

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**



**SUSCEPTIBILIDAD DE HAEMOPHILUS  
INFLUENZAE A VARIOS ANTIBIOTICOS**

237

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A**

**JOSE FERNANDO MUÑOZ APREZA**

**México, D. F.**

**1974**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tesis  
GO  
ECHA 1974  
PRDC  
H.T. 2019

226



QUIMICA

JURADO ASIGNADO  
ORIGINALMENTE  
SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE Profa.: SARA MANRIQUE REGIL  
VOCAL Prof. : OSCAR AMOR DODERO  
SECRETARIO Prof. : JORGE SOTO SORIA  
1er. SUPLENTE Prof.: MARIO MIRANDA CAS-  
TRO  
2o. SUPLENTE Prof.: FRANCISCO JOSE MI-  
GUELES PRIETO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Hospital Infantil de México.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:



José Fernando Muños Apreza

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:



Q.F.B. Oscar Amor D.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUPERVISOR TECNICO:



Dr. Leslie Gilroy

A MIS PADRES:

Con inmensa gratitud.

A LILIA

A todos aquellos estudiantes  
muertos durante mi período es  
colar.

## I N D I C E

INTRODUCCION-----	1
GENERALIDADES-----	3
MATERIAL Y METODOS-----	11
RESULTADOS-----	21
DISCUSION-----	27
RESUMEN Y CONCLUSIONES-----	29
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS-----	31

## I N T R O D U C C I O N

En 1892, Pfeiffer, bacteriólogo alemán y anterior asistente de Koch, aisló de enfermos con influenza a Haemophilus influenzae (bacilo de Pfeiffer) al que se le atribuyó, erróneamente en 1930, ser el agente etiológico de la influenza epidémica. Posteriormente se demostró que ésta es debida a un virus y de este modo, el nombre de "influenzae" no tiene importancia etiológica. - No obstante, como germen de asociación puede ser causa de complicaciones de esa enfermedad.

En la primera infancia produce una laringotraqueitis (inflamación de laringe y tráquea). Con cierta frecuencia se halla como único germen en enfermedades pulmonares, en meningitis y endocarditis.

Datos de diversos centros hospitalarios como son: el Hospital Infantil de México, el Instituto Mexicano de Asistencia a la Niñez y el Hospital de Pediatría del IMSS demuestran que en los últimos 30 años la incidencia del germen en padecimientos infantiles, es notable.

Con la aparición de los antibióticos y del subsecuente -- uso inadecuado e incontrolado de que han sido objeto se ha presentado el problema de cepas resistentes.

Dentro de los hospitales la morbilidad y la mortalidad -- global por padecimientos infecciosos, se relacionan íntimamente con el manejo adecuado o inadecuado de los antimicrobianos.



La presente tesis, enfocada sobre la SUSCEPTIBILIDAD DE -  
HAEMOPHILUS INFLUENZAE Y VARIOS ANTIBIOTICOS, probada in vitro,-  
tiene la intención de conocer cual es el comportamiento de esta-  
bacteria ante ocho distintos antibióticos con el propósito de --  
orientar al clínico en el tratamiento de las infecciones que ésta  
provoca.

Quiero agradecer al Dr. Leoncio Filloy, Jefe del Laborator  
rio Clínico del Hospital Infantil de México, las facilidades que  
me brindó dentro del Laboratorio para el desarrollo del presente  
estudio.

Al Sr. Q.F.B. Oscar Amor D. Profesor de la Facultad de --  
Química, por su acertada asesoría.

Al Sr. Biólogo Esteban Borjas García, por su ayuda y con-  
sejos.

## G E N E R A L I D A D E S

Dentro del género Haemophilus se presentan especies patógenas tanto para el hombre como para animales inferiores. A estos últimos corresponden las especies; H. suis y H. canis. En el humano las especies H. duplex (diplobacilo de Morax-Axenfeld), H. ducreyi (bacilo de Ducrey), H. pertussis (bacilo de Bordet-Gengou), que por presentar una marcada relación antigénica con ciertas especies de Brucella en especial B. bronchiseptica se le ha colocado en un género separado, Bordetella, H. hemolyticus, H. parainfluenzae y por último; H. influenzae (bacilo de Pfeiffer).

### MORFOLOGIA Y TINCIÓN.

Este bacilo es considerado como una de las bacterias patógenas más pequeñas, ya que sus dimensiones son de 1.4 micras de largo y 0.3 micras de ancho. Sólo en las colonias lisas suele observarse cápsula, no esporula y es inmóvil. En los cultivos suele adoptar formas filamentosas que son características de las cepas de que se trate (5, 7, 13, 21, 23).

Su forma es cocobacilar y aún filamentosas, considerada la primera "típica" y las segundas "atípicas".

