



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**AISLAMIENTO DE Haemophilus influenzae
EN EL INER:
BIOTIPIFICACIÓN, SEROTIPIFICACIÓN Y
SUSCEPTIBILIDAD.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
MIRIAM GALICIA VELASCO



FACULTAD DE
QUIMICA

MÉXICO, D.F.

2002



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

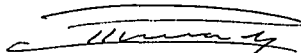
Jurado asignado:

Presidente Prof. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal Prof. ANTONIO CASTILLO DURAN
Secretario Prof. EDUARDO RIVERA MARTÍNEZ
1er Suplente Prof. MA. DE LOS ANGELES GRANADOS SILVESTRE
2do Suplente Prof. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

Asesor: McM Dr. EDUARDO RIVERA MARTÍNEZ



Supervisor técnico: Biol. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ



Sustentante: MIRIAM GALICIA VELASCO

Miriam Galicia V.

Dedicado a:

A Dios por darme la vida, una hermosa familia y todas las oportunidades.

A mis padres: por confiar en mí, por apoyarme, por que supieron guiarme por el mejor camino, por que más de una vez han compartido conmigo alegrías, tristezas y desvelos. MIL GRACIAS.

A mis hermanos Javier y Gustavo por siempre darme el mejor ejemplo y por su apoyo.

A mis pequeños: Mauricio, Rocío y Diana Lizbeth por toda la alegría que le han dado a mi vida.

A mis cuñadas: Paz y Rocío.

A mis abuelitas: Amelia y Rafaela porque de una u otra forma siempre han estado conmigo.

A mis amigos: Liliana Pérez R., Ma. Elena Jiménez M., Rocío García F., Ulises Morales C., Verónica García H., Leonila Martínez M., Gladis Balcázar, Gonzalo Castillo y todos aquellos que escapan de mi memoria por que me han permitido compartir hermosos momentos durante todo el tiempo que tengo de conocerlos y así lograr formar un excelente grupo de amigos..

A mis amigos del Ceparío: Luciano, Antonieta, Laura y Rosario.

A mis compañeros del INER: Lina Larios, Ma. del Carmen García, Claudia Sánchez, Cecilia Cerón, Lourdes Infante, Guadalupe Fiallega, Elizabeth Juárez, Gloria Olivares y Fernando Morales.

A mis amigos del Instituto de Cardiología: Miguel, Anita y Chela.

Agradecimientos

A la Q.F.B. Rosario Vázquez Larios por que gran parte de este trabajo se realizo gracias a su apoyo e insistencias. Gracias.

Al Dr. Eduardo Rivera Martínez por darme la oportunidad y confianza para trabajar con el este proyecto.

Al Biol. Luciano Hernández Gómez por ayudarme a abrírme las puertas puesto que sin su ayuda no estaría donde estoy ahora.

Al Dr. Francisco Quiñones Falconi por su confianza y apoyo para que lograra terminar este trabajo.

INDICE

CAPITULO I

1. Introducción	5
1.1. Planteamiento del problema.	5
1.2. Objetivos	6
1.3. Hipótesis	6

CAPITULO II

2. Antecedentes	8
2.1. Generalidades	8
2.2. Infecciones	9
2.3. Epidemiología mundial de <i>Haemophilus influenzae</i>	11
2.4. Epidemiología en México de <i>Haemophilus influenzae</i>	12
2.5. Características del género <i>Haemophilus</i>	13
2.5.1. Características microscópicas y macroscópicas	13
2.5.2. Características fisiológicas	13
2.6. Identificación de <i>Haemophilus influenzae</i>	15
2.6.1. Requerimientos de factores X y V	15
2.6.2. Identificación	16
2.6.2.1. Presuntiva	16
2.6.2.2. Microsistemas	18
2.6.3. Serotipificación	19
2.7. Antimicrobianos	23

2.7.1. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de <i>Haemophilus influenzae</i>	31
2.7.2. Epidemiología mundial del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de <i>Haemophilus influenzae</i>	32
2.7.3. Epidemiología en México del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de <i>Haemophilus influenzae</i>	37

CAPITULO III

3. Parte experimental	39
3.1. Diagrama de flujo	39
3.2. Material	41
3.2.1. Material biológico	41
3.2.2. Medios de cultivo	42
3.2.3. Reactivos	44
3.2.4. Agentes antimicrobianos	44
3.2.5. Material diverso	45
3.3. Metodología	46
3.3.1. Recuperación de las cepas	46
3.3.2. Identificación	46
3.3.2.1. Presuntiva	46
3.3.2.2. Microsistema VITEK (Definitiva)	46
3.3.2.3. Serotipificación	47
3.3.3. Métodos de sensibilidad antimicrobiana	48
3.3.3.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)	49
3.3.3.2. Prueba de difusión en agar (Kirby Bauer)	51

3.3.3.3. Prueba de detección de β - lactamasa	52
---	----

CAPITULO IV

4. Resultados	54
---------------	----

CAPITULO V

5. Discusión	78
--------------	----

CAPITULO VI

6. Conclusiones	87
-----------------	----

CAPITULO VII

7. Apéndice	89
-------------	----

CAPITULO VII

8. Bibliografía	94
-----------------	----

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones de vías respiratorias son un problema de salud pública y causan alta morbilidad entre la población. Los microorganismos involucrados pueden ser muy variados, siendo uno de ellos *Haemophilus influenzae* que fue aislado por Pfeiffer en 1890⁽⁶⁷⁾. Su nombre se debe a que fue aislado de pacientes que mostraban un cuadro clínico denominado influenza. En un inicio se pensaba que *Haemophilus influenzae* era el responsable de dicho cuadro, actualmente se sabe que es producido por el virus de la influenza; de ahí que exista controversia sobre el significado clínico de un cultivo positivo para *Haemophilus influenzae*, puesto que algunos autores lo consideran agente causal de enfermedades como meningitis, faringitis aguda, laringotraqueobronquitis, epiglotitis, bronquitis, sinusitis aguda y neumonía. Algunos autores consideran que en presencia de este microorganismo, los pacientes con enfermedades respiratorias crónicas se pueden agravar, mientras otros consideran solo perteneciente a la flora normal y que en ocasiones solo participa exacerbando el cuadro clínico; estas observaciones las hacen generalmente basadas en la especie, biotipo y serotipo al que pertenece el microorganismo aislado⁽¹⁸⁾.

El presente trabajo se enfoca a la identificación, biotipificación y serotipificación de las cepas aisladas de pacientes con enfermedades respiratorias, así mismo se asocia con él diagnóstico clínico, para determinar con ello el papel con el que participa *Haemophilus influenzae* en la patogenia de enfermedades respiratorias⁽⁶³⁾. Aunado a la importancia de conocer el agente

etiológico de la enfermedad es indispensable determinar la susceptibilidad de este a los agentes antimicrobianos de elección.

1.2 OBJETIVOS:

- * Determinar los serotipos y biotipos de *Haemophilus influenzae* frecuentes en infecciones del tracto respiratorio.
- * Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Haemophilus influenzae* a los antibióticos de elección usados en el tratamiento de las principales enfermedades respiratorias, así como determinar la producción de β lactamasa.
- * Determinar la concordancia entre las técnicas de difusión en agar y microdilución en caldo para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Haemophilus influenzae*.

1.3 HIPÓTESIS

- * El biotipo y serotipo más frecuente será el II y el b
- * Los microorganismos aislados tendrán alta resistencia a la ampicilina.
- * El 25% de los aislados serán productoras de β lactamasa

CAPITULO II

2. ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES

Haemophilus influenzae del serotipo b (*Hib*) es el principal causante de la meningitis bacteriana en la población de los países del continente americano. El 65% de las infecciones ocurren en infantes menores de 2 años y se eleva hasta el 85% a los cuatro años, rara vez es causa de infección antes de los dos meses de edad o después de los 7 años ⁽⁸⁴⁾. Además de causar la meningoencefalitis bacteriana aguda o meningitis purulenta, es el agente etiológico de otras enfermedades sistémicas o invasivas (neumonía, epiglotitis, laringotraqueitis, celulitis, artritis séptica, osteomielitis, pericarditis, septicemia)⁸⁵. Existen otras cepas de *H. Influenzae* de serotipos diferentes al b o no tipificables serologicamente, que comúnmente están involucrados en enfermedades localizadas o infecciones superficiales (otitis media, sinusitis, conjuntivitis y bronquitis crónica)⁽⁸⁷⁾.

También es posible aislar *H. influenzae* como parte de la flora respiratoria alta⁽⁷⁹⁾ y se ha reportado colonización en un 2-6 % de niños, pero puede llegar hasta un 60% en centros de cuidados diurnos como guarderías. Por ende, la recuperación de *H. influenzae* de muestras de esputo, exudados faríngeos, etc. puede reflejar tan sólo la presencia de estos microorganismos como parte de la flora de nasofaringe normal y no la etiología de una enfermedad per se. Sin embargo, en los individuos con problemas respiratorios crónicos, como bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasias, carcinoma broncogénico y sinusitis, *H. influenzae* capsulado y no capsulado puede causar infecciones respiratorias graves. ⁽³⁶⁾

2.2. INFECCIONES.

Entre las principales enfermedades causadas por el género *Haemophilus* se encuentran:

- Neumonía: Las manifestaciones clínicas de la neumonía por *H. influenzae* no se diferencian de otras neumonías bacterianas: fiebre, tos y esputo purulento, habitualmente de varios días de duración.: *H. influenzae* representa una causa importante de neumonía bacteriana del adulto adquirida en la comunidad. Las cepas de *H. influenzae* no tipificables (HiNT) producen más del 80% de estas infecciones. En general afecta a pacientes de edad avanzada con enfermedad pulmonar crónica o historia prolongada del tabaquismo. Los enfermos con infección por VIH también sufren infecciones respiratorias graves por *H. influenzae* serotipo b y no tipificables y muestran aparentemente una mayor incidencia de bacteremias.
- traqueobronquitis Posiblemente HiNT interviene en la reincidencia de la bronquitis aguda en los enfermos con patología pulmonar obstructiva. Sin embargo, este microorganismo también se detecta en los cultivos seriados de esputo de la mayoría de los pacientes con bronquitis crónica durante las fases asintomáticas, por lo que su presencia no implica necesariamente una actividad patógena. El aislamiento de HiNT en el esputo durante las recaídas, el desarrollo de anticuerpos séricos contra HiNT después de la reaparición y la respuesta del paciente a los antibióticos sugieren que HiNT constituye el agente etiológico de muchas recaídas de la bronquitis crónica ^{13,72}.
- Meningitis: *H. influenzae* es la causa más común de meningitis en los niños entre 2 meses y 2 años de edad; el 95% de los casos obedecen a *H.*

influenzae serotipo b. La introducción de la vacuna con polirribosa ribitol fosfato capsular purificado (PRP) de Hib en 1991 ha reducido la incidencia de meningitis por Hib. En el adulto *H. influenzae* es una causa poco frecuente de meningitis; aproximadamente la mitad de las cepas son HiNT.

- Sepsis En los niños pequeños, Hib es la principal causa de artritis séptica y se asocia a menudo a sepsis. La celulitis por Hib, que acompaña a la sepsis, es también una causa significativa de morbi - mortalidad, en este grupo de edad.
- Otitis media. Las cepas HiNT son responsables del 20 al 40% de los casos de otitis media infantil, confirmadas bacteriológicamente, es la enfermedad más frecuente en la primera infancia y hasta un 60 al 70% de los niños experimentan 1 a 3 otitis antes de los 2 años.
- Infecciones obstétricas y neonatales: Las infecciones obstétricas por *H. influenzae* representan una complicación peligrosa del embarazo, ya que la infección afecta tanto a la madre como al feto debido a la transmisión materno-fetal del patógeno. Casi siempre las cepas aisladas son HiNT, los síntomas maternos y fetales ocurren a las 24 horas del nacimiento, se observa un alto índice de partos prematuros y la mortalidad infantil es muy elevada.
- Epiglotitis aguda: *H. influenzae* constituye una causa importante de epiglotitis en el adulto. De acuerdo con una amplia revisión, la incidencia de epiglotitis aguda en el adulto es de 97 casos por millón de habitantes. La edad media es de 44 años con una distribución similar por sexos. Los enfermos presentan una elevación de temperatura, faringitis, (90%), disfagia (80%), dificultades respiratorias (45%) y ronquera o babeo. La mortalidad es del 7%; todas las muertes obedecen a la obstrucción respiratoria.

2.3. EPIDEMIOLOGÍA MUNDIAL DE *Haemophilus influenzae*

Hacia 1974 a 1980 *Haemophilus influenzae* serotipo b era aislado entre un 17 a un 46% principalmente de muestras de líquido cefalorraquídeo y sangre y las cepas no tipificables se encontraban entre un 50 a un 80%.^(1,25,71,88) En 1982 se aislaron 70% de Hib y 29% de HiNT en un estudio realizado en Estados Unidos de Norte América (E.U.A.) a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, expectoración entre otros, mientras que para el año de 1988 se aislaron solo 26.9% de cepas Hib y 72.1% de HiNT en otro estudio realizado en donde la mayoría de las cepas fueron aisladas de muestras como expectoración, exudados de oído, ocular etc.⁽²⁵⁾

En la década de los 90s en los EUA las infecciones por Hib fue la causa más importante de morbi-mortalidad en niños en enfermedades tales como meningitis, artritis, neumonía, celulitis, osteomielitis y epiglotitis, afectando a cerca de 25,000 pacientes anualmente, Sin embargo, actualmente la incidencia de enfermedades invasivas por Hib en algunas ciudades tales como Helsinki, Finlandia y Cleveland, Ohio en los EUA ha descendido prácticamente a cero, en relación con el uso rutinario de vacunas conjugadas vs. Hib a partir de los primeros doce años de vida.

Estudios realizados con punción pulmonar en niños con neumonía describen 61% de cultivos positivos, de los cuales 24 a 40% corresponden a *Haemophilus influenzae*.⁽⁸⁷⁾ En niños con diagnóstico de infección articular piogénica se recupera Hib en el 46%. La tasa de portadores nasofaríngeos de Hib y HiNT en la edad pediátrica varía de 3-10% y de 15-85% respectivamente; mismo

que se incrementa hasta seis veces durante los episodios de infecciones respiratorias superiores.

2.4. EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO DE *Haemophilus influenzae*

Aunque con la introducción de vacunas conjugadas se ha reducido la incidencia de infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* serotipo b en ciudades de los Estados Unidos y Europa, Hib es una de las mayores causas de meningitis bacteriana en ciudades de América Latina incluyendo México. ⁽⁷⁹⁾

De los estudios realizados en pacientes con posible meningitis bacteriana, el porcentaje de cultivos de LCR positivos por alguna bacteria fue de 37 a 81% y de estos, Hib fue aislado en 9 a 69% de los casos. ⁽⁸⁰⁾ En artritis séptica en niños, 23% fueron positivos para Hib. ⁽⁸⁷⁾ Neumonía complicada con empiema pleural en niños se aislaron 28% de Hib de un total de 45 a 62 % de cultivos positivos. ⁽⁸⁷⁾

En estudios de otitis media aguda reportan 62% de cultivos positivos de donde 23% de estos son por *H. influenzae* y un estudio de sinusitis maxilar aguda con 48% de cultivos positivos de los que un 48% eran por *H. influenzae*.

Para portadores, un estudio de 800 niños sanos hubo un aislamiento del 9% de Hib y un 6% de HiNT ⁽⁸⁷⁾ Durante el periodo de julio a diciembre de 1979 se reportó el aislamiento de 800 muestras de exudados faríngeos y líquidos cefalorraquídeos, reportando un 59% de Hi b. ⁽⁸⁴⁾

2.5. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Haemophilus*.

2.5.1. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.

Los miembros pertenecientes al género *Haemophilus* son cocobacilos Gram negativos que miden de 0.2 a 0.3 μm de ancho y 1.0 a 1.5 μm de longitud, aunque algunas veces presentan formas pleomórficas, son no móviles y no esporulados pero usualmente producen cápsula. ⁽¹⁾

2.5.2. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS.

Este organismo fue llamado *Haemophilus* debido a su afección por la sangre y su incapacidad para crecer en medios de cultivo sin ella, ya que carece de la capacidad enzimática para convertir el ácido delta amino-levulinico a porfirinas. Requiere además de sustancias promotoras del crecimiento, tales como el factor X (hemina, protoporfirina IX: pigmento que contiene hierro y suministra compuestos tetrapirrólicos necesarios para la síntesis de citocromos y enzimas) y el factor V (nicotinamida-adeninucleotido (NAD): coenzima que participa en las reacciones de oxidación-reducción del metabolismo celular). ^(1,75) Cuadro No 1

El factor V es biosintetizado en gran cantidad por diversos microorganismos, como lo son *Staphylococcus aureus*, algunas *Neisserias* y levaduras. Debido a esto en cultivos mixtos en gelosa de sangre pueden verse colonias diminutas alrededor de microorganismos biosintetizadores de factor V. ⁽⁷⁵⁾

Los factores X y V se encuentran en células sanguíneas incluyendo eritrocitos de carnero que se encuentran en agar de sangre; sin embargo, la sangre de carnero también puede contener enzimas que hidrolizan lentamente e inactivan

el factor V; por lo cual, especies dependientes de factor V no crecen en medios con eritrocitos intactos. Por lo tanto, algunos laboratorios emplean gelosa chocolate el cual contiene eritrocitos lisados y en algunos otros casos utilizan medios con suplemento de Fildes, el cual es un digerido péptico de sangre de carnero que es rico en factores X y V.

En agar chocolate, las colonias de *Haemophilus* llegan a alcanzar un diámetro de 1 a 2 mm en 24 horas, estas colonias son transparentes, incoloras y brillantes, asemejan gotas de rocío.

