



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE
HAEMOPHILUS INFLUENZAE AISLADOS DE
NASOFARINGE DE PORTADORES SANOS EN
EDAD PEDIATRICA DE ACUERDO A
BIOTIPOS Y SEROTIPOS**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

BIOLOGO

Presenta:

PEDRO RAYMUNDO VELAZQUEZ AREVALO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F. 1993



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 está 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.

C O N T E N I D O

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....	7
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVO.....	9
METODO.....	10
RESULTADOS.....	19
DISCUSION DE RESULTADOS.....	52
CONCLUSION.....	59
LITERATURA CITADA.....	61

RESUMEN

Durante el periodo comprendido entre Julio-92 a Marzo-93 se tomaron un total de 252 muestras de Nasofaringe, en los hospitales de Pediatría y Cardiología de niños portadores sanos. Se obtuvo un total de 76 aislamientos de *Haemophilus influenzae*. Siendo los serotipos No Tipificables los que se encontraron en mayor porcentaje (75 %), los serotipos a,c-f (15.8%) y los tipo b (9.2) se obtuvieron en menor porcentaje. El biotipo que más se encontro fue el I (35.5%), seguido por el biotipo IV (22.3%); el que menor porcentaje obtuvo fue el biotipo V, del biotipo VI no se encontro ninguna cepa. Se obtuvieron cepas resistentes a los siguientes antimicrobianos: Amoxicilina(6 especies), Ampicilina (18), Amoxicilina Clavulanato (2), Eritromicina(1), y Penicilina(19). Cloranfenicol, Cefuroxime, Ceftriaxone y Mlocamicina fueron los antimicrobianos más eficientes. El biotipo I No Tipificable fueron las especies con mayor porcentaje de resistencia. Se encontro que en las épocas estacionales de verano e invierno la proporción de aislamientos fue semejante, así como los biotipos y serotipos. Sin embargo se encontraron más cepas resistentes (61.1%) en la época estacional de invierno. Por lo anterior, se considera al Cloranfenicol, principalmente, como un antibiotico de primera elección en enfermedades graves ocasionadas por *H. influenzae*.

INTRODUCCION.

Los miembros del género *Haemophilus* son bacterias que forman parte de la flora normal del aparato respiratorio humano y de muchas especies animales, siendo *Haemophilus influenzae* la especie más importante desde el punto de vista clínico.

Su forma es de bacilo o cocobacilo gramnegativo, generalmente menores de 1 de ancho y longitud variable con marcado pleomorfismo, algunas veces forman hilos largos y filamentosos. Son inmóviles, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos. Son exigentes nutricionalmente, ya que requieren factor X (Hemina) y factor V (Nicotinamida Adenina Dinucleotido). *Haemophilus influenzae* requiere ambos factores , mientras que otras especies del género requieren solo uno de ellos (8,9,12,26,28,35).

Un gran número de especies poseen capsula, la que juega un papel importante en la patogenicidad, especificidad de serotipo y producción de inmunidad. Las cepas capsuladas de *Haemophilus influenzae* se clasifican serológicamente en seis tipos, con base en la composición química de la cápsula, designándose de la a-f. El serotipo b se asocia

con más frecuencia a enfermedades sistémicas y meningitis, sobre todo en niños menores de cinco años, sin embargo los serotipos a,c y f, también pueden producir meningitis. También se la asocia con otras enfermedades como son : Otitis Media, Neumonía, Artritis Séptica, Celulitis, etc. (2,5,11,12,14-17,20-22,24,26).

En nuestro país, se reporta que en los casos de ingreso a hospitales del Distrito Federal y de la ciudad de Puebla que *Haemophilus influenzae* tipo b es el responsable del 20 al 45 % de las meningoencefalitis bacterianas en niños menores de cinco años de edad (21,34).

Las cepas de *Haemophilus influenzae* se han diferenciado en ocho biotipos (34). La importancia de determinar el biotipo ha sido demostrado en varios estudios, en donde se encuentra que la mayoría de las cepas en casos de meningitis y las que mostraron mayor resistencia a los antimicrobianos pertenece al biotipo I (22,24,26,35).