Las colonias en gelosa-sangre son pequeñas y redondas, aisladas y transparentes. Si el medio se encuentra contaminado (principalmente de Staphylococcus aureus) las colonias crecen de mayor tamaño y más opacas alrededor de la colonia extraña, presentándose el fenómeno de "satelitismo" (12).

En gelosa chocolate el crecimiento es satisfactorio; las colonias son grandes y translúcidas. Algunos autores las comparan con gotas de rocío. Se tiñe fácilmente con los colorantes de la anilina y es negativa a la coloración de Gram con coloración bipolar.

#### FISIOLOGIA.

El bacilo de Pfeiffer pertenece al grupo de las bacterias hemófilas, cuya característica es la de requerir para su crecimiento de ciertos constituyentes presentes en la sangre fresca, como son el factor "X" que está asociado a la hemoglobina y es termoestable y del factor "V" que se encuentra en la levadura y en varios extractos vegetales y es termolábil. Estos dos factores de crecimiento son requeridos por H. influenzae; además en los medios con sangre no produce hemólisis.

No todas las especies de este género tienen los mismos requerimientos nutricionales, pues H. parainfluenzae requiere solo el factor "V", H. pertussis y H. ducreyi no requieren ninguno de los dos y como característica adicional no ocasionan hemólisis en los medios. H. duplex, tampoco los requiere y puede o no presentar hemólisis.

En última instancia, este requerimiento nutricional puede ser un proceso de diferenciación entre las especies de este género.

Los medios de cultivo en los cuales el desarrollo de H.-

influenzae es abundante, son:

a) Levinthal.

Preparado de desfibrinado de sangre de conejo o caballo y caldo de infusión cerebro corazón añadido a una base de infusión de agar.

b) Gelosa Chocolate.

Preparado añadiendo sangre fresca a una infusión de agar nutritivo caliente (60°C). El inconveniente de este medio es que no es diferencial pero por su facilidad de preparación, con respecto al de Levinthal, fué el que se empleó para las pruebas con antibióticos en este trabajo.

En cuanto a su actividad bioquímica; reduce el nitrato, forma indol y su capacidad fermentativa es medianamente alta, ya que fermenta la glucosa y otros azúcares, pero se puede considerar que no tiene valor diferencial (6, 7, 21, 23).

#### ANTIGENICIDAD.

Se ha encontrado que existen variaciones en las colonias de H. influenzae pues unas presentan la forma rugosa (R) y otras la forma lisa (S). Esta última es capsulada y presenta seis tipos inmunológicos diferentes que están clasificados como a, b, c, d, e y f por el proceso de precipitación de carbohidratos (pruebas de aglutinación) o por reacción de Quellung (pruebas de hinchazón capsular). Estas reacciones son específicas mientras que-

las variedades (R) son antigénicamente heterogéneas (5,7,8,18).

Guardan cierta relación inmunológica con ciertos tipos - de D. pneumoniae.

Se considera que la mayor parte de las infecciones meníngeas por H. influenzae son producidas por el tipo b aunque algunos casos aislados son causados por los tipos a y f.

#### PATOGENICIDAD.

Queda marcado su alto poder patógeno (2,13,21,9,20) por los frecuentes casos de meningitis que se presentan en los niños.

Como un agente piógeno primario puede producir en la vía respiratoria superior neumonías, laringitis, sinusitis, osteomielitis y patología en otros órganos y sistemas.

#### VARIACION GENETICA Y RESISTENCIA.

Al igual que muchas otras bacterias, H. influenzae tiene variaciones a nivel genético, Pittman logró obtener la forma S-virulenta a partir de la forma R no virulenta, en medios que contenían suero anti R y también en pases continuos en animales -- Alexander y Laidy, transformaron un tipo capsulado en otro por un procedimiento similar al empleado para Pneumococcus, o sea, se inocularon animales con la cepa R avirulenta en combinación con una cepa muerta de S encapsulado y se obtuvo una cepa viva-virulenta como resultado de la combinación genética de DNA, que dió a las nuevas células la información para elaborar el polisa

cárido capsular que no tenía (4,5,7,23).

El problema de resistencia de las bacterias a las sustancias antimicrobianas se demostró desde 1907 y en 1910, Ehrlich determinó que puede haber un cambio de susceptibilidad de un microorganismo a una sustancia química cuando ésta es aplicada en el curso de un tratamiento o en los cultivos "in vitro".

#### SUSCEPTIBILIDAD ANTIMOCROBIANA.

Durante los últimos años se han efectuado diversas pruebas con antimicrobianos frente a Haemophilus influenzae.

Estas se han efectuado "in vitro" por distintos procedimientos:

- a) Sensibilidad en disco; midiendo los halos de inhibición producidos por el efecto de los diversos antimicrobianos que se encuentren presentes.

Mediante esta prueba se observó la resistencia de H. influenzae a la Trimetopina (15).