El género *Haemophilus* se clasifica en la familia *Pasteurellaceae* que también incluye los géneros *Pasteurella* y *Actinobacillus*. El género *Haemophilus* comprende ocho especies de importancia médica humana. (Cuadro No.1)

Cuadro No.1. Factores de crecimiento de *Haemophilus species*

Microorganismo	Factor V	Factor X
<i>H. influenzae</i>	+	+
<i>H. parainfluenzae</i>	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	+	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-
<i>H. paraphrophilus</i>	+	-
<i>H. segnis</i>	+	-
<i>H. ducreyi</i>	-	+

2.6 IDENTIFICACIÓN DE *Haemophilus influenzae*^{11,55}

2.6.1 REQUERIMIENTO DE FACTORES X Y V

Existen diversas pruebas para determinar el requerimiento de factores de crecimiento.

- a) La prueba del satelitismo que es la capacidad del microorganismo de crecer alrededor de una cepa productora de factor V como es *Staphylococcus aureus*. Para que la prueba sea confiable se debe realizar en un medio de cultivo que carezca completamente de factor V para lo cual se prefiere utilizar gelosa sangre, en la cual se le agrega la sangre antes de esterilizar ya que como el factor V es termolábil se habrá eliminado toda posibilidad de que el medio contenga este factor y el medio tendrá factor X en suficiente cantidad.
- b) En el comercio existen tiras impregnadas de factor X y factor V con lo cual se pueden hacer pruebas de factores de crecimiento. Los factores X y V son hidrosolubles, difunden fácilmente en medios de cultivo con agar. Las tiras o discos impregnados con estos factores se colocan en la superficie de un medio deficiente en factores X y V, como infusión de cerebro corazón, o agar tripticasa soya⁽⁶⁹⁾ que se ha inoculado con el microorganismo en estudio. El requerimiento de factores X y V por parte del microorganismo puede determinarse observando el patrón de desarrollo de colonias alrededor de las tiras o discos de papel.
- c) Quad plate: es una caja petri dividida en cuatro cuadrantes conteniendo:
Cuadrante 1: factor X
Cuadrante 2: factor V

Cuadrante 3 Factor X y V

Cuadrante 4: factor X y V mas sangre de carnero

El desarrollo de la cepa en determinado cuadrante y la presencia o ausencia de hemólisis nos proporcionara la especie de *Haemophilus*.⁽⁶³⁾

- d) Discos de ácido aminolevulinico: La habilidad de la síntesis de porfirinas a partir de ácido delta aminolevulinico es determinada por estos discos. La síntesis de porfirinas nos indica el requerimiento de factor X (hemina).⁽⁶³⁾
- e) Agar porfirina. Para esta prueba se requiere sembrar la cepa en una placa de agar porfirina e incubarse por 18 a 24 horas en atmósfera de 5 a 10 % de CO₂. Las placas son leídas bajo luz UV (longitud de onda de 350 nm.), aquellas que presentaban fluorescencia naranja nos indica la dependencia a hemina o factor X.⁽³¹⁾

2.6.2 IDENTIFICACIÓN

2.6.2.1. PRESUNTIVA

Pruebas bioquímicas.

Para realizar una correcta identificación de las especies de *Haemophilus* se recurre a una serie de pruebas bioquímicas como lo son la fermentación de algunos carbohidratos, la presencia de enzimas y la presencia o ausencia de crecimiento en atmósfera de CO₂, como se observa en el cuadro No. 2.⁽⁵³⁾

Cuadro No. 2. Características diferenciales del Género *Haemophilus*⁵².

Microorganismo	Fermentación de:					Presencia de catalasa	ONPG	↑ en CO ₂
	Glu	Sac	Lac	Man	Xil			
<i>H. influenzae</i>	+	-	-	-	V	+	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	-	-	-	V	+	-	-
<i>H. ducreyi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	+	+	-	+	-	V	V	V
<i>H. parahaemolyticus</i>	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>H. segnis</i>	D	D	-	-	-	V	V	-
<i>H. paraphrophilus</i>	+	+	+	+	V	-	-	+
<i>H. aphrophilus</i>	+	+	+	+	-	-	+	+

Glu: glucosa, Sac: sacarosa, Lac: lactosa, Man: manosa, Xil: xilosa

Biotipificación.

Killian descubrió un sistema para biotipificar *Haemophilus influenzae* en 1976 basado en un número limitado de pruebas bioquímicas. Para poder designar un biotipo a cada cepa de *Haemophilus influenzae* se recurre a las pruebas bioquímicas de indol, ureasa y ornitina descarboxilasa. ⁽⁷⁹⁾ (Cuadro No.3)

Cuadro No. 3. Diferenciación de biotipos según la clasificación de Killian. ⁽¹⁾

Biotipo	Indol	Ureasa	Ornitina descarboxilasa
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
VI	-	-	+
VII	+	-	-
VIII	-	-	-

2.6.2.2. MICROSISTEMAS.

Los principales métodos convencionales para identificar esta bacteria están basados en el uso de medios selectivos y enriquecidos y requerimientos nutricionales adicionados a pruebas bioquímicas. Estos métodos son tediosos y consumen demasiado tiempo lo que hace necesario la utilización de microsistemas. ⁽⁴⁾ Los principales microsistemas se describen en el Cuadro No 4.

Cuadro No. 4 Principales microsistemas empleados en la identificación de *Haemophilus influenzae*

Microsistema	Azucres	Killian	Inoculo	Tiempo de incubación
Minitek System (3)	Gl, M, L, S, G, Ml, F, Mn, X	O, I, U	Susp. densa	Toda la noche
Micro-ID (26)	A, Ad, In, Sb	O, I, U	3 Mc Farland	4 hrs
API NH (4)	Gl, Ml, S	O, I, U	4 Mc Farland	4 hrs
RIM-H System (73)	Gl, L, S,	-	Susp. densa	2 hrs.
Trio Tubo (64)	S	O, I, U	Susp. densa	Toda la noche
RapID NH (22)	Gl, S	O, I, U	3 Mc Farland	5 hrs
HNID (44)	Gl, S, Ml, F, L	O, I, U	3 Mc Farland	3 hrs
NHI (45)	Gl, S, Ml	O, I, U	3 Mc Farland	4 hrs

L: lactosa, S: sucrosa, G: galactosa: Ml: maltosa, F: fructuosa, Mn: manosa,

X: xilosa, Gl: glucosa, A: arabinosa, Ad: adonitol, In: inositol, Sb: sorbitol.

2.6.3. SEROTIPIFICACIÓN

La importancia clínica de *H. influenzae* en enfermedades humanas fue informada por primera vez por Pitman en 1931 quien observa que las cepas con cápsula eran las responsables de la meningitis y otras infecciones purulentas; asimismo propuso que el serotipo b como aquel que presenta la mayor virulencia.

Las cepas capsuladas se clasifican en 6 serotipos de acuerdo a su composición química, designado de la a a la f. (Cuadro No. 6).

Cuadro No.5 Polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae*⁸²

Serovar	Azúcar	Fosfato	Acetil
A	Glucosa	+	-
B	Ribosa y ribitol	+	-
C	Galactosa	+	-
D	Hexosa	-	-
E	Hexosamina	-	-
F	Galactosamina	-	+

El principio de la tipificación serológica de *H. influenzae* involucra la mezcla de una porción de la bacteria de los cultivos caracterizados bioquímicamente con una gota de suero hiperinmune (anticuerpo). Si la mezcla aglutina para el antígeno presente en el organismo, identifica el serotipo del organismo.

Existen varios métodos para serotipificar entre los que se encuentran:

- ❖ La aglutinación en portaobjetos: Es la prueba más simple y fácil de interpretar, no presenta autoaglutinación, emplea pequeñas cantidades de anticuerpo y el tiempo de aglutinación es de dos minutos.^(37,40,78,39)
- ❖ La reacción de Quellung: es simple de desarrollar pero el hinchamiento de la cápsula es más difícil de leer que la aglutinación en portaobjetos, requiere cantidades mínimas de anticuerpo y el tiempo de aglutinación es de 5 minutos.^(40,39)
- ❖ Aglutinación en látex: en esta prueba existen problemas de lectura ya que la aglutinación es débil y se han observado reacciones cruzadas al

realizarla, es de las pruebas que requieren de la menor cantidad de anticuerpo detecta hasta 5 ng/mL de polisacárido capsular y requiere de al menos 2 minutos de tiempo de aglutinación. (39,40,17,78,41,37,15,57,58)

- ❖ **Contrainmunolectroforesis:** es la técnica más sofisticada y por lo mismo es más cara, el resultado es fácilmente interpretable, se pueden correr varias pruebas simultáneamente y no ocurren reacciones cruzadas, se emplea poca cantidad de anticuerpo, esta técnica es capaz de detectar hasta 20ng/mL de polisacárido capsular es de las pruebas que requieren mayor tiempo. (40,78,41,37,15,57,39)
- ❖ **Agar antisuero** tiene la ventaja que las muestras pueden ser sembradas directamente en estas, las colonias pueden ser tipificadas sin necesidad de posteriores resiembras, requiere de grandes cantidades de anticuerpo y requiere de al menos 2 días para desarrollarse. (40,39)
- ❖ **Inmunofluorescencia:** esta técnica puede detectar cepas mutantes que no es posible detectar por otras técnicas, es capaz de detectar hasta 0.5 ng/mL siendo la que menor cantidad de polisacárido capsular detecta, pero es la prueba que requiere del equipo más caro. (40, 57)
- ❖ **Coaglutinación:** es de fácil interpretación y es capaz de detectar menor cantidad de bacterias que el método de aglutinación en látex. (78, 33, 15, 37)

El cuadro No. 6 presenta la capacidad de detección de cada método y la cantidad de anticuerpo que emplean algunos de ellos.

Cuadro No. 6. Capacidad de detección de las principales técnicas de aglutinación

Técnicas	Capacidad de detección	Cantidad de anticuerpo
Aglutinación en portaobjetos	10^{10} UFC/mL	-
Reacción de Quellung	-	-
Aglutinación en látex	10^2 UFC/mL o 0.5 ng/mL PSC	20 μ l
Contrainmunolectroforesis	10^3 UFC/mL o 5-20 ng/mL PSC	10 μ l
Agar antisuero	-	>>
Inmunofluorescencia	0.5 ng/mL PSC	-
Coaglutinación	< 10 ng/mL PSC	-

PSC Polisacárido capsular

2.7 ANTIMICROBIANOS

La selección óptima y juiciosa de antimicrobianos para combatir enfermedades infecciosas exige juicio clínico y conocimiento detallado de los factores farmacológicos y microbiológicos. Los antibióticos se utilizan en dos formas generales, como terapéutica empírica y como fármacos definitivos. Si se usan de manera empírica o como terapéutica inicial, el antibiótico debe atacar a todos los microorganismos patógenos posibles porque no se ha identificado al microorganismo o microorganismos infectantes. Sin embargo, una vez identificado al agente infectante habrá que emprender la antibiótico terapia definitiva, es decir, con espectro preciso para completar el ciclo terapéutico. Cuando está indicado un antimicrobiano, la meta es seleccionar un producto que sea activo de manera selectiva contra el o los microorganismos infectantes¹⁹.

El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) sugiere una guía para seleccionar y reportar los antibióticos adecuadamente de acuerdo a los siguientes grupos:

Grupo A: Grupo de elección primario

Grupo B: Solo se reportan si los antibióticos de su misma clase del Grupo A son resistentes.

Grupo C: Solo en caso de microorganismos resistentes a los grupos A y B.

Grupo O: Son indicados clínicamente pero no son los mejores candidatos

Los antibióticos recomendados por el NCCLS para *Haemophilus influenzae* son:

β -lactámicos

Ampicilina (A)

β - lactámico / β - lactamasa inhibidor

Ampicilina / sulbactam (B), Amoxicilina / ácido clavulánico (C), Piperacilina / tazobactam (O)

Cefalosporinas (parenteral)

Cefotaxima (B), Ceftazidima (B), Ceftrizoxima (B), Ceftriaxona(B), Cefuroxima de sodio (parenteral) (B), Cefonicid (C), Cefamandole (O), Cefepime (O).

Cefalosporinas (oral)

Cefaclor (C), Cefprozil (C), Loracarbef (C), Cefdinir (C), Cefixime (C), Cefpodoxime (C), Cefuroxima axetil (oral) (C), Ceftibuten (O).

Carbapenems

Meropenem (B), Imipenem (C).

Monobactams

Aztreonam (C)

Macrólidos

Azitromicina (C), Claritromicina (C)

Tetraciclinas

Tetraciclina (C)

Fluoroquinolonas

Ciprofloxacina (C), Levofloxacina (C), Lomefloxacina (C), Ofloxacina (C), Sparfloxacina (C), Grepafloxacina (C), Trovafloxacina (O).

Inhibidores de la síntesis de folato

Trimetoprim / sulfametoxazol (A)

Fenicol

Cloramfenicol (B)

Clasificación de los antibióticos:

Los antibióticos se pueden clasificar de acuerdo a su estructura química, mecanismo de acción y su efecto antimicrobiano como se muestra en el cuadro No. 7

Cuadro No. 7. Clasificación de los antibióticos^{34,59,66}

GRUPO	BLANCO CELULAR	EFEECTO ANTIMICROBIANO
β -lactámico	Pared celular	Inhibe la síntesis de la pared celular
β -lactámico / inhibidor de β - lactamasa	Enzima β -lactamasa	Inhiben la acción de la enzima β -lactamasa evitando la destrucción del antibiótico β -lactámico
Cefalosporinas	Pared celular	Inhibe la síntesis de la pared celular
Carbapenems	Pared celular	Inhibe la síntesis de la pared celular
Monobactams	Proteínas ligadoras de penicilina	Forma estructuras filamentosas largas que la hacen no viable

Macrolidos	Subunidad ribosómica 50S	Inhibe la síntesis de proteínas
Tetraciclinas	Subunidad ribosómica 30S	Inhibe la síntesis de proteínas
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girasa	Inhibe el superenrollamiento
Inhibidores de la síntesis de folatos	Enzima dihidrofolato reductasa	Inhibe la síntesis del ácido fólico
Fenicol	Subunidad ribosómica 50S	Inhibe la síntesis de proteínas

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Aunque en todo diagnóstico es importante la identificación del agente causante de la enfermedad lo es aun más el conocer el perfil de susceptibilidad antimicrobiana del agente patógeno a los diversos agentes antimicrobianos.

El NCCLS menciona que las pruebas de sensibilidad antimicrobiana son indicadas para microorganismos que contribuyen a un proceso infeccioso, garantizando quimioterapia antimicrobiana si es que esta sensibilidad antimicrobiana no puede ser predicha con conocer la identidad del organismo identificado y cuando el organismo causante se piensa pertenece a especies capaces de exhibir resistencia a los antimicrobianos comúnmente usados²⁰.

La resistencia antimicrobiana ha desarrollado rápidamente un cambio significativo en la salud global porque un gran número de microorganismos adquiridos en la comunidad y nosocomiales de infecciones respiratorias han desarrollado multirresistencia. ⁽⁵¹⁾

La resistencia antimicrobiana puede tener un impacto substancial en el cuidado de la salud por los efectos adversos en la morbi-mortalidad incrementando las oportunidades para transmitir enfermedades por si el tratamiento falla.

La susceptibilidad antimicrobiana de *Haemophilus influenzae* se realiza principalmente por dos métodos:

1. El método de microdilución en caldo.
2. La prueba de difusión en agar

Prueba de microdilución en caldo. La susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos a los antibióticos es determinada en una serie de pocillos que están moldeados en una placa plástica de 96 receptáculos cada uno de los cuales tiene una concentración diferente del antibiótico. Este método tiene la ventaja de usar pequeños volúmenes de reactivos y el gran número de bacterias que pueden ser probadas de forma simple y poco costosa.

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar (Kirby Bauer). La figura 1 ilustra el principio del método de difusión en agar para la comprobación de la susceptibilidad antimicrobiana. Tan pronto como el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el agua es absorbida por el papel filtro y el antibiótico difunde al medio que lo rodea, a medida que aumenta la distancia del disco, se produce una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico. Cuando se alcanza una masa de bacterias crítica, la actividad inhibitoria del antibiótico es superada y se produce el crecimiento bacteriano.

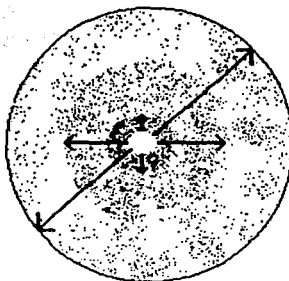


Figura 1. Principio de la técnica de difusión en agar

Control de calidad

Los criterios empleados para asegurar la precisión y reproducibilidad de las determinaciones en los valores de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son 2:

- * El uso de métodos estandarizados y controlados

Procedimientos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana deben usar métodos estándar que sean reproducibles y apropiados para la especie bacteriana que será probada. Especificaciones tales como preparación de inóculo, medio de prueba y cepas de control de calidad deben ser seguidas exactamente y manteniéndose constantes entre pruebas. Variaciones en condiciones de crecimiento, las propiedades nutricionales del medio o el tipo de prueba pueden reflejar variación en los resultados.

La elección del medio de crecimiento, particularmente para organismos fastidiosos, puede ser compleja. Este puede afectar enormemente el crecimiento

bacteriano y por lo tanto en la confiabilidad de los resultados. El medio de crecimiento debe ser estandarizado y prácticamente aplicable. Por ejemplo, Haemophilus test médium (HTM) es recomendado por el NCCLS para probar *Haemophilus sp.*. Sin embargo, dificultades en la preparación del HTM y en obtener este comercialmente con una alta calidad, acompañado de su corto tiempo de vida y falla para soportar el crecimiento de muchas cepas, hacen a este un medio problemático para su uso⁴⁸. Reconociendo este problema el NCCLS adoptó una recomendación en las pruebas rutinarias en la manufactura de HTM con *H. Influenzae* ATCC 10211 por sus características que se comentan más adelante.

