referencial hasta 400 UI.mL^{-1} para una población entre 10 a 15 años del municipio Francisco Linares Alcántara del estado Aragua. Varios investigadores han reportado diferentes valores referenciales de títulos de ASTO para este grupo etario en otras localidades. En el Cairo 400 UI.mL^{-1} (31); 276 UI.mL^{-1} en Fiji (32); $242,9 \text{ UI.mL}^{-1}$ en la India (33). Todos los valores exceden el valor referencial establecido de $\leq 200 \text{ UI.mL}^{-1}$ y esto puede deberse a que los niños entre 5 a 10 años padecen de faringitis estreptocócica a repetición, por lo que al llegar a este grupo etario, sus niveles de ASTO son elevados (33). Karmakar et al. (3) evaluaron y reevaluaron los títulos de ASTO y antideoxiribonucleasa B en niños y adultos, obteniendo un aumento del límite superior normal de ASTO en los niños, por lo que los investigadores consideran pertinente verificar constante y periódicamente los valores referenciales de ASTO que se hayan establecido, debido a que los niños son más susceptibles a padecer infecciones por EBHGA.

Es importante señalar que aunque se excluyeron del estudio los participantes que presentaban síntomas de faringitis; los títulos de ASTO permanecen elevados durante meses (11), por lo que es probable que se incluyeran algunos adolescentes cuyos títulos de ASTO estaban en el proceso de volver a su nivel de referencia después de un episodio de faringitis.

Lo ideal al momento de realizar un diagnóstico serológico de infección estreptocócica es la determinación del título de ASTO en fase aguda de la enfermedad y luego 14 a 28 días después, con un resultado positivo definido como un aumento en el título del doble o más. Sin embargo, no siempre es posible obtener una segunda muestra, por lo que se hace necesario establecer el valor referencial en la población, ya que es generalmente aceptado que si sólo está disponible un espécimen, un título mayor al límite superior normal puede ser considerado evidencia de infección estreptocócica (32). Además, un único título ASTO conserva su papel como una herramienta de diagnóstico útil e inversamente correlacionado con la progresión de la FRA (5).

En este trabajo se demuestra la importancia de la determinación de los valores referenciales para cada región o país, sobre todo en caso de sospecha de FRA. Además, el valor obtenido representa a la población de 10 a 15 años de edad del municipio Girardot, por lo que tiene gran valor clínico, epidemiológico y de laboratorio clínico porque, al emplear los valores sugeridos por el fabricante de las pruebas comerciales, se corre el riesgo de sobreestimar los títulos de ASTO y aplicar tratamiento antimicrobiano innecesariamente, favoreciendo la resistencia antimicrobiana.

Al comparar los resultados positivos del cultivo en agar sangre de carnero al 5% con los títulos positivos por el método de aglutinación se evidenció que no existe asociación estadísticamente significativa ($\kappa=0,0403$; $p=0,6061$), lo cual demuestra disociación entre los valores obtenidos por el método serológico con el aislamiento de estreptococos beta-hemolíticos en un portador asintomático.

Nava et al. (34), observaron que en los alumnos de educación secundaria (12 a 17 años) las concentraciones de ASTO varían, los alumnos de escuelas secundarias gubernamentales presentaron concentraciones más altas de ASTO, mientras que los alumnos de escuelas secundarias privadas presentaron concentraciones menores, concluyendo que una mejor condición socioeconómica puede ser un factor influyente. Estos resultados difieren de los obtenidos en esta investigación debido a que no se encontraron asociaciones significativas entre el resultado de la prueba de aglutinación y la variable tipo de colegio, lo que sugiere que los títulos de ASTO son independientes del tipo de colegio.

No se encontraron asociaciones significativas ($OR=0,9603$, $p=1,0000$) entre el resultado de la prueba de aglutinación y el género; similares resultados son reportados por Gutiérrez et al. (35).

FINANCIAMIENTO. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC) a través de los proyectos AM-173-11 y AM-023-13.

REFERENCIAS

1. Carpinelli L, Fariña N, Samudio M, Figueredo L, Laspina F, Sanabria R. Frecuencia de serogrupos de estreptococos beta-hemolíticos en hisopados faríngeos de pacientes con faringitis. *Mem Inst Cienc Salud*. 2008; 6(19):15-19.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología Médica*. 5ta. Ed. Elsevier Mosby. Madrid. 2006.
3. Karmakar MG, Venugopal V, Joshi L, Kamboj R. Evaluation and revaluation of upper limits of normal values of anti-streptolysin O and anti-deoxyribonuclease B in Mumbai. *Indian J Med Res*. 2004; 119:26-28.
4. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections y their sequelae. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 609:29-42.