Se aislaron 210 cepas de H. influenzae del esputo de 63 pacientes con infecciones respiratorias crónicas, se empleó para la prueba discos patrón de Oxold que es una combinación de sulfa metoxazol-Trimetopina. Los resultados fueron que 109 (52 %) cepas fueron resistentes. Previamente se determinó la concentración mínima inhibitoria para la sulfa metoxazol-Trimetopina y que fué de 10 mcg/ml en adelante. De 39 pacien--

tes con tratamiento por esta droga se aislaron 32 casos (82%) con cepas resistentes y del mismo número, pero sin tratamiento, cinco casos (12.5%) con cepas resistentes (J.R. May-J. Davies).

- b) En tubo por dilución seriada; observando la turbiedad del desarrollo.

La Dra. S.H. Wood Sell de la Universidad de Vanderbilt, en Nashville Tennessee, efectuó pruebas de sensibilidad en tubo para 106 cepas de H. influenzae (42 tipo b, 34 de otros tipos y 30 intipificables). Estas pruebas fueron hechas en caldo de Levinthal y con cuatro drogas distintas que fueron; eritromicina, tetraciclina, cefaloridina, triple sulfa (sulfatiazol, sulfadiazina y sulfameracina) y una combinación; triple sulfa con eritromicina (19).

Dentro de los resultados, se encontró que la más efectiva para la inhibición de las cepas fué la triple sulfa, pues a 10 mg/100 ml inhibía cerca del 40 % de cepas intipificables y 20% de las tipificables. Dentro de las escalas terapéuticas la eritromicina y tetraciclina fueron eficaces.

Por otra parte estudios de J.M. Randhand y H.C. Lichstein confirmaron el efecto de antibióticos selectivos y otros inhibidores en competencia con el desarrollo de H. influenzae (17).

Este efecto de competencia a nivel de síntesis de proteínas fué probado con estreptomycin, penicilina, polimixina, cloramfenicol, novobiocina, eritromicina, D cicloserina, 8 azoguanina y 6-azouracilo, el medio-líquido utilizado fué tripticasa.

Dentro de los resultados encontrados se observó - que la penicilina y la polimixina redujeron la viabilidad celular mientras que los otros antibióticos tuvieron poco o ningún efecto sobre esta viabilidad.

En la población de H. influenzae el estado de competencia a nivel de síntesis de proteínas fué demostrado desde que se observó que el cloramfenicol impedía a desarrollo de esta bacteria (Goodgal en 1958, - Stay en 1962; Leidy, Jaffee y Alexander en 1962).

- c) En placa por dilución seriada; observando la presencia o ausencia de desarrollo.

En forma comparativa S.E. Mc Linn y colaboradores efectuaron la técnica de dilución progresiva de antimicrobianos en placa y en tubo (16).

A setenta cepas de H. influenzae (49 capsuladas y 21 no capsuladas) aisladas de 30 niños con otitis media aguda y 40 con meningitis se les probó la susceptibilidad con ocho antibióticos (cefalexina, lincomicina, cloramfenicol, ampicilina, tetraciclina, eritromicina, penicilina y kanamicina) y dos sulfas (sulfa-



soxazol). El medio de crecimiento fué Levinthal, para la dilución en tubo se utilizó caldo estéril de infusión cerebro corazón y agar para la dilución en placa.

De los resultados se observó que había en placa -- una aparente resistencia a la ampicilina; en tubo todas las cepas eran susceptibles a este antibiótico.

Se encontró también susceptibilidad para la penicilina, tetraciclina, cloramfenicol, eritromicina, sulfadiazina, y sulfasoxazol. La lincomicina no fué efectiva y un mayor número de cepas fueron resistentes a la cefaloxina.

Niveles de 10 a 20 mcg/ml de kanamicina se requirieron para su inhibición.

## M A T E R I A L

A. Material de Laboratorio.

B. Material Biológico.

A. Material de laboratorio.

1. Cajas de Petri de 15 x 100 mm.
2. Pipetas graduadas de 1,5 y 10 ml.
3. Tubos de ensayo de 12 x 120 mm.
4. Matraces Erlenmeyer de 1000 ml.
5. Probeta graduada de 1000 ml.
6. Portaobjetos de 25 x 75 mm.
7. Instrumentos para sembrar los inóculos:  
Asa y porta asa, replicador y pipetas Pasteur con agujas hipodérmicas.
8. Balanza analítica Mettler Mod. H 6.
9. Jeringa automática BD-Cornwall de 2 ml.
10. Microscopio compuesto binocular Zeiss-Winkel.
11. Médios de cultivo.
  - a) Gelosa chocolate (con extracto de levadura)  
En 800 ml de agua destilada estéril se suspenden:
    1. 16 g de proteosa peptona # 3 Difco.
    2. 16 g de agar Difco.
    3. 4 g de cloruro de sodio Q.P.
    4. 4 g de fosfato dibásico Q.P.
    5. 0.5 g de dextrosa Q.P.

6. 8 g de extracto de levadura Difco.