* El uso de cepas control definidas

Las cepas de control de calidad son frecuentemente usadas para determinar la validez de los resultados. Estas permiten la verificación de los resultados de la determinación del CIM proporcionando cepas con un rango de CIM conocido. ⁽⁴²⁾

Para organismos fastidiosos tales como *H. Influenzae* se recomienda el uso de una cepa no tipificable β -lactamasa negativa, ampicilina resistente (BLNAR) ATCC 49247 como control de calidad en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para *Haemophilus sp.* debido a su adecuada precisión inter e intra laboratorio. ⁽¹⁰⁾

Sin embargo resultados inconsistentes en el control de calidad fueron observados en agar HTM cuando agentes antimicrobianos como cefaclor, cefuroxima, cefamandole y cefunícid fueron probadas contra la cepa ATCC

49247⁵⁰. Por esta razón un estudio fue hecho para identificar una cepa alternativa de control de calidad con cefaclor, cefuroxime, cefamandole, cefonicid y loracabef. La NCCLS reemplazó la cepa ATCC 49247 por la cepa ATCC 49766 como la cepa recomendada para control de calidad de los antibióticos antes mencionados. ⁽⁵⁾

Para la prueba de antibióticos betalactámicos combinados con un inhibidor de betalactamasa el NCCLS no provee una cepa de *Haemophilus influenzae* capaz de detectar la presencia de una adecuada cantidad del inhibidor de β -lactamasa como componentes de amoxicilina – ácido clavulánico, ampicilina – sulbactam y piperacilina – tazobactam. Debido al alto porcentaje de cepas productoras de β -lactamasa es crítico que en el control de calidad se asegure que hay una adecuada cantidad de inhibidor de β -lactamasa presente. Las cepas productoras de betalactamasa de *H. Influenzae* no son adecuadas para usarse como microorganismos de control de calidad en evaluaciones de ácido clavulánico contenido en amoxicilina – ácido clavulánico. Esto es debido al alto nivel de actividad de las β -lactamasas TEM-1 y ROB-1 producidas por *Haemophilus influenzae*. Sin embargo, *Escherichia coli* ATCC 35218 es recomendado por el NCCLS como microorganismo de control de calidad para los agentes β -lactámico / β -lactamasa inhibidor, el NCCLS recomienda realizar esta prueba con Mueller Hinton, sin embargo, Butler et al ⁽¹⁰⁾ lo realiza con HTM, el medio indicado para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *Haemophilus influenzae* encontrando resultados aceptables para poder realizarse en este medio.

Cuando existe un crecimiento inadecuado en HTM, es probablemente debido al factor X constituyente del medio el cual es suplementado en la forma de

hemina purificada. La hemina es pobremente soluble y extremadamente inestable. Algunos aislamientos clínicos de *H. Influenzae* pueden tener requerimientos de factor X muy altos. Tales cepas son caracterizadas por zonas de crecimiento cercanas a las tiras impregnadas de factor X o V en pruebas de satelitismo. Estas cepas pueden fallar al crecer en HTM si este ha sido preparado inadecuadamente o que ha sido guardado por prolongados periodos de tiempo. La cepa de *H. Influenzae* ATCC 10211 tiene altos requerimientos de factor X por lo cual los laboratorios lo usan como control de crecimiento. ⁽²¹⁾

2.7.1. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Haemophilus influenzae*.

En el género *Haemophilus* se ha encontrado a lo largo de la historia la aparición de cepas resistentes ⁴⁹. En la década anterior a 1972 las infecciones se trataban empíricamente con ampicilina, tratamiento que se llevaba a cabo con éxito, debido a que los aislamientos eran universalmente susceptibles en esa época.

El primer aislamiento resistente a ampicilina fue documentado en Europa en 1972 y en los EUA en 1973-1974, en cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b.

El mecanismo para la resistencia antimicrobiana a ampicilina en estas cepas fue la producción del plásmido – mediador β - lactamasa (TEM-1), recientemente una segunda enzima denominada ROB-1 fue encontrada, aunque es poco frecuente, en aislamientos de *Haemophilus influenzae* ^{62,64,65}. La

prevalencia de la β - lactamasa ROB-1 no ha sido completamente establecida quizá por su dificultad para detectarlo.

En 1976 se encuentra resistencia a cloramfenicol debido a la producción de una enzima inactiva. ^(2,4) la cloramfenicol acetil transferasa. Posteriormente se encontraron cepas cloramfenicol acetil transferasa y β lactamasa positiva.

En 1980 se encontraron cepas resistentes a ampicilina no β lactamasa positiva y esto es debido a la alteración de proteínas unidas a penicilina, esto permite a la célula continuar su proceso de división en presencia de algunos agentes β - lactámicos. Esta misma característica puede provocar la reducción de la sensibilidad antimicrobiana a algunas cefalosporinas.

Se han encontrado cepas resistentes a tetraciclina, eritromicina, SXT y rifampicina pero únicamente se conoce el mecanismo de resistencia a SXT y es debido a un exceso en la producción de dihidrofolato reductasa.

No se conocen reportes de resistencia a cefalosporinas de 3ª. Generación y fluoroquinolonas.

2.7.2. EPIDEMIOLOGÍA MUNDIAL DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Haemophilus influenzae*

β -lactámicos

Reportes encontrados en la literatura de cepas productoras de β -lactamasa van desde un 4.6% hasta 53% reportado en EUA en el año de 1976¹ y 1991²⁰. Estos reportes varían mucho de país a país así como del año en que fue reportado como se observa en el cuadro No. 8.

Cuadro No. 8. Relación de cepas productoras de β lactamasa

Pais	Año	% de cepas productoras de betalactamasa	Referencia
EUA	1976	4.6	1
EUA	1982	16	53
EUA	1988	47.3	25
EUA	1991	53	47
CANADA	1993	32.2	7
EUA	1994	36.4	23
MUNDIAL	1996	13.4	29
Argentina	1997	15.1	80
ASIA, EUROPA	1997	18	76
BRASIL	1997	12	16
CANADA	1997	24	90
EUA	1997	41.6	43
EUA	1997	34.2	24
NORTE AMERICA	1997	36.6	46
EUROPA	1998	11.6	77

La combinación de un β lactámico con un inhibidor de β lactamasa ha demostrado buena acción contra *Haemophilus influenzae* ya que su porcentaje de sensibilidad antimicrobiana ve de 99%⁹⁰ a 100%^{51,43,76,86}, solo un autor reporta

67% de sensibilidad antimicrobiana en un estudio realizado en los Países Bajos en el año de 1997³⁸, un repote más completo se presenta en el cuadro No. 9.

Cuadro No. 9. Porcentaje de susceptibilidad antimicrobiana a amoxicilina – ác. clavulánico

Pais	Año	Amoxicilina/ Ac. clavulánico	Referencia
CANADA	1994	100	51
Argentina	1997	99.5	80
ASIA, EUROPA	1997	99.5-100	76
BRASIL	1997	100	16
CANADA	1997	99	90
EUA	1997	99.8	83
EUA	1997	100	43
EUA	1997	99	24
NORTE AMERICA	1997	99.4	46
PAISES BAJOS	1997	67	38
ESPAÑA	2000	100	86

La actividad de las cefalosporinas contra *H. Influenzae* se reportan en cuadro No. 10 donde se observa que la ceftriaxona tiene la mejor actividad.

Cuadro No. 10. Porcentaje de sensibilidad antimicrobiana a cefalosporinas

Pais	Año	Cefaclor (%)	Cefuroxima (%)	Ceftriaxona (%)	Referencia
E U A	1988	94.5	97		25
Canadá	1994	98	100		51
Finlandia	1995	87.1	97.4		60
E U A	1997	78.9	98.8		43
E U A	1997	79.6	95.7		24
Norte América	1997	79.7	95.9		46
Argentina	1997-1998		99.5	100	80
Asia, Europa	1997-1998		100	100	76
Brasil	1997-1998		98.2	100	16
Canadá	1997-1998	87	98.3		90
E U A	1997-1998		100	100	83

Macrólidos

El macrólido que principalmente se reporta en la literatura contra *H. influenzae* es la claritromicina donde su sensibilidad antimicrobiana va desde un 31%⁶⁰ hasta un 94.2% (Cuadro No. 11.)

Cuadro No. 11. Porcentaje de sensibilidad antimicrobiana para claritromicina.

Pais	Año	Claritromicina (%)	Referencia
Argentina	1997-1998	37.2	80
Brasil	1997-1998	92.4	16
Asia, Europa	1997-1998	91.3-97.4	76
Canadá	1997-1998	87.4	90
España	2000	57	86
Paises Bajos	1997	31	38
E U A	1997-1998	94.2	83
E U A	1997	76.6	43
Norte América	1997	62.2	46
E U A	1997	61.4	24

Los inhibidores de la síntesis de folatos son los antibióticos que han presentado la sensibilidad antimicrobiana más reducida, en particular el trimetoprim sulfametoxazol presenta una sensibilidad antimicrobiana tan baja como del 47.9% ⁷⁶ Hasta un 82.8% ⁷⁶ solo 2 autores reportan más del 90% de sensibilidad antimicrobiana ^{25,32}.

En general las quinolonas tiene un porcentaje de sensibilidad antimicrobiana por arriba del 99%. ^{43,46,77,90,54,76,60,38,86,29,61}.

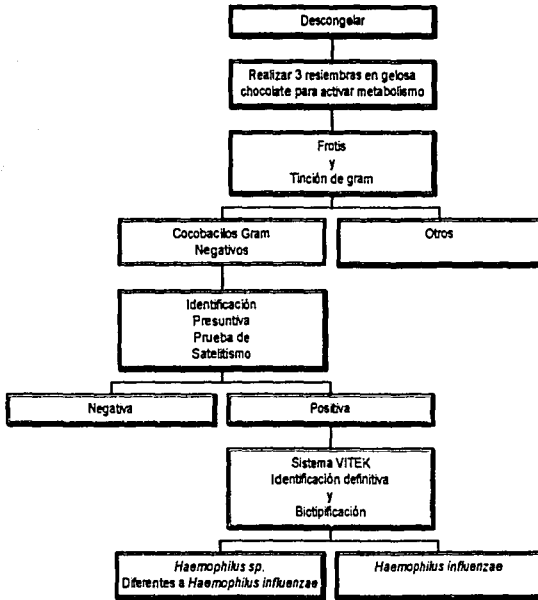
2.7.3. EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Haemophilus influenzae*

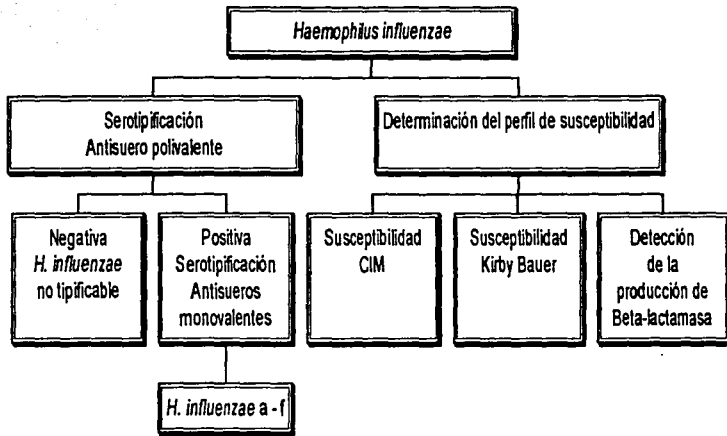
Existen muy pocos reportes de sensibilidad antimicrobiana realizados en México . Dos de ellos hechos en el año de 1981 el primerol solo reporta el 14% de resistencia a ampicilina ⁸⁴. El segundo reporta 26.80% de cepas productoras de β lactamasa, un 76% de sensibilidad antimicrobiana a ampicilina y un 95% de sensibilidad antimicrobiana a trimetoprim sulfametoxazol ³² Un estudio realizado por el Alexander Project en el periodo de 1996 a 1997 reporta datos de susceptibilidad antimicrobiana encontrados en cepas mexicanas reportando 25% de producción de β lactamasas y 25% de resistencia a trimetoprim sulfametoxazol.

CAPITULO III

3. Parte experimental

3.1 Diagrama de flujo





CIM: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

3.2 MATERIAL

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- a) 100 cepas de *Haemophilus sp* aisladas de pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias que presentaron cuadros clínicos de diferentes enfermedades respiratorias.
- b) Cepa de *Haemophilus influenzae* ATCC (American type culture collection) 10211 como control de crecimiento.
- c) Cepa de *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 como control de calidad en pruebas de susceptibilidad a antibióticos (cefactor y cefuroxima).
- d) Cepa de *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 como control de calidad en pruebas de susceptibilidad a antibióticos (ampicilina, amoxicilina / ác. clavulánico, ceftriaxona, claritromicina, ofloxacina y trimetoprim / sufametoxazol).
- e) Cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 como control de calidad en prueba de susceptibilidad antimicrobiana a amoxicilina – ác. clavulánico
- f) Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para prueba de satelitismo.
- g) Cepa de *Haemophilus influenzae* ATCC 10211 para control de β - lactamasa negativa.
- h) Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para control de β - lactamasa negativa.

3.2.2. MEDIOS DE CULTIVO.

a) Comerciales

Placas preparadas de gelosa chocolate marca BBL

Placas preparadas de gelosa sangre marca BBL

Placas preparadas de agar Thayer Martin marca BBL

b) Preparadas

Caldo HTM este medio se preparo en el laboratorio con los siguientes componentes:

- | | | | |
|------|----------------------|-------|---------|
| i. | Caldo Mueller Hinton | BBL | 21g/L |
| ii. | Hematina | SIGMA | 15µg/mL |
| iii. | NAD | SIGMA | 15µg/mL |
| iv. | Extracto de levadura | BBL | 5mg/mL |

Preparación:

- i. Solución stock de hematina. Se pesaron 50 mg de polvo de hematina y se disolvieron en 100 mL de NaOH 0.01 N (0.01 mol/L), se calentó y agitó hasta que el polvo se disolviera.
- ii. Solución stock de NAD. Se pesaron 50 mg de NAD y se disolvieron en 10 mL de agua destilada, se esterilizó por filtración.
- iii. 30 mL de solución stock de hematina se adicionaron a un litro de caldo Mueller Hinton con 5 gr de extracto de levadura. Se esterilizaron en autoclave.
- iv. Se adicionó asépticamente 3 mL de solución stock de NAD.

Agar HTM este medio se preparo en el laboratorio con los siguientes componentes:

- | | | | |
|-------|----------------------|-------|---------|
| v. | Agar Mueller Hinton | BBL | 21g/L |
| vi. | Hematina | SIGMA | 15µg/mL |
| vii. | NAD | SIGMA | 15µg/mL |
| viii. | Extracto de levadura | BBL | 5mg/mL |

Preparación:

- v. Solución stock de hematina. Se pesaron 50 mg de polvo de hematina y se disolvieron en 100 mL de NaOH 0.01 N (0.01 mol/L), se calentó y agitó hasta que el polvo se disolviera.
- vi. Solución stock de NAD. Se pesaron 50 mg de NAD y se disolvieron en 10 mL de agua destilada, se esterilizó por filtración.
- vii. 30 mL de solución stock de hematina se adicionaron a un litro de agar Mueller Hinton con 5 gr de extracto de levadura. Se esterizaron en autoclave.
- viii. Se adicionó asépticamente 3 mL de solución stock de NAD.
- ix. Se envasó en placas petri (20 mL por placa)

c) Agar Indol – Nitrito. (polvo para hidratar)

Se suspendieron 25 gr del polvo en 1 litro de agua destilada, se homogeneizó y agregó 2 gr de agar, se calentó hasta disolver el medio y distribuirlos en tubos esterilizar a 121°C durante 15 min.

3.2.3. REACTIVOS.

a) Equipo de Gram	SSA
b) Peróxido de hidrogeno al 3%.	
c) Reactivo de Erlich	SSA.
d) Solución salina al 0.45 %	bioMérieux
e) Antisueros polivalentes y monovalentes a – f	DIFCO
f) Tarjetas NHI (Sistema VITEK)	bioMérieux
g) Cloruro de calcio.	MERCK
h) Cloruro de magnesio	MERCK

3.2.4. AGENTES ANTIMICROBIANOS.

Sales

i. Amoxicilina sódica	Smith Kline Beecham
ii. Clavulanato litio	Smith Kline Beecham
iii. Ampicilina	Bristol Myers Squibb
iv. Cefuroxima	Glaxo Wellcome
v. Cefaclor	Eli Lilly
vi. Ceftriaxona	Roche
vii. Claritromicina	Abbott
viii. Ofloxacin.	Cilag
ix. Trimetoprim	Roche
x. Sulfametoxazol	Roche

Sensidiscos

i.	Amoxicilina /ác. Clavulánico	BBL
ii.	Ampicilina	BBL
iii.	Cefuroxima	BBL
iv.	Cefaclor	BBL
v.	Ceftriaxona	BBL
vi.	Claritromicina	BBL
vii.	Ofloxacina.	BBL
viii.	Trimetoprim / Sulfametoxazol	BBL
ix.	Discos de cefinasa	BBL

3.2.5. MATERIAL DIVERSO

- a) Placas para microtitulación de 96 pocillos
- b) Micropipeta multicanal 30 – 300 μ l
- c) Micropipeta 50 - 200 μ l
- d) Micropipeta 5 - 40 μ l
- e) Portaobjetos de vidrio esmerilados.
- f) Puntas para micropipeta.
- g) Contenedores con 25 ml de capacidad aproximadamente.
- h) Tubos de transferencia (sistema VITEK)
- i) Pipetas Pasteur

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. RECUPERACIÓN DE LAS CEPAS.