5. Setty A, D'Silva V. The utility of a single antistreptolysin O titer in the diagnosis acute rheumatic fever. *J Evolution Med Dent Sci*. 2014; 3(30):837-2-7.
6. Pérez C, Borda A, Katime A, Restrepo L. Interpretación clínica de anticuerpos anti-estreptococo en fiebre reumática. *Rev Panam Infectol*. 2008; 10(3):36-42.
7. Henningham A, Barnett T, Maamary PG, Walker MJ. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Discov Med*. 2012; 13 (72):329-342.
8. Olivier C. Rheumatic Fever—is it still a problem? *J Antimicrob Chemother*. 2000; 45:13-21.
9. Setty A, D'Silva V. The utility of a single antistreptolysin O titer in the diagnosis acute rheumatic fever. *J Evolution Med Dent Sci*. 2014;3(30):8372-7.
10. Devi U, Borah PK, Mahanta J. The prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of betahemolytic streptococci colonizing the throats of schoolchildren in Assam, India. *J Infect Dev Ctries* 2010; 5(11):804-808.
11. Johnson DR, Kurlan R, Leckman J, Kaplan EL. The human immune response to streptococcal extracellular antigens: clinical, diagnostic, and potencial pathogenetic implications. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 481-490.
12. Hernández V, Álvarez F, Flores K, Chacón M, Sibrian B, Pérez-Ybarra L, Gutiérrez CN. Títulos de antiestreptolisina O en escolares del estado Aragua. *Rev Soc Venez Microbiol*. 2012; 32(1):13-17.
13. Greffé A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun J-P. Reference values: a review. *Vet Clin Path*. 2009;38(3):288-298.
14. Maronna RA, Martin RD, Yohai VJ. Robust statistics: theory and methods. John Wiley and Sons. Chichester. England. 2006.
15. Ávila HL. Introducción a la metodología de la investigación. 2006. Edición electrónica. Texto completo en www.eumed.net/libros/2006c/203/
16. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. República Bolivariana de Venezuela. 2011. Código de Ética para la Vida. Disponible en: <http://www.coordinv.ciens.ucv.ve/investigacion/coordinv/index/CONCIENCIA/codigoe.pdf>.
17. Gutiérrez CN, Guzmán NA, González YA, Luis-León JJ, Pérez-Ybarra LM, Chacón MZ. Aislamiento faríngeo de estreptococos betahemolíticos utilizando caldo Todd-Hewitt en individuos asintomáticos con y sin previo cepillado dental. *Saber*. 2014; 26(3):265-272.
18. Agresti A. An introduction to categorical data analysis. 2nd Edition. Wiley-Interscience, New Jersey. 2007.
19. Cytel Software. Statxact 9 with Cytel studio. Statistical software for exact nonparametric inference. User manual. Cytel Software, New York. 2010.
20. Gutiérrez CN, Guzmán NA, González YA, Luis-León J, Pérez-Ybarra LM, Chacón MZ. Valores referenciales de antiestreptolisina O en estudiantes de 10 a 15 años del municipio "Francisco Linares Alcántara". Estado Aragua, Venezuela. *Comunidad y Salud*. 2014; 12(2):1-7.
21. Giannelli S y Posse G. Prevalencia de portación asintomática del estreptococo β hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*). *Archivos Argentinos de Pediatría*. 2007; 105(3): 221-224.
22. Miranda MC. Comportamiento de los estreptococos beta hemolíticos en escolares. *Sanid Mil*. 2012; 68(1):17-21.
23. Villafañe-Ferrer L, Castro-Orozco R. Portación faríngea de *Streptococcus pyogenes* y perfiles de sensibilidad en escolares de Cartagena. *Duazary*. 2015; 12(2):112 -117.
24. Fuentes Y, Martínez I, Sierra G, Izquierdo L, López O, Valdés MJ. Colonización faríngea por bacterias potencialmente patógenas en niños sanos de una escuela primaria. *Rev Cub Med Trop*. 2009; 61(1):50-56.
25. Mahendrappa KB, Rajendra. Upper limit of normal antistreptolysin-O titer in healthy school children. *Indian Pediatr*. 2010; 47:629.
26. Guevara JM, Aguirre J, Valencia E, Guevara JM, Williams F, Cuéllar E, Barboza M, Agurto W. Prevalencia de *Streptococcus beta hemolítico* en pacientes con faringoamigdalitis aguda, en un hospital de la ciudad de Chachapoyas, Amazonas. *An Fac Med*. 2008; 69(29):88-90.
27. Al-Charrakh AH, Al-Khafaji JKT, Al-Rubaye RHS. Prevalence of β -hemolytic groups C and F streptococci in patients with acute pharyngitis. *N Am J. Med Sci*. 2011;3(3):129-136.
28. Lloyd CAC, Jacob SE, Menon T. Pharyngeal carriage of group A streptococci in school children in Chennai. *Indian J Med Res*. 2006; 124(2):195-198.
29. Álvarez F, Gómez J, Maseda E, Álvarez F. Otomastoiditis colestomatosa crónica por estreptococo de grupo F con fistulización espontánea. *An Pediatr*. 2007;67(4):378-380.
30. Bramhachari PV, Kaul SY, McMillan DJ, Shaila MS, Karmakar MG, Sriprakash KS. Disease burden due to *Streptococcus dysgalactiae* Subsp. *equisimilis* (group G and C streptococcus) is higher than due to *Streptococcus pyogenes* among Mumbai school children. *J Med Microbiol*. 2010;59(2):220-223.
31. Kotby AA, Habeeb NM, El Elarab SE. Antistreptolysin O titer in health and disease: levels and significance. *Pediatr Rep*. 2012;4(1):25-29.
32. Steer AC, Vidmar S, Ritika R, Kado J, Batzloff M, Jenney AWJ, Carlin JB, Carapetis JR. Normal ranges of streptococcal antibody titers are similar whether streptococci are endemic to the setting or not. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(2):172-175.
33. Sethi S, Kaushik K, Mohandas K, Sengupta C, Singh S, Sharma M. Anti-Streptolysin O Titers in Normal Healthy Children of 5-15 Years. *Indian Pediatr*. 2003;40:1068-1071.
34. Nava A, Concha LE, Mendoza C, Robles G, Navarrete S, Navarro C, y cols. Títulos séricos de antiestreptolisina O en adolescentes del área urbana y rural en México. *Revista Alergia México*. 2008; 55(5):196-200.
35. Gutiérrez CN, Chacón M., Martínez MDC, Sibrian B, Márquez Y, Herrera E, Torres L, Pérez-Ybarra L. Frecuencia de antiestreptolisina O y antidesoxirribonucleasa B como indicador de infección estreptocócica en estudiantes de una unidad educativa del estado Aragua. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2010; 30:6-10.