Se calienta para disolver y para esterilizar a -- (15 lb) 121°C durante 15'. Se enfría a 60°C y se agrega después la sangre humana calentándola para que se liberen los factores de crecimiento.

Se sirve en cajas de Petri esterilizadas.

- b) Gelosa chocolate (con suplemento B)

Se prepara de igual manera que la anterior pero no se le agrega el extracto de levadura sino que después de calentar la sangre, se deja enfriar un poco y se agrega el suplemento B (concentrado estéril de levadura producido por los laboratorios Difco para el desarrollo de H. influenzae y N. gonorrhoeae especialmente).

- c) Gelosa sangre.

Compuesta de gelosa nutritiva adicionada de 5% de sangre de carnero. Servir en cajas Petri esterilizadas.

12. Soluciones; Solución salina isotónica esterilizada.

13. Antibióticos (1,4,10,11,14,22):

1. Ampicilina
2. Cefalotina
3. Cloramfenicol
4. Kanamicina
5. Eritromicina

6. Gentamicina
7. Novobiocina
8. Penicilina

B. Material Biológico:

Setenta cepas de H. influenzae que fueron aisladas de pacientes con procesos infecciosos diversos en; vías respiratorias, ojos, oídos, líquido cefalorraquídeo y otros. Estas fueron proporcionadas por el Hospital Infantil de México.

## M E T O D O S

A. Aislamiento, purificación e identificación de las cepas en estudio.

De los enfermos con procesos infecciosos se procedió a tomar los productos a los que más tarde se les aplicaría el estudio bacteriológico.

Cada toma se realizó con un hisopo estéril introduciéndolo después en caldo de infusión cerebro corazón y se sembró lo más pronto posible, para el ICR la toma del producto se efectuó por medio de punción lumbar.

Para la siembra se emplearon los siguientes medios de cultivo en placa:

1. Gelosa sangre.- Medio inespecífico, en donde crecen la mayoría de los microorganismos, tanto Gram positivos como Gram negativos.

2. Medio de Tergitol.- Para el desarrollo de Enterobacterias.

3. Medio 110.- Para el desarrollo de Staphylococcus.

4. Gelosa chocolate.- Donde crece H. influenzae.

A las bacterias que presentaron las características (colonias grises, translúcidas y aisladas) de H. influenzae se procedió a hacerles frotis por tinción de Gram, para su identificación. Se sembraron en gelosa chocolate y en gelosa sangre, ya que la ausencia de crecimiento en este último nos indica que se trata de esta bacteria, pues como se dijo antes, los requerimientos

nutricionales para ella no se encuentran presentes aquí. Aunque para otras bacterias es necesario para su mejor identificación-efectuar pruebas bioquímicas, para H. influenzae fué difícil hacerlo por los inconvenientes que presentó el medio en el que creció.

Así, en la identificación genérica de H. influenzae bastó observar la morfología de las colonias y la tinción de Gram.

Se pudo así tener la seguridad de que se estaban empleando cepas puras de este germen.

Se procedió a hacer un segundo aislamiento ya que el estudio requería de cepas puras, por lo cual se tomó una colonia- y se sembró en las placas por medio de estrías con asa. De esta forma se fué diluyendo la concentración de las células bacterianas hasta obtener colonias completamente aisladas.

#### B. Tipificación serológica:

El método que se empleó para la tipificación serológica- fué el comunmente usado en el laboratorio o sea, la reacción de aglutinación en placa con antisuero polivalente y antisuero específicos de cada tipo serológico diferente. Los antisueros utilizados fueron; a,b,c,d,e,f y polivalente.

C. Determinación de la susceptibilidad de H. influenzae por el método de dilución progresiva en placa de agar (2,4,16).

A setenta cepas de H. influenzae se les probó la susceptibilidad con ocho antibióticos.

### 1. Cepas prueba.

Que se obtuvieron de diversas fuentes de cultivo (ver tabla No. 3)

### 2. inóculo bacteriano.

De un cultivo de 24 hrs en placa gelosa chocolate incubado a 37°C se tomaron cinco colonias que se suspendieron en 1 ml de solución salina isotónica estéril.

El objeto de haber tomado cinco colonias fué para tener una población bacteriana homogénea y para evitar el riesgo de mutantes.

Para la aplicación de los inóculos, se utilizó primera--mente un aplicador de alambre, que consistía de una placa en la que iban soldados diez y seis alambres equidistantes compre--diendo el área de la caja Petri. En la punta de cada alambre se colocó un algodón a manera de hisopo.

Este replicador, previamente se esterilizaba y en el momento de la aplicación sobre los algodones se depositaba con pipetas Pasteur esterilizadas, la dilución de cada una de las cepas del microorganismo.