Se descongelaron las 100 cepas y las cepas ATCC a temperatura ambiente, se sembraron para su aislamiento en placas de gelosa chocolate¹⁴. Se resembraron por 3 días consecutivos (3 pases) para que la cepa estuviera viable y expresara el metabolismo bioquímico y patrón de susceptibilidad antimicrobiana que tenía antes de congelar.

3.3.2. IDENTIFICACIÓN.

3.3.2.1. PRESUNTIVA

- i. Frotis y tinción de Gram. (Ver apéndice) Se debieron observar coccobacilos pleomórficos Gram negativos para que se tratara presuntivamente del género *Haemophilus*.
- ii. Prueba del Satelitismo. Se sembró la cepa problema por aislamiento en una placa de gelosa sangre de carnero, usando un asa de inoculación se hizo una sola estria de *Staphylococcus aureus* ATCC 24213. Una prueba positiva se consideró cuando hubo crecimiento únicamente en la zona de hemólisis causada por la cepa de *Staphylococcus aureus*.

3.3.2.2. MICROSISTEMA VITEK. (DEFINITIVA)

Se realizó conforme a las especificaciones del proveedor. Ver Apéndice

Se realizaron las siguientes pruebas adicionales:

- i. Prueba de indol la cual se realizó inoculando la cepa problema en medio Indol-nitritos por 24 horas y revelando con reactivo de Ehrlich, una coloración rojiza indicó que la prueba era positiva.
- ii. Crecimiento en Thayer Martin el cual se realizó inoculando una placa de Thayer Martin, crecimiento en tal medio indicó que la prueba era positiva, esta prueba fue requerida por el sistema VITEK..
- iii. Prueba de catalasa se realizó tomando una colonia de la cepa y se colocó en una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, la liberación de oxígeno en forma de burbujas indicó que la prueba era positiva.

Una vez que se contó con todos los resultados con ayuda del programa NHI Vitek nos proporcionó la identificación del microorganismo (*Haemophilus influenzae*) además del biotipo, junto con el nivel de confiabilidad del resultado.

3.3.2.3. SEROTIPIFICACIÓN.

- i. Se marcó el portaobjetos con el número de la cepa
- ii. Se colocó una gota de cada antisuero (polivalente y monovalentes (a-f)) y una gota de solución salina al 0.45 % de modo que este sirvió como control negativo.
- iii. Se agregó una gota de una suspensión de la cepa hecha en solución salina a cada gota de suero.
- iv. Se mezcló e interpretó resultados después de 1 minuto.

Una aglutinación positiva en el antisuero polivalente y en uno de los serotipos individuales, con una bioquímica adecuada, confirmó el serotipo de *Haemophilus influenzae*.

3.3.3. MÉTODOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

3.3.3.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)⁶⁸

- i. Se colocó en cada pocillo 50 μ l de caldo HTM con la micropipeta multicanal.
- ii. A la columna 1 y 2 se les agregó 50 μ l del antibiótico correspondiente, la concentración fue 4 veces mayor que la concentración más alta por ejemplo para ampicilina fue de 512 μ g/mL.
- iii. Se mezcló a partir de la columna 2 y se comenzó a diluir pasando 50 μ l del pozo 2 al 3, del 3 al 4 y así sucesivamente hasta el pocillo 11, del 11 se tomaron 50 μ l y se desecharon, de manera que la placa quede como indica el cuadro No. 1
- iv. Se preparó una suspensión al No.0.5 de Mac Farland en solución salina al 0.45 % y esta se diluyo en un tubo con 10 mL de medio HTM para obtener una concentración de 5×10^5 , se inocularon de los pocillos 2 al 12.
- v. La columna 1 sirvió como control negativo y la columna 12 como control positivo.
- vi. La CMI de cada cepa se realizó por duplicado
- vii. Cada vez que se realizó la prueba se realizó también una prueba para cada una de las cepas control (*Haemophilus influenzae* ATCC 49766, ATCC 49247 y *Escherichia coli* ATCC 35218).

Cuadro No. 1 Esquema de las diluciones empleadas en la prueba de microdilución

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Antibiótico
A		8/4	4/2	2/1	1/0.5	0.5/0.125	0.125/0.06	0.06/0.03	0.03/0.016	0.016/0.008	0.008/0.004	Control positivo	Amoxicilina/ácido clavulánico
B		32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.061		Ampicilina
C		4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.016	0.008		Cefuroxima
D		16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03		Cefaclor
E		2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.016	0.008	0.004		Ceftriaxona
F		32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06		Clarithromicina
G		0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001		Ofloxacina
H		16/304	8/152	4/76	2/38	1/19	0.5/9.5	0.25/1.75	0.125/2.37	0.06/1.185	0.03/0.59		Trimetoprim/ sulfametoxazol
		Control negativo											

- viii. La cepa de *Haemophilus influenzae* ATCC 10211 únicamente fue un control de crecimiento para el control de calidad del medio ya que esta cepa requiere altas concentraciones de factor X para su desarrollo.
- ix. El valor de CMI fue la menor concentración del agente antimicrobiano que inhibió completamente el crecimiento del microorganismo en el pocillo detectado a simple vista. Se determinó el valor del CMI de acuerdo a una serie de categorías interpretativas para cada microorganismo definiendo el nivel de susceptibilidad antimicrobiana a cada antimicrobiano, el cuadro No. 2 indica los valores de interpretación para *Haemophilus influenzae*.

Cuadro No. 2. Valores de interpretación estándar CMI ($\mu\text{g/mL}$).⁶⁹

Antibiótico	Sensible	Intermedio	Resistente
Ampicilina	≤ 1	2	≥ 4
Amoxicilina ac. clavulánico	$\leq 4/2$	-	$\geq 8/4$
Cefuroxima	≤ 4	8	≥ 16
Cefaclor	≤ 8	16	≥ 32
Ceftriaxona	≤ 2	-	-
Ofloxacina	≤ 2	-	-
Clarithromicina	≤ 8	16	≥ 32
Trímetoprim./sulfametoxazol.	$\leq 0.5/9.5$	1/19-2/38	$\geq 4/76$

3.3.3.2 Prueba de difusión en agar (Kirby Bauer)⁶⁸

- I. Se tomaron de 4 a 5 colonias de un cultivo puro a partir de una placa de agar chocolate (cultivo de 18 a 24 hrs.) con un asa
- II. Se transfirieron a un tubo que contenía de 4 a 5 mL de solución salina al 0.45%.
- III. Se agitaron en el vortex para resuspender totalmente las colonias.
- IV. Se ajustó la turbidez a 0.5 de Mac Farland con el nefelómetro.
- V. Se sumergió un hisopo de algodón, no tóxico, estéril, en la suspensión de inóculo y se rotó varias veces, ejerciendo una presión firme sobre las paredes internas del tubo para quitar el exceso del líquido.
- VI. Se inocularó la superficie seca de la placa de agar HTM, a temperatura ambiente, pasando el hisopo 3 veces por toda la superficie del agar, rotando la placa aproximadamente 60° para asegurar una distribución pareja del inóculo. Se esperaron 3 a 5 minutos, pero no más de 15 para que la superficie del agar se secase, antes de colocar los discos de antibióticos.
- VII. Se colocaron los discos impregnados con el antimicrobiano adecuado sobre la superficie del agar mediante una pinza o dispensador multidisco. Se presionaron con suavidad los discos sobre el agar para permitir un contacto uniforme, por que parte de la droga difunde casi inmediatamente. Los discos tuvieron una distribución pareja sobre el agar, de modo que estuvieran separados por no menos de 4 cm de centro a centro. Se invirtieron las placas e incubaron por 16 a 18 horas a 35°C en atmósfera de 5% de CO₂.

VIII. Se leyó el diámetro de inhibición para cada antimicrobiano y clasificarlo como susceptible, intermedio o resistente de acuerdo al cuadro No. 3

Cuadro No. 3. Valores de interpretación estándar diámetro (mm.)⁶⁹

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina	<=18	19-21	>=22
Amox./ác. clavulánico	<=19	-	>=20
Cefuroxima	<=16	17-19	>=20
Cefaclor	<=16	17-19	>=20
Ceftriaxona	-	-	>=26
Ofloxacina	-	-	>=16
Clarithromicina	<=10	11-12	>=13
Trimetoprim./sulfametoxazol.	<=10	11-15	>=16

3.3.3.3. PRUEBA DE DETECCIÓN DE β - LACTAMASA

- I. Se dispensó un disco en un portaobjeto
- II. Se humedeció el disco con una gota de agua estéril
- III. Con un aplicador estéril se removió una colonia sospechosa bien aislada y se extendió en la superficie del disco.
- IV. Se observar el cambio de color
- V. Una coloración roja indicó la presencia de la enzima β - lactamasa.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS

El 30 % de los pacientes con aislamientos de *H. influenzae* correspondió a pacientes mayores de 60 años seguido por los de 46 a 60 años (20%) y de 3 a 5 años (14%) en menores proporciones se distribuyeron de 6 a 45 años (31%) y de 0 a 2 años (5%). Figura 1.

El 28% de los aislamientos de *H. influenzae* provenía de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, mientras que el 16% presentó neumonía, 12% y 11% correspondieron a pacientes con asma y tuberculosis pulmonar, en menor proporción pacientes con cáncer pulmonar, fibrosis quística, estenosis traqueal, HIV y derrame pleural. Figura 2.

La mayor parte de las cepas aisladas correspondieron a cepas de *H. influenzae* no tipificables en un 47%, cepas serotipo b en 35%) solo 6% de las cepas fueron serotipo a, 5% serotipo c, 3 % serotipo e y 2% serotipo f y d. Figura 3

Los biotipos más frecuentes fueron el III en un 36% y II en un 34%, solo 13% fueron biotipo I, 10% biotipo V, el 7% restante correspondieron a los biotipos IV, VI, VII y VIII. Figura 4.

16 cepas de *H. influenzae* fueron serotipo b con biotipo II, a sí mismo se encontraron 23 cepas no tipificables biotipo III. Tabla 1.

De las 55 cepas de *H. influenzae* aisladas de expectoración 43 correspondieron a los biotipos II y III, así como de los 30 lavados bronquiolo alveolares 20 fueron biotipo II y III, las 15 muestras de exudados faringeos se distribuyeron entre los biotipos I al IV. Tabla 2.

Las muestras de expectoración, lavados bronquiolo alveolares y exudados faríngeos se distribuyeron principalmente en el serotipo b y cepas no tipificables.

Tabla 3.

Las cepas provenientes de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica se vieron principalmente distribuidas en cepas no tipificables (39%) y serotipo b (32%), el 11% fueron serotipo e, 7% serotipo a y c y solo 4% serotipo d. Mientras que las cepas provenientes de pacientes con diagnóstico de neumonía solo se distribuyeron en cepas no tipificables (62%) y serotipo b (38%). Figura 5.

La distribución de biotipos en cepas provenientes de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica fue del 43% para biotipo III y 36% biotipo II, sólo el 7% fueron biotipo I y el restante 14% se distribuyó entre los biotipo IV al VIII. Para aislados de pacientes con neumonía el 44% correspondió a biotipo II de igual forma que al biotipo III, el 6% fueron biotipo I y el restante 6% correspondieron a los biotipos IV al VIII. Figura 6.

Dos métodos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana se probaron a 8 agentes antimicrobianos contra *H. Influenzae*, estos fueron el método de microdilución en caldo y el método de difusión en agar ambos basados en la normativa NCCLS. Para determinar la concordancia de ambos métodos se empleó la estadística Kappa encontrándose para todos los antibióticos concordancia mayor o igual a 0.8, el trimetoprim sulfametoxazol fue el que menor concordancia presentó (0.8), ampicilina, cefaclor, ceftriaxona y claritromicina tuvieron concordancia de 0.9%, mientras que amoxicilina / ác. clavulánico, cefuroxima y ofloxacina mostraron concordancia de 1.0. Las consideraciones para interpretar si la concordancia que hay entre dos métodos es aceptable o no es

bajo los siguientes intervalos: 0.8 – 1 excelente, 0.7 – 0.8 moderada y ≤ 0.6 no satisfactorio, por lo que la concordancia entre ambos métodos fue excelente.

Tabla 4.

La concordancia categórica entre ambos métodos también fue determinado, el trimetoprim sulfametoxazol presentó 90% de acuerdo categórico con 4 errores menores 4 errores mayores y 2 errores críticos, claritromicina tuvo 93% (2 errores menores, 4 mayores y 1 crítico) al igual que cefaclor (3 errores menores, 3 mayores y 1 crítico), ceftriaxona presentó 94% con 6 errores mayores, ampicilina mostró 97% de acuerdo categórico con 1 error mayor y 2 errores críticos, solo amoxicilina á clavulánico, ofloxacina y cefuroxima no presentaron errores y tuvieron 100% de acuerdo categórico. Se definió cuales eran errores menores, mayores o críticos en base a las siguientes consideraciones: errores menores: susceptibles o resistentes con el método de difusión en agar e intermedio por el método de microdilución en caldo o intermedio con el método de difusión en agar y resistente o sensible por el método de microdilución en caldo, errores mayores: resistentes con el método de difusión en agar y sensible con el método de microdilución en caldo. errores críticos: susceptibles con el método de difusión en agar y resistentes con el método de microdilución en caldo. Tabla 5.

Las cepas productoras de β -lactamasa fueron principalmente serotipo b (10/22) seguidas por las cepas no tipificables.(9/22), solo 1 cepa fue serotipo a, 1 serotipo c y 1 serotipo e. Tabla 6.

Por lo que respecta a la relación que existe entre las cepas productoras de β -lactamasa en relación a su biotipo se distribuyeron de igual forma entre los

biotipos II y III, solo 2 cepas fueron biotipo I y las 2 cepas restantes se encontraron entre los biotipo IV al VIII. Tabla 7.

Ocho agentes antimicrobianos se probaron para *H. influenzae* siendo el de mayor resistencia antimicrobiana trimetoprim sulfametoxazol (61%), ampicilina solo presentó 78 % de sensibilidad antimicrobiana, claritromicina y cefaclor presentaron 97% de sensibilidad antimicrobiana, mientras que amoxicilina / ác. clavulánico mostró 99%, cefuroxima, ceftriaxona y ofloxacina presentaron 100% de sensibilidad antimicrobiana. Figura 8.

Trimetoprim sulfametoxazol y ampicilina a pesar de que mostraron CIM_{50} muy pequeños de 0.125 y 0.25 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente su CIM_{90} es mucho mayor que el de los demás antibióticos 16 $\mu\text{g/ml}$, cefaclor también requiere de concentraciones altas para inhibir el 90% de las cepas 8 $\mu\text{g/ml}$, claritromicina requiere de 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir el 50 y 90% de las cepas ensayadas, los antimicrobianos que presentaron mejor actividad fueron amoxicilina / ác. clavulánico, cefuroxima y ceftriaxona. Figura 9.

Al comparar la actividad de ampicilina comparada contra amoxicilina / ác. clavulánico se observó un desplazamiento del CIM de ampicilina hacia valores mayores en comparación a los obtenidos por amoxicilina ácido clavulánico. Figura 10.

Tres cefalosporinas: cefaclor de segunda generación, cefuroxima y ceftriaxona de tercera generaciones incluyeron en este estudio, siendo ceftriaxona la que presentó mayor actividad antimicrobiana al desplazar su curva de inhibición

hacia la izquierda asimismo la que posee menor actividad es el cefaclor ya que se desplaza su curva de inhibición hacia CIM mayores. Figura 11.

Lo anteriormente mencionado se observó también al graficar el número de cepas inhibidas a cada concentración del antibiótico observándose de igual forma el desplazamiento de ceftriaxona hacia concentraciones menores y el del cefaclor hacia concentraciones mayores. Figura 12.

La excelente actividad de la ofloxacina fue evidente al graficar el número de cepas inhibidas por cada concentración del antibiótico ya que requiere de cantidades muy pequeñas ($0.031\mu\text{g/ml}$) para inhibir la totalidad de las cepas, mientras que claritromicina requiere hasta de concentraciones de $32\mu\text{g/ml}$ para inhibirlas, trimetoprim sulfametoxazol al igual que claritromicina requiere de cantidades de antibiótico muy altas para inhibir el 100% de las cepas. Figura 13.

Al compararse el CIM_{50} y el CIM_{90} para los 8 antimicrobianos de acuerdo a si la cepa produce o no β -lactamasa, se observó que esta enzima sólo influye a la ampicilina ya que se requirió 128 veces más antibiótico para inhibir las cepas β -lactamasa positiva que las cepas β -lactamasa negativa situación que no se observó con los demás antimicrobianos. Tabla 8.

La acción del ácido clavulánico en combinación con amoxicilina fue evidente al comparar las gráficas de ampicilina y amoxicilina ácido clavulánico de cepas productoras y no productoras de β -lactamasa ya que el desplazamiento que ocurrió con ampicilina no sucedió con amoxicilina ácido clavulánico. Figura 13.

La actividad antimicrobiana de cefaclor, cefuroxima y ceftriaxona no se vió influenciada por la presencia o ausencia de β -lactamasa tal como se observa al

graficar el porcentaje acumulado de inhibición contra la concentración inhibitoria mínima. Figura 14.