Se reporta también en este sentido que el número de aislamientos de *Haemophilus influenzae* varía de acuerdo a la época estacional en que se toman las muestras (20).

La resistencia de los microorganismos a los medicamentos surge a consecuencia de cambios genéticos y de los procesos subsiguientes de selección por los medicamentos antimicrobianos, esto es, por tratamiento con el antibiotico frente al que ha desarrollado la resistencia, el mutante queda selectivamente protegido y puede multiplicarse, mientras que los organismos más sensible son destruidos. Estos cambios genéticos pueden dividirse en : a) Resistencia cromosómica y b) Resistencia extracromosómica. En los primeros se desarrolla como resultado de la mutación espontánea en un locus que controla la susceptibilidad a un antimicrobiano determinado. En los segundos, las bacterias contienen elementos genéticos extracromosómicos llamados Plásmidos. Los factores R constituyen una clase de plásmidos que portan genes para la resistencia a uno y a menudo a varios medicamentos. Sin embargo también existen mecanismos de resistencia no genéticos. En estos casos los microorganismos pueden perder la estructura de blanco específico para algún medicamento durante varias generaciones y adquirir de esta forma la resistencia (15,22)..

Desde hace aproximadamente 20 años se han reportado

cepas resistentes de *Haemophilus influenzae* a ciertos antibióticos. Para *Haemophilus influenzae* en 1974, se reportaron en EEUU las primeras cepas resistentes a la Ampicilina, encontrándose que el mecanismo de resistencia fue por la producción de β -lactamasa, mecanismo responsable de la resistencia a la ampicilina en el 95% de los casos (2,5,16,30).

En nuestro país en 1978 se encontraron cepas de *Haemophilus influenzae* del tipo b aislados del líquido cefalorraquídeo (LCR) de niños con meningoencefalitis purulenta resistentes a este antimicrobiano (20).

Desde 1980, se han reportado cepas de *Haemophilus influenzae* resistentes al Cloranfenicol, considerado hasta nuestros días como un medicamento de primera elección (2,20,38).

En 1985 la Federal Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, autorizó la vacuna del polisacárido capsular *H. influenzae* tipo b, la cual no es inmunogénica en menores de 18 meses de edad. Desde entonces se empezaron a evaluar las vacunas de *Haemophilus* conjugadas con proteína, que incluyen el polisacárido capsular PRP asociado covalentemente al toxoide diftérico (D) o al tetánico

(T), a proteínas de la membrana externa de meningococo (OMP) o bien, oligosacárido de *H.influenzae. tipo b* asociado a CRM, que es una molécula atóxica de la toxina diftérica. En 1987 se autorizó la primera vacuna conjugada la cual resultó ser inmunogénica en niños menores de 18 meses y en 1991 se dejó de recomendar la vacuna de polisacárido solo y se hizo obligatorio en Estados Unidos la administración en infantes de la vacuna conjugada contra *H.influenzae* tipo b. En la actualidad se cuenta con cuatro vacunas que tienen un mayor efecto inmunogénico en menores de año y medio de edad: PRP-D, PRP-CRM, PRP-OMP, y PRP-T (34).

Por lo anterior, se hizo necesario la realización del presente trabajo sobre la sensibilidad de estos microorganismos a algunos antimicrobianos de primera elección, así como determinar su variación estacional en tres épocas estacionales del año.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Haemophilus influenzae es una bacteria de gran importancia clínica, ya que son causantes de una gran variedad de enfermedades. Sin embargo, en México no existe información reciente sobre estos microorganismos. En este sentido fue necesario realizar el presente estudio sobre la sensibilidad de estos microorganismos a algunos antimicrobianos de primera elección especialmente a Ampicilina y Cloranfenicol, así como determinar la variación del número de aislamientos, tipos y biotipos de esta bacteria en tres diferentes épocas del año.