Después, con la misma dilución se aplicaron los inóculos por otro procedimiento, se emplearon pipetas Pasteur esterilizadas, adicionadas en las puntas, con agujas desechables del número 25 con objeto de obtener gotas pequeñas que proporcionaran una inoculación más uniforme, más homogénea y con una concentración de bacterias aproximadamente conocida. Se calculó en térmi

nos aproximados que había en cada inóculo  $10^5$  microorganismos de la siguiente manera: suponiendo que un cultivo de 24 hs. tiene  $10^6$  células bacterianas por colonia, se considera que se estaba trabajando con  $5 \times 10^6$  células, ya que se tomaron 5 colonias, si las agujas proporcionan 0.02 ml por gota, que equivalen a una cincuentava parte de 1 ml, se deduce que en cada gota por lo tanto, había una concentración aproximada de  $10^5$  bacterias.

Este método fué más eficaz que el anterior, la manipulación se facilitó y los halos de crecimiento se observaron con mayor claridad, se manejó una dilución conocida y consecuentemente se descartó el primer método.

### 3. Preparación de la dilución de los antibióticos.

Para llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se requirieron, como se indicó antes, de ocho antibióticos en forma de sales puras, de las cuales seis (kanamicina, penicilina, gentamicina, eritromicina, ampicilina y cloramfenicol) fueron proporcionados por la institución donde se desarrolló el presente trabajo, cefalotina por los laboratorios "Lilly de México" y novobiocina por "Upjhon de México".

Para la dilución en placa, fueron hechas diluciones seriadas en agua destilada estéril y la concentración resultante fué añadida al medio de gelosa chocolate.

Como la kanamicina y la gentamicina se presentaron en solución se hicieron las siguientes diluciones:

Para la kanamicina:



I. Frasco de 70 mg en 2 ml más 8 ml de agua daba 7 mg/ml

II. 1 ml de la solución I más 6 ml de agua daba 1 mg/ml

Para la gentamicina:

I. Frasco de 20 mg en 2 ml más 18 ml de agua daba 1 mg/ml

Para la penicilina:

Se trabajó en UO/ml. Se hicieron diluciones 1:10 a partir de  $10^6$  hasta  $10^{-2}$ .

De cada uno de los otros antibióticos se pesaron 10 mg, - diluyéndolos en 10 ml de agua esterilizada y obteniendo así la - solución madre (SM); de esta solución se toma 1 ml al cual se le agregan 4 ml de agua esterilizada para dar la solución de trabajo:

1 : 5 ----- 200 mcg/ml

Para la eritromicina:

Al principio se usó como disolvente alcohol absoluto y -- después las diluciones siguientes, con agua destilada estéril.

Ya con la solución de trabajo se continúa haciendo dilu-- ciones 1:2 hasta la concentración 1.5 mcg/ml quedando:

DILUCION	DISOLVENTE	ANTIBIOTICO	CONCENTRACION
I.	-	2 ml	200 mcg/ml
II.	1 ml	1 ml de I	100 "
III.	1 ml	" de II	50 "
IV.	1 ml	" de III	25 "
V.	1 ml	" de IV	12.5 "
VI.	1 ml	" de V	6.2 "
VII.	1 ml	" de VI	3.1 "
VIII.	1 ml	" de VII	1.5 "
IX.	-	" de VIII	Descartar

Una vez preparados los antimicrobianos y sus diluciones-respectivas se les puede usar en un lapso de 7 días, guardando-las soluciones (SM) y de trabajo en el refrigerador, para prepara-r las soluciones restantes en el momento de su empleo.

4. Preparación de la gelosa chocolate donde se requeri-rán diferentes cantidades de los antimicrobianos.

La gelosa chocolate se preparó como la indicó el marbete-una vez esterilizada se procedió a enfriarla entre 48 y 50°C pa-rra evitar la inactivación de los antimicrobianos cuando se adi-cionan a la gelosa.

La cantidad del medio y de las diluciones de los antimicrobianos que se añadieron para cada caja de Petri fueron las -siguientes:

DILUCION DEL ANTIMICROBIA- NO EN ml	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	2	2	2	2	2	2	2	2
CANTIDAD DE - GELOSA EN ml	18	18	18	18	18	18	18	18
CONCENTRACION FINAL EN - - mcg/ml	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	0.15

Se miden las cantidades de antimicrobiano con pipeta es-terilizada y la gelosa chocolate con jeringa automática; se va-cían a los tubos para que se mezclen bien y se vacía en cajas -de Petri. Se dejan solidificar y se guardan en el refrigerador-hasta el momento de su empleo.

5. Lectura de los resultados; se colocan las cajas en orden progresivo a las concentraciones de los agentes antimicrobianos, tomando como concentración efectiva la más baja en la cual no hubo desarrollo microbiano. A ésta se le ha llamado "Concentración Inhibitoria Mínima" (CMI).