Aunque al asociar la actividad de los 8 agentes antimicrobianos con la ausencia o presencia de cápsula pareciera indicar que las cepas serotipo b fueran más resistentes a trimetoprim sulfametoxazol que las cepas no tipificables y los serotipos a, c-f, situación que no sucedió con los demás antibióticos, este no fue estadísticamente significativo. Tabla 10

Lo mismo sucedió al relacionar la actividad de los antibióticos con su biotipo pareciera que los biotipos IV al VIII fueran más susceptibles a trimetoprim sulfametoxazol que los demás biotipos sin embargo este evento no fue estadísticamente significativo. Tabla 11.

Tabla No. 1. Distribución de serotipos por biotipos

Serotipo	Biotipo								TOTAL
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
A	1	2	2	0	1	0	0	0	6
B	4	16	6	2	5	1	0	1	35
C-F	4	3	5	0	0	0	0	0	12
NO TIPIFICABLE	4	13	23	1	4	0	1	1	47
TOTAL	13	34	36	3	10	1	1	2	100

Tabla No. 2. Distribución de los biotipos por origen de la muestra

Origen de la muestra (n)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Expectoración (55)	6	19	24	2	3	0	0	1
LBA (30)	5	11	9	1	3	0	1	0
Exudado faringeo (15)	2	4	3	4	0	1	1	0

Tabla No. 3. Distribución de los serotipos por origen de la muestra

Origen de la muestra (n)	A	B	C	D	E	F	NT
Expectoración (55)	1	18	4	2	3	1	26
LBA (30)	3	11	1	0	0	1	14
Exudado faringeo (15)	2	6	0	0	0	0	7

Tabla No. 4. Concordancia de sensibilidad antimicrobiana por difusión en agar y microdilución en caldo

Antibiótico	Kappa
Ampicilina	0.9
AMC.	1
Cefaclor	0.9
Cefuroxima	1
Ceftriaxona	0.9
Claritromicina	0.9
SXT	0.8
Ofloxacina	1

Tabla No. 5. Concordancia categórica del método de microdilución en caldo y el método de difusión en agar

Antibióticos	Porcentaje de error			Porcentaje de acuerdo categórico
	Menor	Mayor	Crítico	
Ampicilina	0	1	2	97
AMC	0	0	0	100
Cefaclor	3	3	1	93
Cefuroxima	0	0	0	100
Ceftriaxona	0	6	0	94
Claritromicina	2	4	1	93
SXT	4	4	2	90
Ofloxacina	0	0	0	100

Tabla No. 6. Asociación de producción de β -lactamasa con la distribución de serotipos

SEROTIPO (n)	β LACTAMASA	
	NEGATIVA	POSITIVA
A (6)	5	1
B (35)	25	10
C (5)	4	1
D (2)	2	0
E (3)	2	1
F(2)	2	0
NO TIPIFICABLE	38	9
TOTAL	78	22

Tabla No. 7. Asociación de producción de β -lactamasa con la distribución de biotipos

BIOTIPO (n)	β LACTAMASA	
	NEGATIVA	POSITIVA
I (13)	11	2
II (34)	25	9
III (36)	27	9
IV - VIII (17)	15	2
TOTAL	78	22

Tabla No. 8. CIM₅₀ y CIM₉₀ de acuerdo a la producción de β -lactamasa.

Antibiótico	β -LACTAMASA			
	NEGATIVA (22)		POSITIVA (78)	
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Ampicilina	0.125	0.250	16	32
AMC	0.250	0.5	0.250	2
Cefaclor	2	4	4	8
Cefuroxima	0.250	1	0.250	1
Ceftriaxona	0.008	0.250	0.008	0.250
Clarithromicina	2	4	2	8
SXT	0.125	8	4	16
Ofloxacina	0.001	0.016	0.001	0.031

Tabla No. 9. Actividad de 8 agentes antimicrobianos para *H. influenzae* por serotipo.

Serotipo	b (35)		NT (47)		a, c-f (18)	
	%S	%R	%S	%R	%S	%R
Ampicilina	65.7	34.3	80.9	19.1	83.3	16.7
AMC	100	0	97.8	2.2	100	0
Cefaclor	97.1	2.9	95.7	4.3	100	0
Cefuroxima	100	0	100	0	100	0
Ceftriaxona	100	0	100	0	100	0
Claritromicina	94.2	5.8	97.9	2.1	100	0
SXT	60	40	68.1	31.9	44.4	55.6
Ofloxacina	100	0	100	0	100	0

P<0.05

Tabla No. 10. Actividad de 8 agentes antimicrobianos para *H. influenzae* por biotipo

Biotipo	I (13)		II (34)		III (36)		IV - VIII (17)	
	%S	%R	%S	%R	%S	%R	%S	%R
Ampicilina	100	0	67.6	32.4	75	25	88.2	11.8
Amox. clav.	100	0	97.1	2.9	100	0	100	0
Cefaclor	100	0	97.1	2.9	94.4	5.6	100	0
Cefuroxima	100	0	100	0	100	0	100	0
Ceftriaxona	100	0	100	0	100	0	100	0
Claritromicin	100	0	91.2	8.8	100	0	100	0
Trim. sulf	69.2	30.8	44.1	55.9	58.3	41.7	94.1	5.9
Ofloxacina	100	0	100	0	100	0	100	0

P<0.05

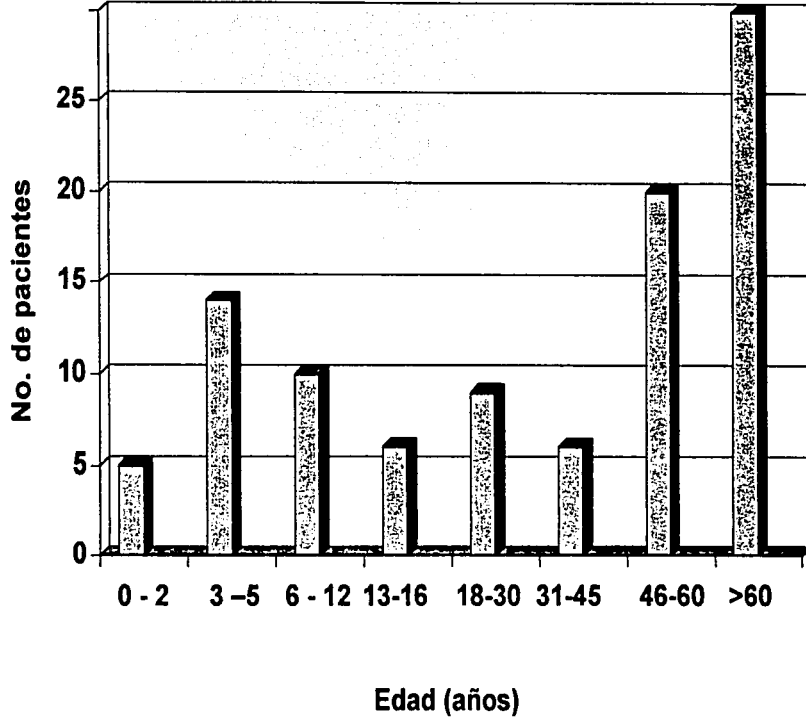


Figura No. 1. Distribución de edades de pacientes con aislamientos de cepas de *H. influenzae*.

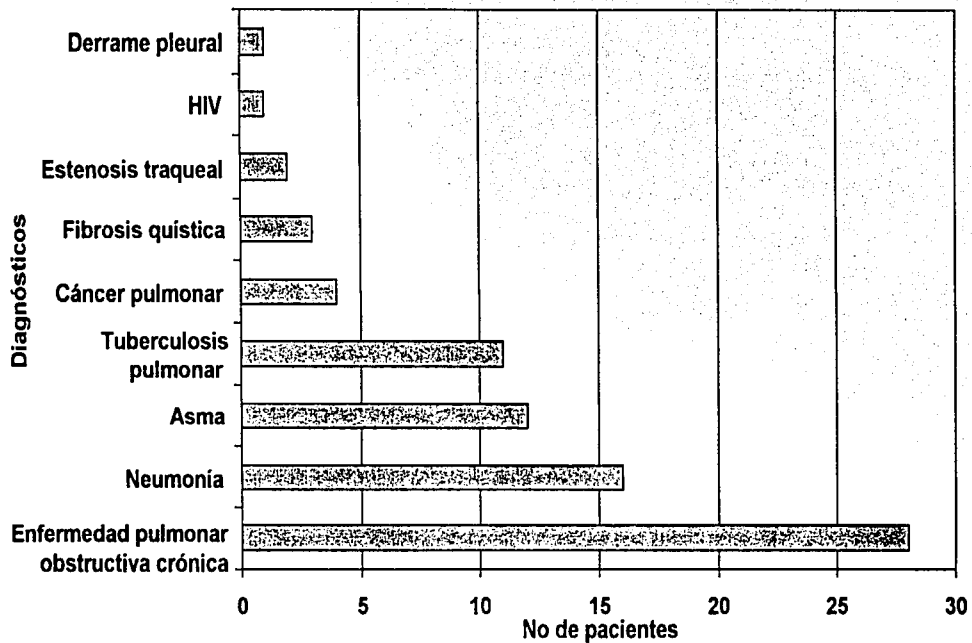


Figura N. 2. Distribución de enfermedades.

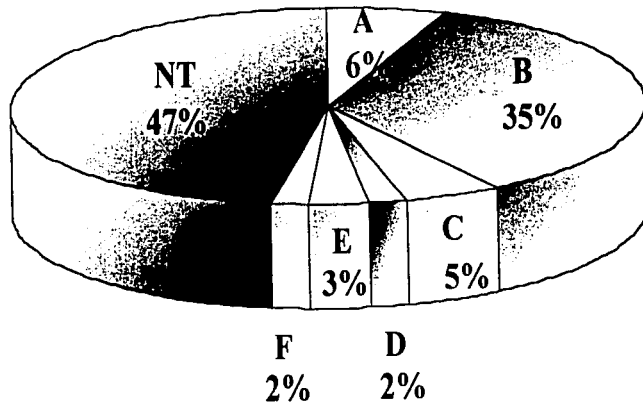


Figura No. 3. Distribución de serotipos en 100 aislamientos de *H. influenzae*

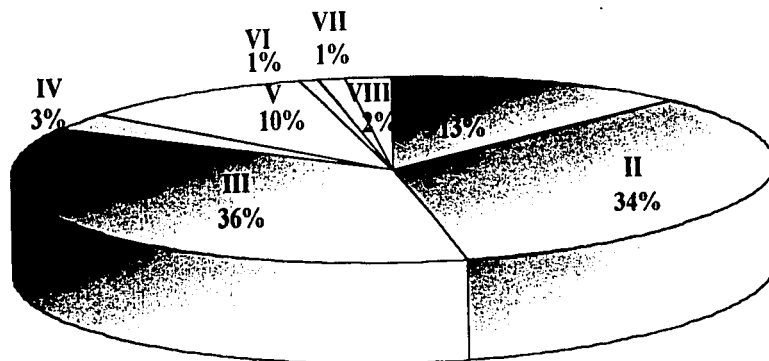
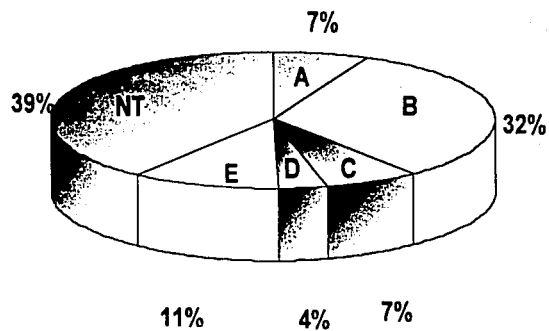
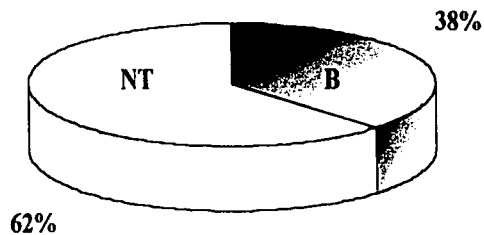


Figura No. 4. Distribución de biotipos en 100 aislamientos de *H. influenzae*

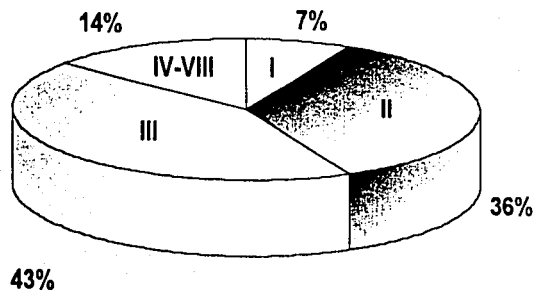


EPOC

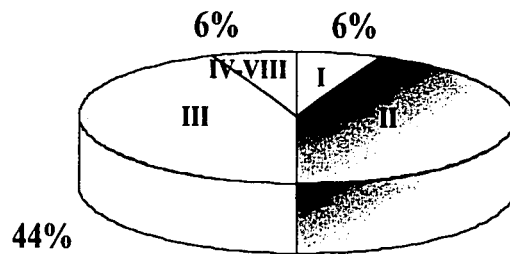


Neumonía

Figura No. 5. Distribución de enfermedades por serotipo.



EPOC



Neumonía

Figura No. 6. Distribución de enfermedades por biotipo.

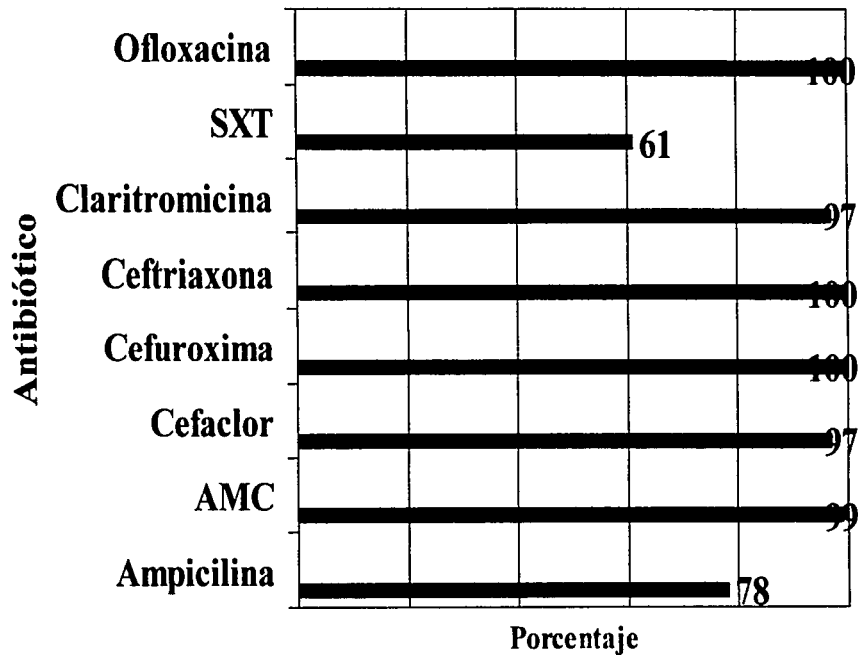


Figura No. 7. Sensibilidad antimicrobiana para *Haemophilus influenzae*.

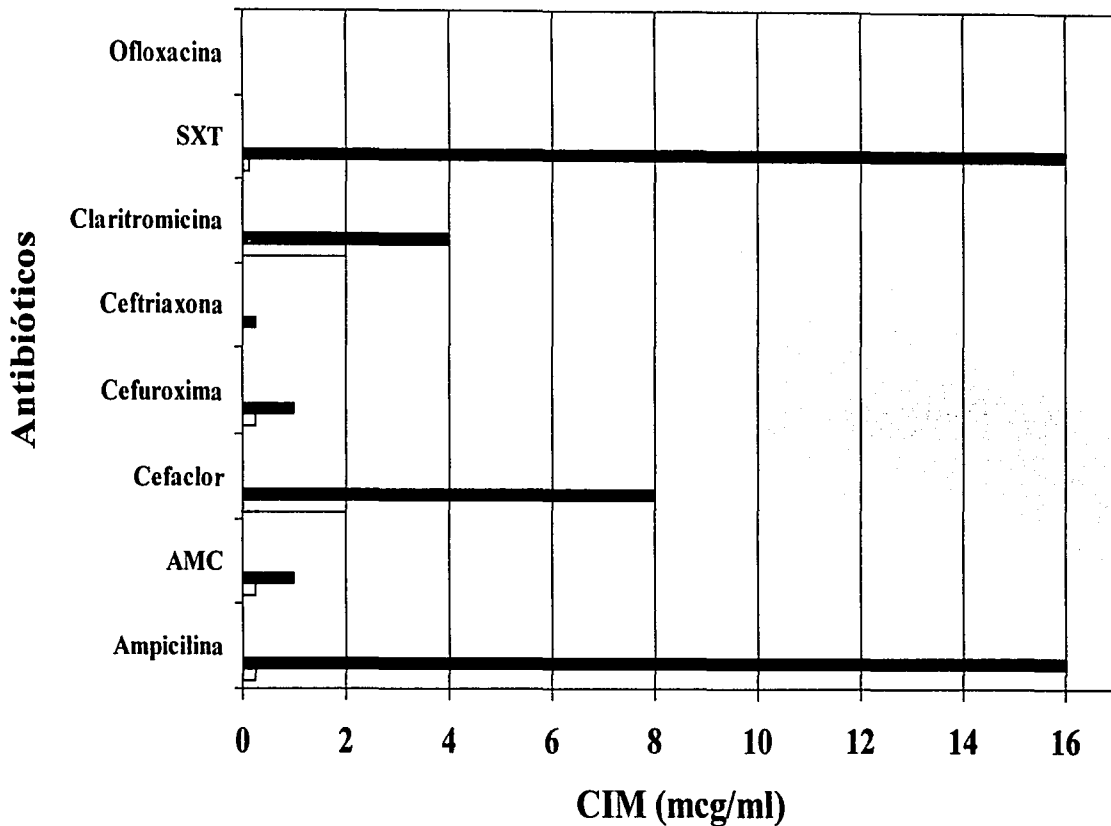


Figura No. 8. CIM₅₀ y CIM₉₀ de 8 agentes antimicrobianos contra *H. Influenzae*.