El estudio se realizó con niños sanos con edades entre los dos meses y 14 años de edad, asistentes al Hospital de Pediatría y al Hospital de Cardiología, ubicados en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

HIPOTESIS.

El porcentaje de resistencia de *Haemophilus influenzae* a los antimicrobianos de primera elección ha aumentado a partir del último reporte publicado en nuestro país.

El número de aislamientos es mayor en la época estacional de invierno; así como la especificidad de sus serotipos y los biotipos.

La producción de β -lactamasas es el mecanismo de resistencia más frecuente en *Haemophilus influenzae*; el porcentaje de producción de β -Lactamasa sería diferente de acuerdo al biotipo.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Determinar la resistencia de *Haemophilus influenzae* a nueve antimicrobianos en microorganismos aislados de nasofaringe de niños portadores sanos.

Objetivos Particulares.

Determinar el porcentaje de aislamientos de *Haemophilus influenzae* en muestras de nasofaringe de portadores sanos en edad pediátrica en las épocas estacionales de Verano, Otoño e Invierno.

Conocer la resistencia de *Haemophilus influenzae* a Amoxicilina, Ampicilina, Amoxicilina Clavulanato, Cloranfenicol, Cefuroxime, Eritromicina, Miocamicina, Penicilina y Ceftriaxone.

Determinar la correlación entre las cepas resistentes de *Haemophilus influenzae* y sus biotipos.

Determinar la correlación de biotipos y la producción de β -Lactamasa.

METODO.

A) Toma de Muestras.

Se tomaron muestras de nasofaringe por medio de hisopos con algodón estéril en niños sanos con edades comprendidas entre los dos meses y 14 años de edad, que asistieron a consulta externa del Hospital de Pediatría y al Hospital de Cardiología en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del I.M.S.S. Se utilizó el medio de Stuart (24) para transportar las muestras al laboratorio, en donde se analizaron.

B) Trabajo Experimental.

Las muestras obtenidas se sembraron inmediatamente en Agar Chocolate enriquecido y se incubaron en atmósfera de Dióxido de Carbono al 10% a 37° C durante 24 horas (6,7,33,35).

La identificación del *Haemophilus influenzae* se realizó de acuerdo a los siguientes métodos.

1.- Morfología : La bacteria *Haemophilus influenzae* creció en el Agar Chocolate Enriquecido como colonias semitraslúcidas , húmedas , lisas , convexas y sin olor característico (26,35).

2.- Tinción de Gram : Se observaron bacilos pleomórficos gramnegativos (26,33).

3.- Prueba de Satelitismo a colonias de *Staphylococcus aureus* . Esta prueba se utilizó para conocer los requerimientos nutricionales de *Haemophilus influenzae*. Se realizó un subcultivo de la bacteria problema en Agar Sangre de Carnero con y sin estria de una cepa de *Staphylococcus aureus*, la cual proporciono el Factor V (NAD) que requiere el *Haemophilus influenzae* para su crecimiento. Esta bacteria apareció como pequeñas colonias tipo " gota de rocío " dentro de las zonas productoras del Factor V (24,26,34,35).

4.- Prueba de la Oxidasa : Esta prueba indicó la presencia de la enzima Citocromo Oxidasa presente en las bacterias gramnegativas . Con una varilla de madera se tomó una pequeña porción de la colonia del microorganismo en estudio

y se frotó sobre el disco de oxidasa previamente húmedo con solución fisiológica estéril. El *Haemophilus influenzae* dio una reacción positiva a esta prueba (14,26,34,35).

5.- Prueba de la Catalasa : La bacteria que posee la enzima de la Catalasa, cataliza la liberación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. *Haemophilus influenzae* dio una prueba positiva . Con un pabillo aplicador se transfieren células del centro de una colonia aislada a la superficie de un portaobjetos. Se agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre las células que se probaron (14,26,34,35).