## R E S U L T A D O S

Ya determinada la CMI que presentó esta especie, se procedió a representar gráficamente los resultados obtenidos. Estos resultados de las pruebas de sensibilidad de las setenta cepas de Haemophilus influenzae probadas con los antibióticos de describen en las tablas 1 y 2 lo mismo que en las gráficas adjuntas.

La tabla 1 se refiere al porcentaje acumulativo de las setenta cepas probadas.

La tabla 2 se refiere al número de cepas inhibidas equivalentes al porcentaje acumulado. Este mismo número se graficó contra las distintas concentraciones de los antimicrobianos.

Dichas concentraciones quedan expresadas en mcg/ml y van desde 20 mcg/ml hasta 0.08 mcg/ml. que es la dilución más baja.

Como la penicilina se trabajó en UO/ml las concentraciones quedaron expresadas desde 100 UO/ml hasta 0.01 UO/ml.

Debajo de cada columna donde se manifiesta la concentración de antimicrobiano, se muestran las proporciones de cepas ya inhibidas por esa concentración y de las que son resistentes.

De acuerdo con el criterio que se sigue en la clínica, en el tratamiento de estas infecciones con antibióticos, llamamos cepas resistentes a aquellas que fueron capaces de crecer en las concentraciones de 10 o más mcg/ml.

También se observa en los resultados que a la concentración de 10 mcg/ml el cloramfenicol pudo inhibir totalmente el crecimiento de las cepas de H. influenzae. Para la concentración

de 2.5 mcg/ml a 0.625 mcg/ml se presenta un amplio rango para ce falotina, kanamicina y eritromicina. En la escala que va de 0.125 mcg/ml a 0.625 mcg/ml a 0.156 mcg/ml gentamicina, novobiocina y ampicilina marcaron una actividad de inhibición muy eficaz, aunque esta última medianamente a 0.156 mcg/ml.

CMI de antibiótico en mcg/ml.	0.08	0.156	0.625	2.5	10	> 20
AMPICILINA	No hay inhibición	55.7	100			
CEFALOTINA	"	No hay inhibición	81.1	100		
CLORAMFENICOL	"	"	No hay inhibición	74.2	100	
KANAMICINA	"	"	94.2	100		
ERITROMICINA	"	"	91.4	100		
GENTAMICINA	"	97.1	100			
NOVOBIOCINA	"	98.5	100			
CMI del antibiótico en UO/ml	0.01	0.1	1	10		
PENICILINA	No hay inhibición	No hay inhibición	97.1	100		

TABLA No. 1

Porcentaje acumulativo de 70 cepas de H. influenzae inhibidas por los antimicrobianos

CMI de antibiótico en mcg/ml.	0.08	0.156	0.625	2.5	10	> 20
AMPICILINA	No hay inhibición	39	70			
CEFALOTINA	"	No hay inhibición	57	70		
CLORAMFENICOL	"	"	No hay inhibición	52	70	
KANAMICINA	"	"	66	70		
ERITROMICINA	"	"	64	70		
GENTAMICINA	"	68	70			
NOVOBIOCINA	"	69	70			
CMI de antibiótico en UO/ml	0.01	0.1	1	10		
PENICILINA	No hay inhibición	No hay inhibición	68	70		