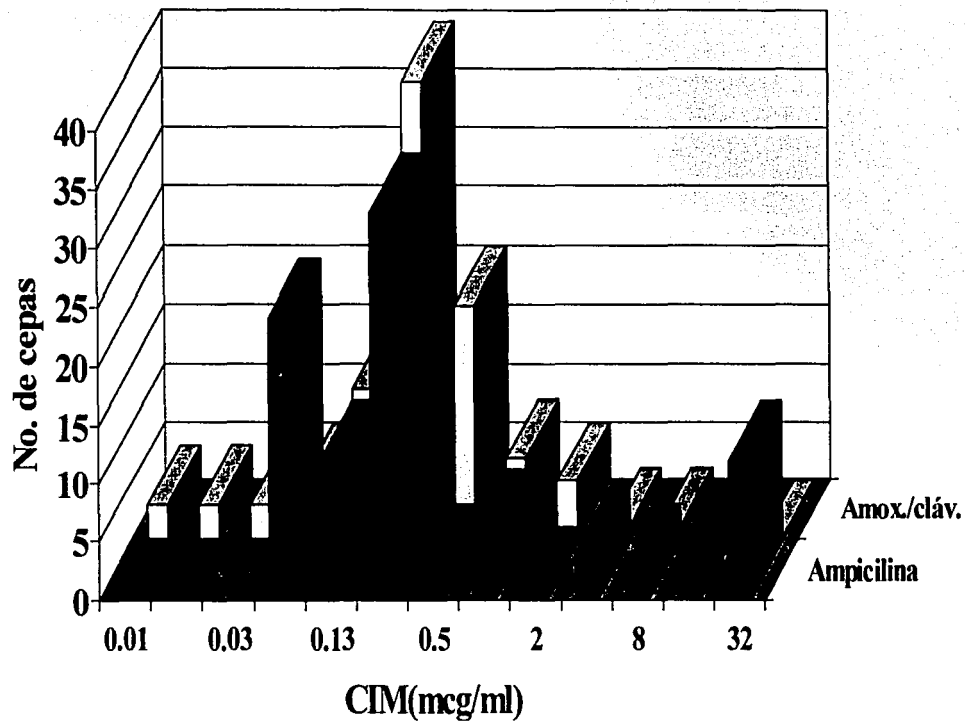


Figura No. 9. Distribución de *H. influenzae* frente a amoxicilina ác. clavulanico y ampicilina

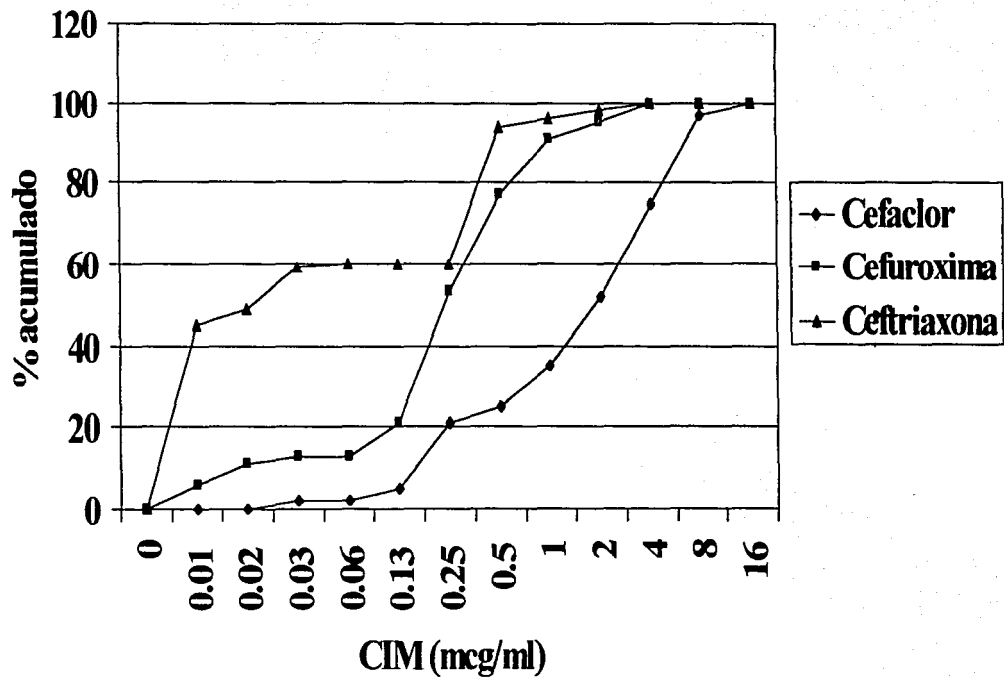


Figura No. 10. Comportamiento de cefalosporinas contra *H. influenzae*

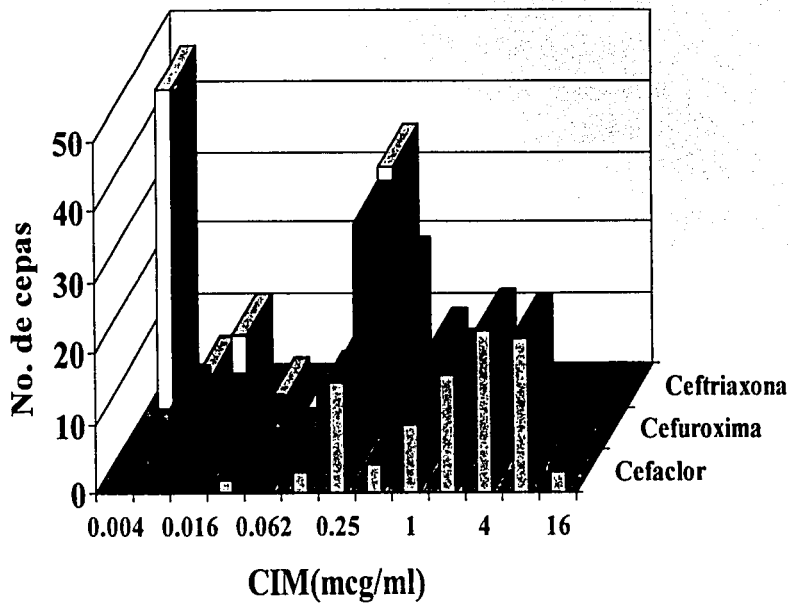


Figura No. 11. Distribución de *H. influenzae* frente a cefaclor, cefuroxima y ceftriaxona

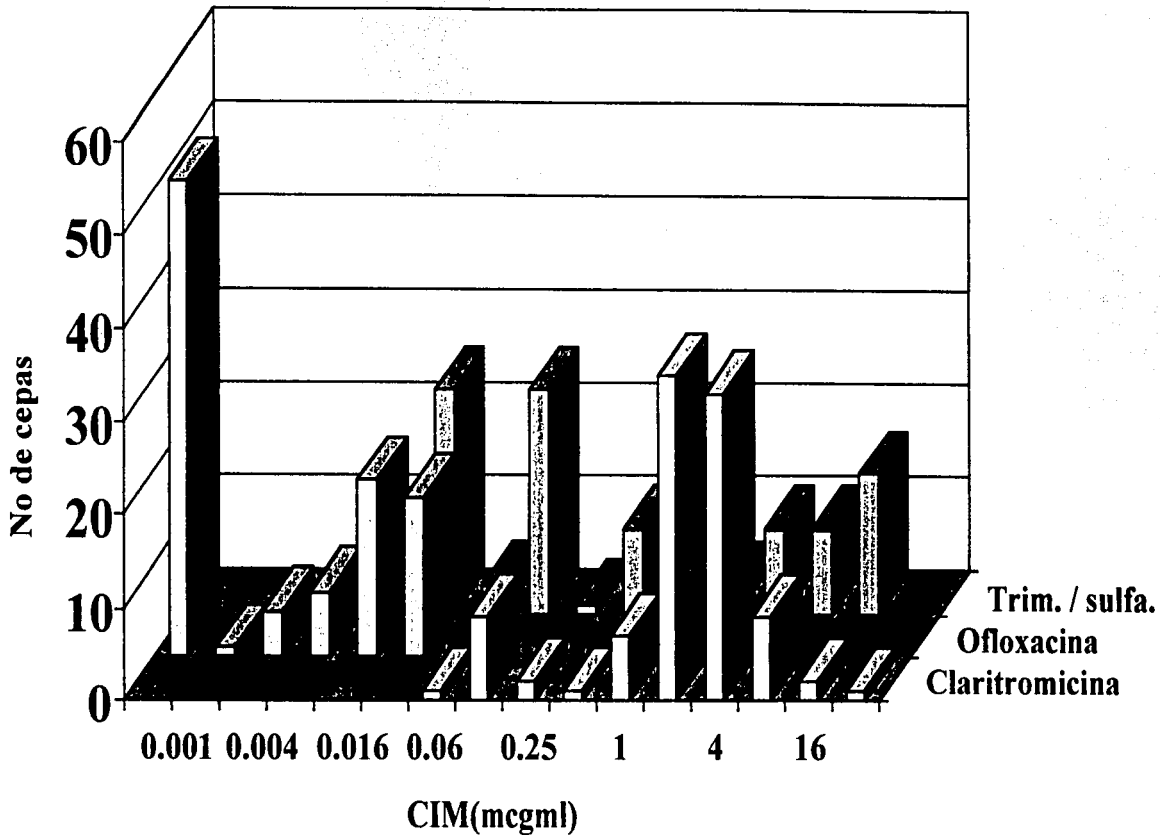


Figura No. 12. Distribución de *H. influenzae* frente a SXT, ofloxacin y claritromicina.

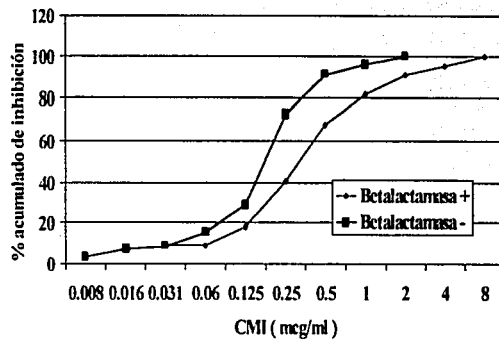
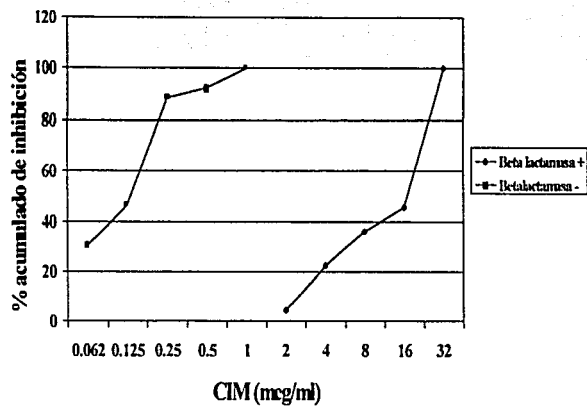


Figura No. 13. Actividad antimicrobiana de ampicilina y amoxicilina ác. clavulánico frente a cepas productoras y no productoras de β -lactamasa

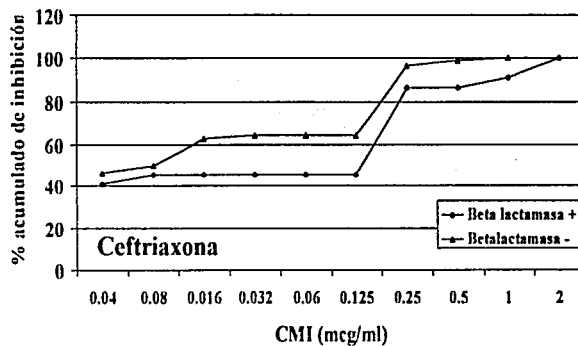
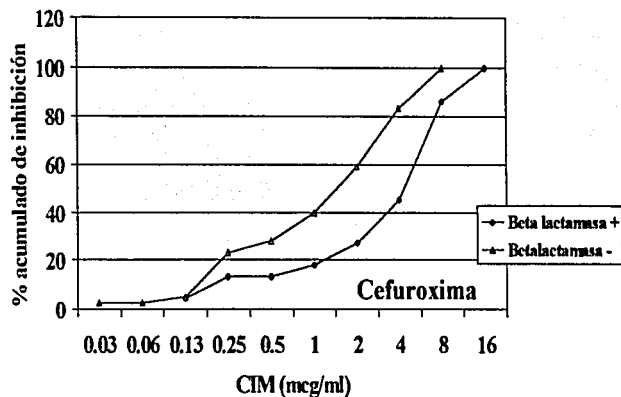
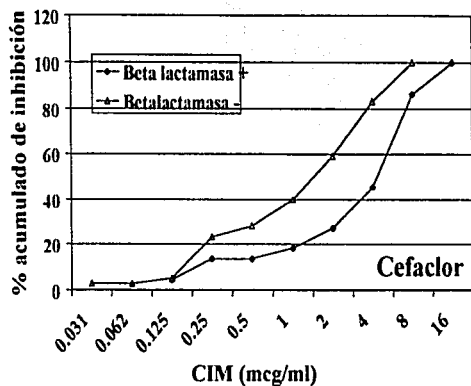


Figura No 14. Actividad antimicrobiana de cefaclor, cefuroxima y ceftriaxona frente a cepas productoras y no productoras de β -lactamasa

CAPITULO V

5.DISCUSIÓN

La distribución de la edad de los pacientes en quienes se aislaron las 100 cepas ensayadas en este estudio, difiere de la mayoría de los estudios previamente reportados. *Haemophilus influenzae* ha sido considerado como causa de infecciones poco frecuentes en adultos^{18,28,81}. La gran parte de los reportes encontrados en la literatura, no mencionan la edad de los pacientes de los cuales fueron aisladas las muestras y de los pocos que si lo hacen son de estudios realizados en niños. Sin embargo, Doern¹¹ describió en 1997 ²³ 60.7% de cepas aisladas de *H. influenzae* de adultos dónde 37.3% fueron mayores de 50 años, en 1998 cerca del 42% de su población fueron adultos, siendo un 24.3% mayor de 50 años, Jacobs ⁴³ en 1999 reportó un 55.4% de aislamientos de *H. influenzae* en adultos de ellos 16.6% fueron mayores de 60 años. Los estudios realizados en México se aplicaron a la población infantil generalmente menores de 5 años, mientras que, la mayor parte de las cepas de *H. influenzae* estudiadas provienen de adultos (65%), además de que el 30% del total de cepas son de adultos mayores de 60 años; sin embargo esto puede ser efecto de un sesgo institucional y de muestreo. Estos datos demostraron que en la población estudiada es de relevante importancia el aislamiento de esta bacteria ya que la mayoría de los diagnósticos asociados al aislamiento de *H. influenzae* fue enfermedad obstructiva crónica y neumonía, este patógeno sólo fue de importancia médica cuando se trató de una enfermedad invasiva ya sea meningitis o sepsis, o cuando se trató de una infección respiratoria o de un paciente con deficiencias inmunológicas.

La distribución de *Haemophilus influenzae* en serotipos fue considerado de importancia para determinar la patogenicidad de este microorganismo^{89,70,12}, el

serotipo b fue considerado patógeno debido a que generalmente fue asociado a enfermedades invasivas, comúnmente a meningitis; sin embargo, también en países desarrollados tales como Estados Unidos^{67,8} este serotipo fue prácticamente erradicado gracias a la vacuna empleada dando entonces más importancia a las cepas de *H. influenzae* no tipificables que fueron generalmente asociados a patologías no invasivas aunque la situación en México fue diferente ya que la vacunación contra *H. influenzae* serotipo b (Hib) tiene aproximadamente 4 años de introducida al esquema nacional de vacunación y a diferencia de otros países en este trabajo se observó que existe un alto porcentaje de aislamiento de Hib (35%) en pacientes con padecimientos no invasivos (neumonía y enfermedad pulmonar obstructiva crónica), incluso en aislamientos de pacientes que se podrían considerar como portadores, ya que de muestras de exudados faríngeos en pacientes asintomáticos, el 40% de los *Haemophilus* aislados fueron serotipo b. La distribución de serotipos por origen de la muestra no mostró variaciones significativas de un tipo de muestra a otra, siendo considerada de mayor importancia los lavados bronquiolo alveolares por ser una muestra más representativa de cuadros clínicos respiratorios, en los tres tipos de muestras la prevalencia del serotipo b es mayor al 30%. La epidemiología mundial de *Haemophilus influenzae* no tipificable muestra que este se aísla en más del 72% de muestras respiratorias^{11,27} a diferencia del presente trabajo donde el aislamiento de este patógeno fue del 46%, por lo anteriormente expuesto podemos considerar que la importancia de *H. influenzae* serotipo b y de una no tipificable fue relevante ya que ambas se asociaron a infecciones respiratorias.