7.- Prueba Serológica : La prueba que se utilizó fue la de Aglutinación en Placa . Las bacterias y otras células en suspensión se aglutinan cuando se mezclan con anticuerpos dirigidos contra los componentes de su superficie . Se hizo una suspensión gruesa de la bacteria por identificar en solución de cloruro de sodio 0.15 N . Se colocó una gota sobre una placa de aglutinación y se le agregó una gota del antisuero tipificador conocido. Se agitó con un aplicador de madera y se buscó la formación de grumos bacterianos

en un lapso de 1 minuto, se determinaron los serotipos b, a, c-f y los No Tipificables (26,34). El reactivo de coagulación puede adquirirse comercialmente (Phadebact).

8.- Biotipos. Para la diferenciación de los biotipos se utilizaron las siguientes pruebas bioquímicas :

Prueba del Indol . El sustrato fue L-triptófano 0.1% en buffer fosfato 0.05M a pH 6.8. Después de la incubación durante cuatro horas con las bacterias , se añadió un volumen de reactivo de Kovacs y se agitó la mezcla . El color rojo en la fase superior de alcohol nos indicó la presencia del indol .

Prueba de Ureasa : El sustrato se preparo con 0.1 g Fosfato de Potasio monobásico y 0.1g de Fosfato de Potasio Dibásico, 0.5 g de Cloruro de Sodio y 0.5 ml de Rojo de Fenol diluido (1:500 en 100 ml de agua destilada). Se ajustó el pH a 7.0 con Hidróxido de Sodio, se pasó por autoclave y se añadieron 10.4 ml de solución acuosa de urea al 20%. El color rojo rosado que apareció dentro de las primeras cuatro horas de incubación nos indicó una reacción positiva, (presencia de la ureasa),

mientras que una reacción negativa fue la que se obtuvo al no haber cambio de color (amarillo anaranjado) en el medio.

Prueba de la Ornitina Descarboxilasa . El sustrato fue el utilizado para otras bacterias . No obstante se inoculó abundantemente de la bacteria . El desarrollo de un color púrpura en 4 a 24 horas nos indicó la actividad de la ornitina descarboxilasa (26).

En base al tipo de reacción (positiva o negativa) que desarrollo la cepa problema en estas tres pruebas se determino el biotipo que le correspondió de acuerdo al siguiente cuadro (Lennette).

BIOTIPO	Indol	Ureasa	Ornitina
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
VI	+	-	-

9.- Las cepas se conservaron en caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI) con 15% de glicerol y se congelaron a -70°C para utilizarse posteriormente.

10.- Producción de β -Lactamasa . La prueba que se utilizó para demostrar la producción de β -Lactamasa fue la del Método Iodométrico. Basada en la producción del Acido Penicilólíco. Se preparó una solución de yodo disolviendo 2.03 g de yodo y 53.2 g de Yoduro de Potasio en 100 ml de agua destilada. Una solución de almidón indicador disolviendo 1 g de almidón en 100 ml de agua destilada. Una solución reguladora de fosfatos 0.05 M a pH 5.8, y una solución de Penicilina-G disolviendo 10,000,000 UI en 10 ml de regulador de fosfatos . Se dividieron en volúmenes de 0.5 ml y se congelaron hasta su utilización. Se preparó una suspensión del desarrollo bacteriano en la mezcla penicilina-regulador, de aproximadamente 10 células (standard el Num.1 de Mac Farland). Se incubaron una hora a temperatura ambiente y se añadieron dos gotas de almidón indicador y una pequeña gota de solución de yodo y se mezcló. Se incluyó como control una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de β -Lactamasa y como

control negativo una cepa bacteriana no productora de β -Lactamasa. La aparición rápida de un color azul se debió a la reacción del yodo con el almidón; Se agito la mezcla durante 1 minuto. La persistencia del color azul por más de 10 minutos constituyó una prueba negativa. Al contrario la decoloración rápida del medio nos indicó una prueba positiva (24,34,39).

Prueba de Sensibilidades.

Método Dilución Seriada en Placa.

El medio que se utilizó para llevar acabo esta prueba en *Haemophilus influenzae* fue Agar de Mueller-Hilton adicionando sangre de carnero y enriquecimiento, se calentó hasta obtener un agar chocolatado.