TABLA No. 2

Número de cepas de H. influenzae inhibidas por los antimicrobianos

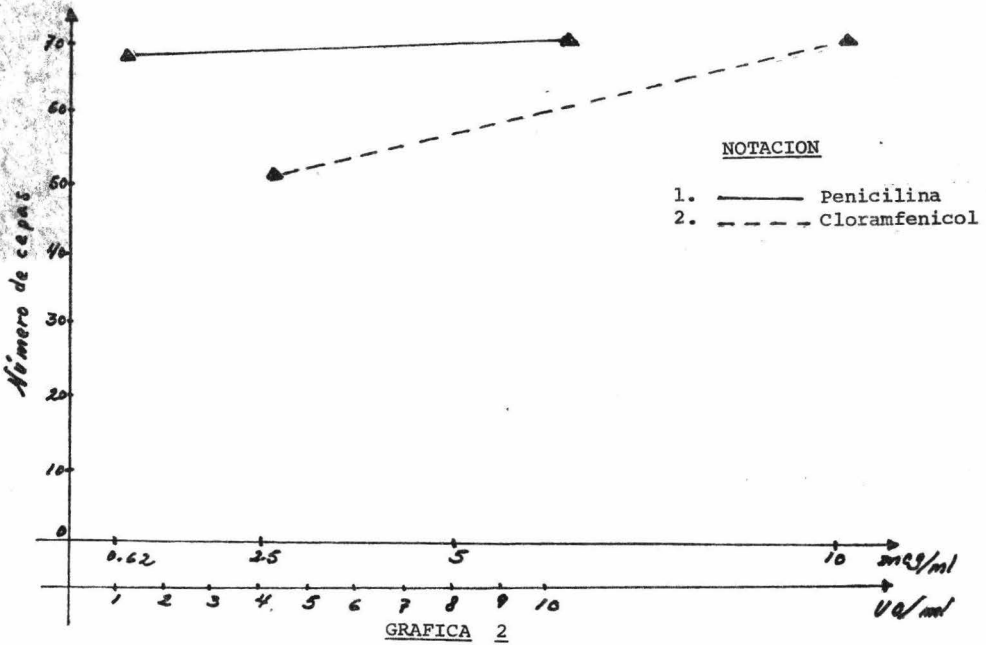
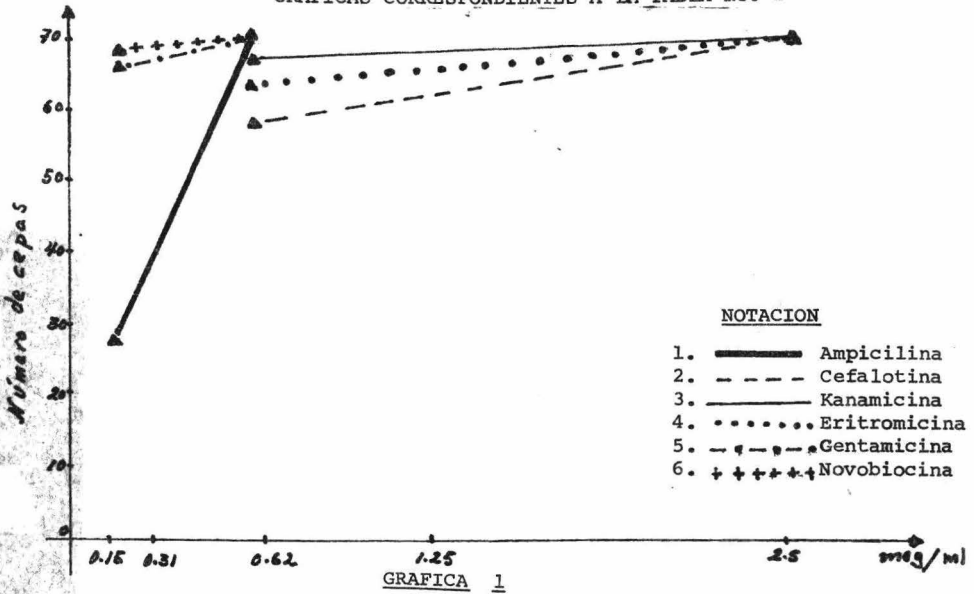
FUENTES DE CULTIVO	Tipo	a	b	c	d	e	f	Intipificables	Suma
Secreciones de vías respiratorias		-	5	-	-	-	-	23	28
Secreciones Oticas		2	4	-	1	-	-	16	23
Secreciones Oculares		-	2	-	-	-	-	7	9
Líquido Cefalorraquídeo		-	2	-	-	-	-	3	5
Otros (secreción vaginal, abscesos)		-	2	-	-	-	-	3	5
T o t a l									70

TABLA No. 3

Tipificación serológica de 70 cepas de  
Haemophilus influenzae.



GRAFICAS CORRESPONDIENTES A LA TABLA No. 2



## D I S C U S I O N

1. En el estudio de la tipificación serológica encontramos que el 74.2 % de las cepas fueron intipificables, el 21.2 % fueron "b" el 2.8 % fueron "a" y el 1.2 % fueron "d".

Del 74.2 de cepas que resultaron intipificables se consideró que algunas de las causas por las que no fueron tipificadas -- fueron:

- a) Por no quedar dentro de los tipos serológicos estudiados.
- b) Por encontrarse en fase rugosa.

De las cepas tipificadas predominó el tipo b, por lo que se concluyó que este era el tipo causante principal de las infecciones intrahospitalarias.

Por lo que se refiere a la técnica empleada consideramos -- que se puede emplear con facilidad y no requiere de un equipo especial, además se elimina la preparación de antisueros, propagación y titulación de fagos, inherentes a las técnicas de tipificación serológica y por bacteriófagos. Por consiguiente el método, -- no obstante de la simplicidad de la técnica y lo básico de los materiales, ofrece ventajas sobre los métodos antes citados pudiendo emplearse perfectamente en la rutina del laboratorio.

2. Dentro de las gráficas se observa que la pendiente y longitud de las rectas son importantes debido a que la mayor longitud de las curvas nos indica la necesidad de una mayor concentración del antibiótico para obtener una inhibición total y a menor --

inclinación mayor actividad de dicha inhibición sobre las bacterias, con excepción de la ampicilina que no obstante presenta -- una mayor inclinación de la pendiente presenta también una marca da actividad en un rango de concentración más pequeño.

En la gráfica No. 1 se observa que el antibiótico que presenta una inclinación de la pendiente menor fué la novobiocina - que consecuentemente fué el más efectivo.

Y el que presenta la menor actividad por presentar una inclinación de la pendiente más alta fue la cefalotina lo que esta de acuerdo con los resultados obtenidos.