La biotipificación para *Haemophilus influenzae* fue utilizada para fines epidemiológicos aunque es diferente la importancia que en la serotipificación. Los biotipos que en la literatura se encontraron reportados en aislamientos respiratorios más frecuentes fueron el biotipo II y III^{1,35} lo que coincidió con los resultados que aquí se informan. A diferencia de la distribución de serotipos por origen de la muestra, se observaron diferencias debido a que las aislamientos obtenidos de expectoración y lavados predominantemente fueron biotipo II y III, mientras que para los obtenidos de exudados faríngeos fueron distribuidos en cuatro grupos el I, II, III y IV, como anteriormente se mencionó los aislamientos de exudados faríngeos provinieron de portadores asintomáticos. Por lo que una conclusión fue que los biotipos II y III son relacionados con patologías respiratorias ya que las muestras de expectoración y lavados bronquioloalveolares provinieron de pacientes con alguna enfermedad pulmonar, con esto podríamos considerar tal vez de mucha utilidad el reportar los aislamientos no sólo a nivel especie sino también su biotipo. En este estudio también se relacionó la clasificación de serotipos por biotipos y se conoció el serotipo de la cepa y el biotipo perteneciente y de esto podríamos decir que la mayoría de los aislamientos serotipo b pertenecieron al biotipo II mientras que los aislamientos no tipificables fueron generalmente biotipo III, esto difiere notablemente de lo reportado por Albritton¹ ya que el reportó que los aislamientos serotipo b fueron asociados con el biotipo I y los no tipificables con el II, esto debido quizá la diferencia es que el trabajo consideró aislamientos invasivos y no invasivos.

Al realizar la prueba de concordancia de los 2 métodos para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana utilizados mediante la prueba de kappa se

demonstró que ambos métodos (difusión en agar y microdilución en caldo) presentaron una excelente concordancia; sin embargo, para trimetoprim sulfametoxazol se presentó una concordancia menor (0.8) esto se debe probablemente a que algunas cepas presentaron un doble halo de inhibición con lecturas de falsa resistencia antimicrobiana a trimetoprim sulfametoxazol.

Diversos artículos mencionan la causa por la cual antibióticos como los macrolidos presentan diferencias al ser probadas por diversas técnicas de susceptibilidad la más comentada es que esto es debido a las condiciones de incubación ya que mientras en la técnica de microdilución en caldo la incubación fue en atmósfera normal; la técnica de difusión en agar se hace en atmósfera de 5% de CO₂, se sabe muy bien que la actividad de los macrolidos se ve afectada por la presencia del CO₂ ya que este acidifica el medio disminuyendo la actividad del antibiótico, esta puede ser la causa por la cual la Kappa obtenida sea de 0.9 y que la resistencia antimicrobiana a este macrólido por la técnica de difusión en agar se vió ligeramente incrementada^{51,56,30,6,74}.

Por lo que respecta a la concordancia categórica a los antimicrobianos, fue mayor al 90%, siendo nuevamente el de menor acuerdo categórico trimetoprim sulfametoxazol. Los errores de mayor importancia a considerar fueron los errores críticos de los cuales para claritromicina, cefaclor, trimetoprim sulfametoxazol y ampicilina.

Todos los resultados de susceptibilidad antimicrobiana fueron analizados de acuerdo a los datos obtenidos por la técnica de microdilución en caldo. La resistencia antimicrobiana entre aislamientos clínicos de *Haemophilus influenzae* es un problema presente de incremento constante. Los resultados de diversas

publicaciones sugieren que la resistencia a ampicilina mediada por β lactamasas entre estos aislamientos se incrementó notablemente. En E.U. hacia 1976 sólo se reportaban 4.6% de cepas productoras de β lactamasa mientras que, en 1997 ya existía un incremento en la producción de β lactamasa de 41.6%. En México, el porcentaje de cepas productoras de β lactamasa es menor entre un 14 y un 26%, el presente trabajo reportó una producción de β lactamasa del 22%.

Este estudio presentó que el 28.5% de las cepas serotipo b y 19.1% de cepas no tipificables son productoras de β lactamasa; mientras que de las cepas biotipo II, 26.5% y 25% biotipo III fueron β lactamasa positiva; por lo cual podemos asumir que la producción de β lactamasa no esta asociada al serotipo o biotipo al que pertenezcan. Presumiblemente podemos sugerir que las cepas β lactamasa positiva de *H. influenzae* producen una β lactamasa tipo TEM-1 debido a que el disco de nitrocefina usado es capaz de detectar la actividad de esta enzima mientras que es incapaz de detectar la enzima tipo ROB que también confiere resistencia a ampicilina. La resistencia a ampicilina entre *H. influenzae* en ausencia de la enzima tipo TEM-1 es poco común, en los *H. influrnzae* que se trabajaron no se detectó la presencia de cepas resistentes a ampicilina β lactamasa negativa.

Una sola cepa β lactamasa positiva ampicilina resistente presentó resistencia a amoxicilina clavulanato, lo cual nos podría sugerir que esta cepa presentó 2 mecanismos de resistencia ampicilina el primero por acción de la β lactamasa TEM 1 y el segundo por una alteración de las proteína de unión a penicilina (PBP's), siendo más probable este evento único.

De los 8 antimicrobianos estudiados: β lactámicos, cefalosporinas, macrolido, inhibidor de la síntesis de folatos y quinolona, seis de estos presentan una excelente actividad contra *H. influenzae* con un 97 al 100% de susceptibilidad antimicrobiana.

Como se había mencionado anteriormente la ampicilina presentó 22% de resistencia antimicrobiana todas ellas mediadas por β lactamasa, al combinar un β lactámico con un inhibidor de β lactamasa, en particular amoxicilina con ácido clavulánico, la susceptibilidad mejoró notablemente a un 99%. La acción del ácido clavulánico fue notable cuando se graficó la concentración mínima inhibitoria para aislamientos β lactamasa positiva y β lactamasa negativa obteniendo con CIM's muy parecidos.

Del grupo de cefalosporinas: cefaclor, cefuroxima y ceftriaxona las dos primeras de segunda generación y la ceftriaxona de 3ª generación. El cefaclor mostró un 98% de sensibilidad antimicrobiana mientras que, la cefuroxima y la ceftriaxona tuvieron 100% de sensibilidad antimicrobiana, independientemente de esto la que presentó mejor actividad fue la ceftriaxona con la menor concentración mínima inhibitoria. La actividad de las cefalosporinas no se vió influenciado por la presencia de β lactamasas ya que la concentración mínima inhibitoria (CIM) obtenidas para los aislamientos β lactamasa positivo y β lactamasa negativa fueron muy similares tal como lo reportó Doern en 1988 ²⁵.

De todos los antimicrobianos probados la que tuvo actividad sobresaliente fue la ofloxacina ya que la concentración a la cual se inhiben el 50% y el 90% de los aislamientos fue el menor de todos, sin embargo es importante mencionar que no

por estos resultados se debe emplear como terapia empírica en estas enfermedades.

La actividad del trimetoprim sulfametoxazol decreció notablemente a comparación de lo reportado en 1981 dónde sólo se reportaba un 5% de resistencia antimicrobiana en un estudio realizado por García ³² en México, aquí lo reportado fue del 49% de resistencia antimicrobiana siendo el antibiótico que mayores inconvenientes presentó. 90% de inhibición de las cepas ensayadas se logró con 16/304 $\mu\text{g/mL}$ del antibiótico, mientras que, el punto de corte de sensibilidad antimicrobiana para que este antibiótico tenga acción contra *H. influenzae* de concentraciones menores o iguales a 0.5/9.5 $\mu\text{g/mL}$.

El macrólido que fue generalmente usado contra aislamientos de *H. influenzae* fue la claritromicina mismo que aquí estudiamos, la sensibilidad antimicrobiana que se reportó en la literatura es del 31% hasta un 94%, aquí se encontró el 97% de sensibilidad antimicrobiana con un CIM_{90} de 4 $\mu\text{g/mL}$, mientras que, el punto de corte para considerarlo sensible es de 8 $\mu\text{g/mL}$, lo cual mostró la buena actividad de dicho antibiótico a pesar de los CIM_{90} y CIM_{50} relativamente altos.

Cuando se comparó la actividad antimicrobiana de los 8 antibióticos contra cepas productoras de β lactamasa y no productoras observamos que esta enzima sólo afecta a la ampicilina ya que se requirieron 128 veces más antibiótico para inhibir una cepa β lactamasa positiva a comparación de lo requerido para inhibir una cepa β -lactamasa negativa, mientras que para los demás antibióticos los CIM obtenidos son muy similares debido a que estos son estables a la presencia de la enzima β lactamasa.

Al relacionar los serotipos con el perfil de susceptibilidad antimicrobiana no se encontró diferencia significativa entre un grupo y otro aunque se observa una tendencia de que las cepas serotipo b fueran más resistentes a trimetoprim sulfametoxazol. Así mismo cuando se relacionaron los biotipos únicamente se observó que existía mayor sensibilidad antimicrobiana para trimetoprim sulfametoxazol en los biotipo IV al VIII, siendo no estadísticamente significativo.

CAPITULO VI

6. CONCLUSIONES

- La población de pacientes mayores de 50 años con enfermedades pulmonares crónicas y neumonía se ven afectadas con frecuencia por *H.influenzae*.
- Los biotipos más frecuentes fueron el II y el III
- Las cepas más frecuentes fueron no tipificables seguidas del serotipo b.
- La concordancia entre la técnica de difusión en agar y microdilución en caldo es excelente
- La resistencia antimicrobiana encontrada a ampicilina fue del 22% todas mediadas por β lactamasa.
- El antibiótico que presento mayor resistencia antimicrobiana fue trimetoprim sulfametoxazol.
- Ofloxacina, ceftriaxona, amoxicilina / ác. clavulanico y cefuroxima presentaron excelente actividad contra *Haemophilus influenzae* seguidos por claritromicina y cefaclor.
- No existe relación entre la actividad de los 8 antimicrobianos ensayados y los serotipos y biotipos

CAPITULO VII

7.Apéndice

Frotis y tinción de Gram.

Extender una colonia de la cepa en una gota de solución salina, secar, fijar a la flama y teñir por el método de Gram que consiste en agregar cristal violeta y esperar por 1 minuto, enjuagar, agregar lugol y dejar por 1 minuto, enjuagar nuevamente, lavar con alcohol acetona hasta que ya no salga colorante, enjuagar con agua y adicionar safranina por 1 minuto y finalmente lavar y dejar secar. Se deben observar cocobacilos pleomorficos Gram negativos para que se trate presuntivamente del género *Haemophilus*.

MICROSISTEMA VITEK.

Preparar una suspensión al No.3 de Mc Farland con un cultivo puro de *Haemophilus sp.* de 24 horas en 1.8 mL de solución salina al 0.45%.

Marcar una tarjeta NHI con el número de la cepa, la tarjeta debe usarse el mismo día que se extrajo de la envoltura.

Siguiendo un procedimiento aséptico insertar firmemente el extremo corto del tubo de transferencia dentro del orificio de entrada situado en el lateral de la tarjeta, dar un giro de 180° de manera que quede situado hacia el extremo corto de la tarjeta.

Colocar la tarjeta preparada en el soporte de llenado de manera que el tubo de transferencia quede introducido en el tubo con muestra.

Colocar el soporte en el módulo preparador, donde se llevará a cabo el proceso de llenado, una vez terminado verificar que la tarjeta se ha llenado apropiadamente.

Introducir el soporte de llenado en el sellado y presionar la tarjeta hacia el interior.

Incubar las tarjetas con las muescas hacia arriba durante 4 horas a 35 – 37 °C en atmósfera aerobia.

La tarjeta NHI contiene los sustratos indicados en el cuadro No. 1

Cuadro No. 1 Reactivos y principios de la tarjeta NHI

Pocillo No.	Reactivos	Principio
1	Alanin-p-nitroanilida	Hidrólisis del sustrato amida incoloro liberando p-nitroanilida amarilla
2	Fenilfosfanato	Hidrólisis del fosfoester incoloro, liberando p-nitrofenol amarillo
3	Prolin-p-nitroanilida	Hidrólisis del sustrato amida incoloro, liberando p-nitroanilida amarilla
4	Gamma-glutamil-p-nitroanilida	
5	Glycin-p-nitroanilida	
6	Lisin-p-nitroanilida	
7	o-Nitrofenil-D-galactosidasa	Hidrólisis del glicósido incoloro, liberando p-nitrofenol amarillo

8	p-Nitrofenil-fosforilcolina	Hidrólisis del fosfoéster incoloro, liberando p-nitrofenol amarillo
9	Glucosa	Utilización de los azúcares con producción de sustancias de carácter ácido que bajan el valor de pH causando cambios del indicador rojo de fenol.
10	Sacarosa	
11	Maltosa	
12	Trifeniltetrazolio	Reducción del sustrato tetrazolio produciendo formazan rojo.
13	Resazurina	Reducción de la resazurina a resorufin produciendo un cambio de color.
14	Ornitina	Utilización de la ornitina con formación de productos de carácter básico que causan cambios en el indicador.
15	Urea	Hidrólisis de la urea con formación de productos de carácter básico que elevan el valor de pH y causa cambios en el indicador.
16	Penicilina G	Hidrólisis de la penicilina con formación de ácido peniciloico que baja el valor de pH causando cambios en el indicador.

Finalmente interpretar los resultados de acuerdo al cuadro No. 2

Cuadro No. 2 Cuadro para interpretar resultados

Pocillo No.	Resultado positivo	Resultado negativo
1,2,3,4,5,6,7,8	Amarillo	Incoloro o amarillo pálido

9,10,11	Amarillo o naranja claro	Rojo o naranja oscuro
12	Rojo óxido a rojo en el pocillo	Incoloro o pequeños precipitados a los lados del pocillo
13	Fucsia, malva o violeta Rojizo	Púrpura o azul oscuro
14	Rojo o rojo anaranjado	Amarillo, amarillo anaranjado o naranja claro
15	Rojo	Amarillo o naranja claro
16	Amarillo o amarillo verdoso	Púrpura, azul oscuro o marrón

CAPITULO VIII

8. BIBLIOGRAFIA

- 1 Albritton W. L. Penner S. Slaney L. Y Brunton J. Biochemical characteristics of *Haemophilus influenzae* in relationship to source of isolation and antibiotic resistance. J. Clin. Microbiol. 1978, Vol. 7 (519-523).
- 2 Azemun Parviz., Stull Terrence, Roberts Marilyn, Smith Arnold L. Rapid detection of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 1981. Vol.20 (168-170).
- 3 Back Andrew E. and Oberhofer Thomas R. Use of Minitex System for biotyping *Haemophilus species*. J. Clin. Microbiol. 1978. Vol. 7 (312-313)
- 4 Barbé G., Barbolat M., Boeufgras J.M., Monget D., and Freney J. Evaluation of API NH, a new 2 hour system for identification of *Neisseria* and *Haemophilus* species and *Moraxella catarrhalis* in a routine clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. 1994. Vol. 32 (187-189)
- 5 Barry A. L., Jorgensen J. H. Hardy D. J., Allen S. D., Baker C. N. *Haemophilus influenzae* ATCC 49766, an alternative quality control strain for monitoring broth microdilution susceptibility tests with selected β -lactams. J. Clin. Microbiol. 1992. Vol. 30. (2033 – 2037).
- 6 Barry Arthur L., Fuchs Peter C., Brown Steven D., Identification of β lactamase negative, ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* with four methods and eight media. Antimicrob. Agents Chemother 2001. Vol. 45 (1585-1588)

- 7 Blondeau J. M., Suter M., Borsos S. and the Canadian Antimicrobial Study group. Determination of the antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999. Vol. 43 (25-30).
- 8 Broadhurst Laurel Evans, Erickson Ralph L., Kelley Patrick W. Decreases in Invasive *Haemophilus influenzae* diseases in US Army children, 1984 through 1991. *JAMA* 1993 Vol.269 (227-231)
- 9 Burns Jane L., Mendelman Paul M., Levy Jack, Stull Terrence L., Smith Arnold L. A permeability barrier as a mechanism of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985. Vol.27. No.1. (46–54)
- 10 Butker D.L., Jakielaszek C.J., Miller L.A. and Poupard J.A. *Escherichia coli* ATCC 35218 as a Quality control isolate for susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* with *Haemophilus* test medium. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999. Vol. 43 (283-286)
- 11 Campos Joseph M. *Haemophilus*, p. 556 – 565. Murray Patrick R., Baron Ellen, Pfaeller Michael. et. al. *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed ASM PRESS.
- 12 Casadevall Arturo, Dobroszycki Joanna, Small Catherine. *Haemophilus influenzae* type b bacteremia in adults with AIDS and at risk for AIDS. *The American Journal of Medicine.* 1992. Vol. 92 (587-590)
- 13 Chang A. B. Stokes K. Robinson P. J. Bilateral empyema and pneumonia due to chloramphenicol-resistant *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatric pulmonology.* 1996. Vol. 22. (207 – 209).