La cantidad de antibiótico y el volumen que se utilizó para realizar la diluciones se determino por medio de las siguientes fórmulas :

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración (mcg/ml)}}{\text{Potencia (mcg/mg)}}$$

$$\text{Volumen (ml)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potencia (mcg/ mg)}}{\text{Concentración (mcg/ml)}}$$

Las concentraciones que se utilizaron fueron las siguientes : 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0 mcg/ml.

Preparación de Placas.

Cada placa contenía 20 ml de agar con el antibiótico. En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó el volumen del antibiotico que se obtuvo en los cálculos realizados por medio de las fórmulas anteriores. Se le agregó 40 ml de agar (a 50° C aproximadamente) y se mezclaron, se vertieron 20 ml a una primera placa de petri, la cual contenía la concentración más alta del antibiótico (64 mcg/ml).

Posteriormente a los 20 ml restantes en el primer matraz, se le agregaron otros 20 ml de agar y se mezclaron, se vertieron 20 ml a una segunda placa (concentración de 32 mcg/ml). Este procedimiento continuó hasta que la concentración fue de 0.06 mcg/ml. Este procedimiento se realizó para cada uno de los nueve antimicrobianos.

La cepa problema y los controles conocidos se sembraron en caldo de BHI, a partir del cultivo obtenido en agar chocolate. La suspensiones se ajustaron hasta igualar la turbiedad del tubo 0.5 de Mac Farland y antes de usarse se diluyó 1:10.

Cada cepa y los controles se colocaron en los pozos del Replicador de Steers. Se replicaron sobre la superficie de cada una de las placas que contenian cada dilución del antimicrobiano. Se incubaron a 37° C durante 4 horas en atmosfera parcial de bioxido de carbono. Al termino de la incubación, se busco el crecimiento bacteriano y se determino la concentracion minima inhibitoria (CMI) del antimicrobiano. Se registró la CMI para la cepa problema y ese valor se comparo con lo reportado en la literatura, para reportar la cepa como resistente o sensible al antimicrobiano probado (24,26,31).

R E S U L T A D O S

Se analizaron un total de 252 muestras, aislandose 76 cepas de *Haemophilus influenzae* obteniendose por lo tanto un porcentaje del 30.1%. En el cuadro uno se muestra el porcentaje de aislamientos que se obtuvieron según el tipo de cultivo analizado. El porcentaje más alto se obtuvo para las muestras de nasofaringe (15.5%), sin embargo, estadísticamente no existen diferencias significativas con las muestras tomadas de faringe (14.6%).

Cuadro 1. Relación entre el % de aislamientos y tipo de Cultivo.

Tipo de Cultivo	No. de Cultivos	No. de Aislamientos	%/tipo de Cultivo	% Total
Nasofaríngeo	161	39	24.2	15.5
Faríngeos	91	37	40.6	14.6
Total	252	76	30.1	30.1

El cuadro 2 muestra la relación entre los serotipos y el tipo de muestra que se analizó. Se encontró que en los dos tipos de cultivo el porcentaje más alto que se obtuvo fueron para las especies No Tipificables (75%) y el de menor porcentaje fue el serotipo b (9.2%). La diferencia, por el análisis de proporciones mostró ser estadísticamente significativa ($p = < 0.0001$).

Cuadro 2. Porcentaje de Serotipos de *H. influenzae*
 * No Tipificables.

Tipo de Cultivo	Aislamientos	SEROTIPOS		
		b	acf	H.T.*
Nasofaríngeo	76	7	12	57
Porcentaje	100	9.2	15.8	75.0

En lo que respecta a la relación entre los biotipos de *H. influenzae* que se muestran en el cuadro 3, se encontró que los biotipos con excepción del biotipo VI estuvieron representados. Las diferencias entre los biotipos que se pueden apreciar son en relación al biotipo I, en donde el porcentaje fue mayor para las muestras de nasofaringe (23.7% vs 35.5%). Sin embargo el biotipo IV se obtuvo en mayor porcentaje en los cultivos de faringe (15.8% vs 22.3%). En lo que respecta al total de biotipos encontrados, el mayor porcentaje corresponde al biotipo I (35.5%), seguido por el biotipo IV (22.3%) y el de menor presencia fue el biotipo V (9.2%). No se encontró cepas del biotipo VI.