En la gráfica No. 2 se observa que en relación con el cloramfenicol la penicilina fué más activa por presentar menor in--clinación de la pendiente.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se realizó el estudio sobre H. influenzae; identificación tipificación y susceptibilidad in vitro, respecto a diversos antimicrobianos. El estudio se realizó en tres partes:

A) Aislamiento, purificación e identificación de setenta-cepas de H. influenzae, que fueron obtenidas del Hospital Infantil de México.

B) Tipificación por pruebas de aglutinación, empleándose antiseros específicos; a, b, c, d, e, f y polivalente.

C) Determinación de la susceptibilidad a algunos agentes antimicrobianos con la técnica de dilución progresiva en placa de agar; para lo cual se emplearon los siguientes antibióticos;

Ampicilina, cefalotina, cloramfenicol, eritromicina, gentamicina, kanamicina, novobiocina y penicilina; siendo estos los antibióticos actualmente recomendados en el tratamiento de las infecciones causadas por Haemophilus influenzae.

Dentro de los resultados que se obtuvieron se observó que el 21.2 % de las cepas que se tipificaron pertenecen al tipo serológico b que es el más importante porque es el que produce las enfermedades características de esta especie.

Por lo que respecta a la susceptibilidad hacia los antimicrobianos, encontramos que los antibióticos más efectivos por orden de actividad fueron:

- 1) Novobiocina
- 2) Gentamicina
- 3) Ampicilina
- 4) Kanamicina
- 5) Eritromicina
- 6) Cefalotina
- 7) Penicilina
- 8) Cloramfenicol

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- American Medical Association.: Nuevas Drogas. Prensa Médica Mexicana, 1-62, (1968).
- 2.- Bailey, W.R.: Diagnostic Microbiology. C.V. Mosby Co., 289-293, (1970).
- 3.- Bergey's.: Manual of determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Co., 407-408, (1957).
- 4.- Bryant, M.C.: Antibiotics and their laboratory control. Butterworth & Co. Ltd, 3-18, 24-46 (1968).
- 5.- Burrows, W.: Tratado de Microbiología. Editorial Interamericana, 567-570 (1970).
- 6.- Cruickshank, R.: Medical Microbiology, E.S. Livingstone Ltd 213-215 (1968).
- 7.- Davis, B.D. and Dulbecco, R.: Microbiology. Harper & How ed, 790-95 (1970).
- 8.- Dubos, R.J. and Hirsch, J.C.: Bacterial and Mycotic Infection of Man. J.B. Lippincott Co., 724-739 (1965).
- 9.- Feigin R.D. et al: Haemophilus influenzae abscess associated with Septicemia. Am. J. Dis. Child., 121:534-5 (1971).
- 10.- Goldberg, R.: Antibiotics, their chemistry and non-medical-uses. D. Van Nostrand Co., 59,73,101,104,139 (1960).
- 11.- Goodman, L.S. y Gilman, A.: The Pharmacological Basis of -- Therapeutics. Mac Millan Co., 1224-37,-69,-74,-78,-85,-91,-98 (1965).
- 12.- Guillis, R.: Bacteriology E.S. Livingtone, 112-114 (1968).
- 13.- Jawetz, E. and Melnick, J.: Manual de Microbiología Médica. El Manual Moderno S.A., 213-214 (1970).
- 14.- Korzybski, Tadeus.: Antibiotics (origin, nature and properties). PWN Polish Scientific Publishers, 1327-29 (1967).
- 15.- May, J.R. et al: Resistance of Haemophilus influenzae to -- tremethoprim. Br. Med. J., 3:376-7,12 (1972).

- 16.- Mc Linn, S.E. et al: Antimicrobial Susceptibility of Haemophilus influenzae, *Pediatrics*, 45: 827-38 (1970).
- 17.- Ranhand, J.M. et al: Effects of antibiotics selected and other inhibitors on competence development in Haemophilus influenzae . *J. Gen. Microbiol.* 55:37-43 (1969).
- 18.- Strauss, R.G. et al: Is typing of Haemophilus influenzae - unnecessary. *Pediatrics*, 46:646-8 (1970).
- 19.- Strauss, Wood, S.H.: In vitro sensitivity studies of Haemophilus influenzae-typable and non typable. *Pediatrics* --- 38:214-9 (1967).
- 20.- Smith, E.W. Jr.: Changig incidence of Haemophilus influenzae meningitis. *Pediatrics* 50:723-7 (1972).
- 21.- Smith y Martin: Bacteriología de Zinzzzer. UTEHA 552-557 --- (1967).
- 22.- The Merck Index. Merck and Co. 75, 141, 22, 233, 485, 499- y 751., (1968).
- 23.- Wilson, G.S. and Miles, A.A.: Principles of Bacteriology - and Immunity. Edward Arnold LTD, V.I, 957-970 (1964).