- 14 Chapin Kimberle C. and Doern Gary V. Selective media for recovery of *Haemophilus influenzae* from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora. J. Clin. Microbiol. 1983 Vol. 17 (1163-1165)
- 15 Collins James K., Kelly Michael T. Comparison of Phadebact coagglutination, Bactogen latex agglutination, and counterimmunoelectrophoresis for detection of *Haemophilus influenzae* type b antigens in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 1983. Vol.17 No.6 (1005-1008)
- 16 Critchley L.A., Hickey M.L., Barth A.L., Mendes C., Rossi F.F., Sander H.S., Teixeira L.M., Sahm D.F. Antimicrobial resistance surveillance of 1997 – 1998 isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from Brazil. Poster A89. 99th General meeting of the American Society for Microbiology (Chicago, Illinois) May 30-June 3, 1999.
- 17 Daum Robert S., Siber George R., Kamon Jill S., Russell Rebeca R. Evaluation of a commercial latex particle agglutination test for rapid diagnosis on *Haemophilus influenzae* type b infection. Pediatrics. 1982.Vol. 69 No. 4 (466-471).
- 18 Deulofeu F, Nava J.M., Bella F., Martí C., Morera M.A. Font B., Fontanals D., Lite J., Garau J., Calderon A., Coll M. T. Uriz S., Pineda V., Prospective epidemiological study of invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1994. Vol. 13 (633-638)
- 19 Doern G. V. Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens of the respiratory tract. The American Journal of Medicine. 1995. Vol.99 (6B-3S – 6B-7S)
- 20 Doern Gary V. and Jones Ronald N. Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, and *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother 1998. Vol. 32 (1747-1753)

- 21 Doern Gary V. In Vitro susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*: Review of New National Committee for Clinical Laboratory standards Recommendations. J. Clin. Microbiol. 1992. Vol. 30. (3035 – 3038).
- 22 Doern Gary V., and Chapin Kimberle C. Laboratory identification of *Haemophilus influenzae*: Effects of basal media on the results of the satellitism test and evaluation of the Rapid NH System. J. Clin. Microbiol. 1984. Vol. 20 (599-601)
- 23 Doern Gary V., Brueggemann Angela B., Pierce Gary, Holley Preston H. and Rauch Alan. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of β -lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a National Multicenter Surveillance Study. Antimicrob. Agents Chemother 1997. Vol. 41 (292-297)
- 24 Doern Gary V., Jones Ronald N., Pfaller Michael A., Kugler Kari and the Sentry Participants Group. *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from patients with community-acquired respiratory tract infections: antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United states and Canada, 1997) Antimicrob. Agents Chemother. 1999. Vol. 43 (385-389)
- 25 Doern Gary V., Jorgensen James H., Thornsberry Clyde, Preston David A., Tubery Tracey, Redding Judith S. Maher Louise A. National Collaborative study of the prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother.. 1988. Vol.32. No. 2.
- 26 Edberg Stephen C., Melton Erwin, and Singer Jacques M. Rapid biochemical characterization of *Haemophilus species* by using the Micro-ID. J. Clin. Microbiol. 1980. Vol. 11 (22-26)

- 27 Falla Timothy J., Dobson Simon R.M., Crook Derrick W.M., Kraak Wilma A., Nichols Wright W., Anderson Eileen C., Jordens J. Zoe, Slack Mary P.E., Mayon-White Dick, Moxon E. Richard. Population-based study of non-typable *Haemophilus influenzae* invasive disease in children and neonates. Lancet 1993. Vol. 341 (851-854).
- 28 Farley Monica M., Stephens David S., Brachman Philip S., Harvey Christopher, Smith J. David, Wenger Jay D. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults. Annals of internal medicine. 1992. Vol. 116. (806 – 811).
- 29 Felmingham David, Grüneberg Reuben N. and The Alexander Project Group. The Alexander project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000. Vol. 45 (191-203).
- 30 Fuchs Peter C., Barry Arthur L., Brown Steven D. Influence of variations in tests methods on susceptibility of *Haemophilus influenzae* to ampicilina, azithromycin, clarithromycin, and telithromycin. J. Clin. Microbiol. 2001. Vol. 39 (43 – 46)
- 31 Gadberry Joseph L., and Amos Mary Ann. Comparison of a new commercially prepared porphyrin test and the conventional satellite test for the identification of *Haemophilus species* that require the X factor J. Clin. Microbiol. 1986. Vol. 23 (637-639)
- 32 García Ramos Elsa, Viveros Terrazas Guadalupe, González Elizalde Herminio, Escamilla Vicente, García Juan José. Caracterización y resistencia de las cepas de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* aisladas de la nasofaringe de portadores. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 1998. Vol.11 (17 – 24)

- 33 Grasso Robert J., West Loyd A., Holbrook Nikki J., Halkias Demetrios G., Paradise Lois J., Friedman Herman, Increased sensitivity of a new coagglutination test for rapid identification of *Haemophilus influenzae* type b. J. Clin. Microbiol., 1981, Vol.3 (1122-1124).
- 34 Haedman Joel, Limbird Lee E. et al. Las bases farmacológicas de la terapéutica. p. 1093-1224 Novena edición Ed. Mac Graw-Hill
- 35 Harper Jacqueline J. Tilse Martyn H.. Biotypes of *Haemophilus influenzae* that are associated with noninvasive infections. J. Clin. Microbiol. 1993. Vol. 29 (2539 – 2542).
- 36 Heelan Judith S. Chesney David. And Guadagno Gina Investigation of Ampicillin-Intermediate strains of *Haemophilus influenzae* by using the disk diffusion procedure and Current National Committee for Clinical Laboratory Standars Guidelines. J. Clin. Microbio.. 1992. Vol. 30 (1674-1677).
- 37 Himmelreich Carol A. Barenkamp Stephen J. Storch Gregory A. Comparison of methods for serotyping isolates of *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. 1985 Vol. 21 (158 – 160).
- 38 Hoogkamp-Korstanje J. A. A., Dirks-Go S. I. S., Kabel P., Manson W. L., Stobberingh E. E., Vreede R. W. and Davies B. I. Multicentre in-vitro evaluation of the susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* to ciprofloxacin, clarithromycin, co-amoxiclav and sparfloxacin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1999. Vol. 39 (411-414).
- 39 Ingram David L. Collier Albert M., Pendergrass Elizabeth, King Sara H. Methods for serotyping nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae*: Slide

- Agglutination, Quellung reaction, countercurrent immunoelectrophoresis, latex agglutination, and antiserum agar. J. Clin. Microbiol. 1979, Vol.9 No.5 (570-574).
- 40 Ingram David L., Collier Albert M., Pendergrass Elizabeth., King Sara . Methods for serotyping nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae*: Slide agglutination, Quellung reaction, countercurrent immunoelectrophoresis, latex agglutination and antiserum agar. . J. Clin. Microbiol. 1979. Vol. 9 (570-574)
- 41 Ingram David L., Pearson Anna W., Occhiuti Angela R. Detection of bacterial antigens in body fluids with the Wellcogen *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitides* (ACYW135) Latex agglutination tests. . J. Clin. Microbiol. 1983. Vol. 18 (1119-1121)
- 42 Jacobs M. R. Assessing the Quality of the Alexander Project. Journal of Chemotherapy. 1999. Vol. 11 (26-34)
- 43 Jacobs Michael R., Bajaksouzian Saralee, Zilles Anne, Lin Gengrong, Pankuch Glenn A., and Appelbaum Peter C. Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters:1997 U.S. Surveillance Study. Antimicrob. Agents Chemother. 1999. Vol. 43 (1901-1908)
- 44 Janda William M., Bradna Joanne J. and Ruther Phyllis. Identification of *Neisseria spp.*, *Haemophilus influenzae* spp. and other fastidious gram negative bacteria with the MicroScan *Haemophilus-Neisseria* Identification Panel. J. Clin. Microbiol. 1989. Vol. 27 (869-873)
- 45 Janda William M., Malloy Paula J., Schreckenberger Paul C. Clinical Evaluation of the Vitek *Neisseria-Haemophilus* identification card. J. Clin. Microbiol. 1987. Vol.25. No.1 (37 – 41).

- 46 Jones Ronald N., Biedenbach Douglas J., Erwin Meredith E. Beach Mondell L., Pfaller Michael A. and The Quality control study Group. Activity of Gatifloxacin against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*, including susceptibility test development, E-test comparisons, and Quality control guidelines for *H. influenzae*. J. Clin. Microbiol. 1999. Vol. 37 (1999-2002)
- 47 Jorgensen James H. Howell Anne W. Maher Louise A Quantitative Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* by using the E – test. J. Clin. Microbiol. 1991.Vol. 29. No. 1 (109-114).
- 48 Jorgensen James H. Howell Anne W. Maher Louise A. Antimicrobial susceptibility testing of less commonly isolated *Haemophilus* species using *Haemophilus* test medium. J. Clin. Microbiol. 1990. Vol. 28. No. 5 (985 – 988)
- 49 Jorgensen James H. Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clinical Infectious Diseases. 1992. Vol. 14 (1119 – 1123).
- 50 Jorgensen James H., Barry Arthur L., Doern Gary V., Ferraro Mary Jane. Development of revised quality control limits for disk diffusion susceptibility tests of selected Cephem antibiotics with *Haemophilus influenzae* and description of a new control strain. J. Clin. Microbiol. 1992. Vol.30 (2029 – 2032)
- 51 Kibsey Pamela C., Rennie Robert P. and Rushton Joyce E. Disk diffusion versus broth microdilution susceptibility testing of *Haemophilus* species and *Moraxella catarrhalis* using seven oral antimicrobial agents: application of updated susceptibility guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. J. Clin. Microbiol. 1994. Vol. 32 (2786-2790)

- 52 Killian M., Sorensen Inger, Frederiksen W.. Biochemical characteristics of 130 recent isolates from *Haemophilus influenzae* meningitis. J. Clin. Microbiol. 1979. Vol. 9 (409 – 412).
- 53 Killian M. 1985. *Haemophilus*, p. 463-470. Ballows Albert, Hausler William J., Heirmann Kenneth L., Isenberg. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C..
- 54 Kitzis M: D., Goldstein F. W., Miegi M. and Acar J.F. In vitro activity of levofloxacin, a new fluoroquinolone: evaluation against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1999. Vol. 43 (21-26).
- 55 Koneman Elmer et. al. Diagnostico Microbiológico 3^a edición 1998. editorial médica panamericana.
- 56 Laue Richard R., Kohner Peggy C. And Cockerill III Frank R. Comparison of In-House and Commercially Prepared *Haemophilus* test media for Disk Diffusion testing of Ampicillin against *Haemophilus species*. J. Clin. Microbiol. 1995. Vol. 33 (2240-2243)
- 57 Leinonen Maija, Käythy Helena. Comparison of counter-current immunoelectrophoresis, latex agglutination, and radioimmunoassay in detection of soluble capsular polysaccharide antigens of *Haemophilus influenzae* type b and *Neisseria meningitidis* of groups A or C. Journal of Clinical Pathology. 1978. Vol.31 (1172-1176).
- 58 Leinonen Maija, Sivonen Aulikki . Serological grouping of meningococci and encapsulated *Haemophilus influenzae* strains by latex agglutination. J. Clin. Microbiol. 1979, Vol.10. (404-408).

- 59 Mandell Gerald L., Bennett John, Dolin Raphael. Principles and practice of infectious diseases. p. 199-375 Editorial Churchill Livingstone 4th edition
- 60 Manninen Raija, Huovinen Pentti, Nissinen Antti and The Finnish Study Group for Antimicrobial resistance. Increasing antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Finland. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1997. Vol. 40 (387-392).
- 61 Marchese A., Debbia E. A. and Schito G. C. Comparative in vitro potency of gemifloxacin against European respiratory tract pathogens isolated in the Alexander Project. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000. 46 (11-15)
- 62 Markowitz Sheldon M. Isolation of an ampicillin-resistant, non- β lactamase-producing strain of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 1980. Vol. 17 (80-83)
- 63 Matthews Jana s., Reynolds Jorjean A., Weesner Donald E., Perry Jack L., and Jenkins Ann L. Rapid species identification and biotyping of respiratory isolates of *Haemophilus spp.* J. Clin. Microbiol. 1983. Vol. 18 (472-475)
- 64 Mendelman Paul M. Chaffin Donald O. Clausen Carla Stull Terrence L. Needham Cynthia Williams J.D. Smith Arnold L. Failure to detect ampicillin-resistant, non- β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* by standard disk susceptibility testing. Antimicrob. Agents Chemother. 1986. Vol.30. (274 – 280).
- 65 Mendelman Paul M., Chaffin Donald O., Stull Terrence L., Rubens Craig E., Mack Karl D., Smith Arnold L. Characterization of non- β -lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 1984. Vol. 26. (235 – 244)

- 66 Meyers Frederik H. Manual de Farmacología clínica 1ª. ed. Ed. El Manual Moderno
- 67 Mohlemann Kathrin, Alexander Russell E., Weiss Noel S., Pepe Margaret, Schopfer Kurt. Risk factors for invasive *Haemophilus influenzae* disease among children 2 – 16 years of age in the vaccine era, Switzerland 1991 – 1993. International Journal of Epidemiology. 1996. Vol.26. (1280 – 1285)
- 68 National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Vol. 17 No. 2 Fifthth edition; Approved estándar. M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova Pa.
- 69 National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance standars for antimicrobial disk susceptibility tests. Vol. 21 No. 1 Seventh edition; Approved standar. M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova Pa.
- 70 Nizet Victor, Colina F.Kenneth, Almquist Jon R., Rubens Craig E. and Smith Arnold L. A virulent nonencapsuled *Haemophilus influenzae*. The Journal of Infectious diseases 1996. Vol. 173 (180-186)
- 71 Oberhofer Thomas R., Back Andrew E. Biotypes of *Haemophilus* encountered in clinical laboratories. J. Clin. Microbiol., 1979. Vol.10. (168-174).
- 72 Ostroff Stephen M., Harrison Lee H., Khallaf Nagwa, Assaad Mona T., Harrington Susan. Resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolates recovered in Egypt from children with pneumonia. Clinical Infectious Diseases. 1996. Vol. 23. (1069 – 1074).

- 73 Palladino Silvano, Leahy Bradley J., and Newall Toni L. Comparison of the RIM-H rapid identification kit with conventional test for the identification of *Haemophilus spp.* J. Clin. Microbiol.. 1990. Vol 28 (1862-1863)
- 74 Paton R., Arnold J., Cockburn J. and Emmanuel F. X. S. Susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* to clarithromycin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000. Vol. 45 (529-531).
- 75 Rennie R., Gordon T., Yaschuck Y., Tomlin P., Kibsey P., Albritton W. Laboratory and clinical evaluations of media for the primary isolation of *Haemophilus species.* J. Clin. Microbiol. 1992. Vol. 30. No. 8 (1917 – 1921).
- 76 Sahm Daniel F., Jones Mark L., Diakun David R., Mani Satish V. and Thornsberry Clyde. Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in Asia and Europe, 1997-1998. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000. Vol. 45 (457-466).
- 77 Schito G. C., Debbia E.A. and Marchese A. The envolving threat of antibiotic resistance in Europe: new data from the Alexander Project. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000. Vol. 46 (3-9).
- 78 Shaw Eugene D., Darker Raymond J., Feldman William E., Gray Barry M., Pifer Linda L., Scott Gwendolyn B. Clinical studies of a new latex particle agglutination test for detection of *Haemophilus influenzae* type b polyribose phosphate antigen in serum, cerebrospinal fluid, and urine. J. Clin. Microbiol. 1982. Vol. 15 (1153-1156).
- 79 Sosa Iglesias Elodia Guillermina, Anaya Medina Angelina, Portillo Gómez Leopoldo, Bermúdez García Graciela, Gutiérrez Cazares Zita, Juárez Ahuactzin Edith, Mancilla González Sonia. Biotypes and serotypes of *Haemophilus*

influenzae of clinical isolates from Mexican children. Archives of medical research. 1998 29(133-136).

80 Stepanik D., Sucari A., Casellas J.M., Clara L., Marin M., Rossi A., Smayevsky J., Colichon A., Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Branhamella catarrhalis* isolated from patients with lower respiratory tract infections during 1997-1998. Poster A89. 99th General meeting of the American Society for Microbiology (Chicago, Illinois) May 30-June 3, 1999.

81 Strausbaugh Larry J. *Haemophilus influenzae* infections in adults. Postgraduate Medicine. 1997. Vol. 101. (191 – 200)

82 Tay Zavala Jorge . Microbiología y parasitología médicas. P 1.263-1.277. Segunda edición. Méndez editores

83 Thornsberry Clyde, Jones Mark E. Hickey Mary L., Mauriz Yolanda, Kahn James and Sahm Daniel F. Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in the United States, 1997-1998. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1999. Vol. 44 (749-759).

84 Trejo y Perez Juan A., Guiscafre G. Hector García M. Manuel, Jaime C. Mirna, González A. Silvia. Muñoz Onofre. Sensibilidad de *Haemophilus influenzae* a la ampicilina y al cloranfenicol en niños de la ciudad de México. Bol. Méd. Hosp. Infantil Méx. 1981. 38 (79-83).

85 Tsang Kenneth W., Rutman Andrew, Kanthakumar Kanthiah, Belcher John, Lund Valerie, Roberts, David E., Read Robert C., Wilson Cole., Wilson Robert. *Haemophilus influenzae* infection of human respiratory mucosa in low

concentrations of antibiotics. American Review Respiratory Diseases. 1993. Vol.148. (201 – 207).

86 Tubau F., Fernández-Roblas R., Liñares J., Martín R., Soriano F. In vitro activity of linezolid and 11 other antimicrobials against 566 clinical isolates and comparison between NCCLS microdilution and Etest methods. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2001. Vol. 47 (675-680).

87 Villaseñor-Sierra Alberto, Avila-Figueroa Carlos, Santos-Preciado José. Impacto de las infecciones por *Haemophilus influenzae* en niños mexicanos. Bol. Méd. Hosp. Infantil Méx. 1993 50(415-421)

88 Wallace R. J., Musher D. M., Septimus E. J., Mc Gowan J. E., Quinones F. J., Wiss K. Vance P. H., Trier P. A. *Haemophilus influenzae* infections in adults: characterization of strains by serotypes, biotypes, and β -lactamase production. The Journal of Infectious Diseases. 1981. Vol. 144. (101 – 106)

89 Ward Joel I. Editorial Response: Invasive infections due to *Haemophilus influenzae* serotype f (Hif) – Is Hif an emerging pathogen?. Clinical Infectious Diseases. 1996. Vol. 22 (1077 –1078).

90 Zhanel George G., Karlowsky James A., Low Donald E., The Canadian Respiratory Infection Study Group and Hoban Daryl J. Antibiotic resistance in respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected from across Canada in 1997-1998. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000. Vol. 45 (655-662).