Cuadro 3. Porcentaje de Biotipos.

* No se encontro ningun biotipo VI.

Tipo de Cultivo	BIOTIPOS*				
	I	II	III	IV	V
Nasofaríngeo	27	12	13	17	7
Porcentaje	35.5	15.8	17.1	22.3	9.2

El Cuadro 4 nos muestra la relación entre los serotipos y los biotipos que se determinaron del *Haemophilus influenzae*. De los siete aislamientos de *H. influenzae* tipo b tres fueron del biotipo I, dos del biotipo III y los dos restantes fueron uno para el biotipo II y otro para el biotipo IV. En lo que respecta para los 12 tipos a, c-f, los biotipos I y IV obtuvieron 4 cepas cada uno. Los otros cuatro tipos restantes fueron 3 para el biotipo II y uno para el biotipo V. Las cepas No Tipificables que se encontraron fueron 57 cepas, siendo el biotipo I el que obtuvo el mayor número de ellos con 20 cepas, seguido por el biotipo IV con 12 cepas. El biotipo V fue el que menor número de cepas no tipificables obtuvo.

Cuadro 4. Relación entre Serotipos y Biotipos.

Serotipo	BIOTIFOS				
	I	II	III	IV	V
Tipo b	3	1	2	1	-
Tipo acf	4	3	-	4	1
N.T.	20	8	11	12	6

En lo que se refiere a las pruebas de sensibilidad, sólo en Amoxicilina, Ampicilina, Amoxicilina Clavulanato, Eritromocina y Penicilina se encontraron cepas resistentes. Los resultados son presentados en terminos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada uno de estos antimicrobianos.

Para Amoxicilina, se encontraron seis cepas resistentes, cuatro cepas con una CMI de 8 mcg/ml y dos con CMI de 64 mcg/ml. Cabe señalar que se considero como cepa resistente a aquella que crecio a concentraciones \geq a 8 mcg/ml.

La relación que se encontro entre los serotipos,biotipos de *H. influenzae* y su resistencia a este antibiotico se muestra en el cuadro 5. Se obtuvieron cuatro cepas con serotipo N.T., dos con biotipo I, una con biotipo III y una del biotipo IV; una cepa con serotipo b, biotipo I y la última con serotipo acf biotipo II. Como se puede apreciar las cepas No tipificables con biotipo I fueron las que se obtuvieron en mayor proporción. Las 60 cepas restantes fueron sensibles a este antibiotico con una CMI de menos de 1 mcg/ml (ver fig.1).

**Cuadro 5. RELACION ENTRE
SEROTIPOS, BIOTIPOS Y LA RESISTENCIA
A AMOXACILINA.**

SEROTIPOS	BIOTIPOS				
	I	II	III	IV	V
b	1	-	-	-	-
acf	-	1	-	-	-
N.T.	2	-	1	1	-

SENSIBILIDAD DE H.influenzae RESISTENCIA a Amoxicilina \geq 8.0 mcg/ml.

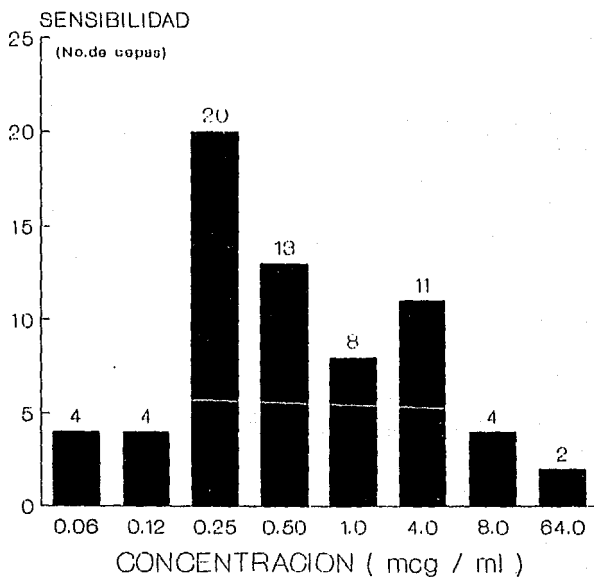


Fig.1

■ Amoxicilina

Para la Ampicilina se encontraron 18 cepas resistentes con CMIs de 4 (11 cepas), 8 (4 cepas), 16 (1 cepa) y 64 (2 cepas) mcg/ml. En donde los serotipos No Tipificables fueron los que se encontraron en mayor proporción con 11 cepas, cuatro con biotipo I, cuatro con biotipo III y tres con biotipo IV. El biotipo I fue el que estuvo representado en mayor cantidad con seis cepas, seguido por los biotipos III y IV con cinco cepas cada uno (ver cuadro 6). Las 48 cepas restantes fueron sensibles a este antimicrobiano a una CMI \leq a 1 mcg/ml (ver fig.2).

**Cuadro 6. RELACION ENTRE
SEROTIPOS, BIOTIPOS Y LA RESISTENCIA
A AMPICILINA.**

SEROTIPO	BIOTIPOS				
	I	II	III	IV	V
b	1	-	1	1	-
acf	1	2	-	1	-
N.T.	4	-	4	3	-

SENSIBILIDAD DE H.influenzae.

Resistencia a Ampicilina \geq 4.0 mcg/ml

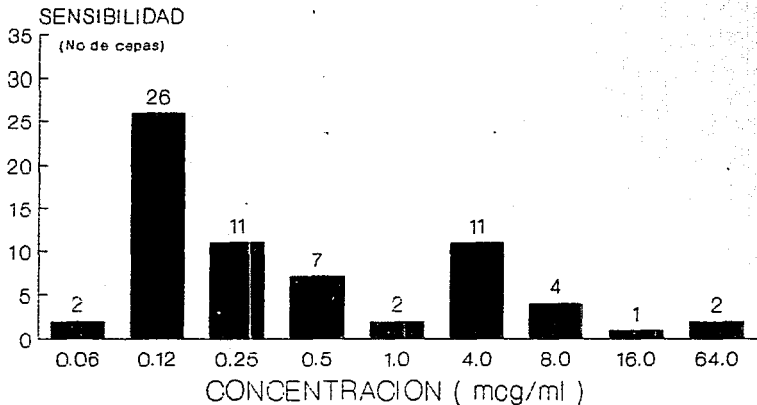


Fig.2

■ Penicilina

En lo que respecta a Amoxicilina Clavulanato se obtuvieron sólo dos cepas resistentes con CMIs de 64 mcg/ml. Una de ellas fue del biotipo I y una del biotipo III, ambas fueron no tipificables (ver cuadro 7, fig. 3).

Para la Eritromicina se obtuvo una sólo cepa resistente con biotipo IV no tipificable (ver cuadro 8, fig.4).

En lo que se refiere a la Penicilina se obtuvieron 19 cepas resistentes a este antimicrobiano, 18 cepas fueron las mismas especies que fueron resistente a Ampicilina. La otra especie resistente que se obtuvo fue del biotipo I, serotipo b (ver cuadro 9, fig.5).

Para los antimicrobianos Mlocamicina , Cloranfenicol , Ceftriaxon y Cefuroxime todas las cepas fueron sensibles a estos antibióticos (ver figs.6,7,8,9).

**Cuadro 7. RELACION ENTRE
SEROTIPOS, BIOTIPOS Y LA RESISTENCIA
A AMOX.CLAVULANATO.**

SEROTIPOS	BIOTIPOS				
	I	II	III	IV	V
b	-	-	-	-	-
acf	-	-	-	-	-
b	1	-	1	-	-

SENSIBILIDAD DE H.influenzae.

Resistencia a Amox. Clav. \geq 4.0 mcg/ml

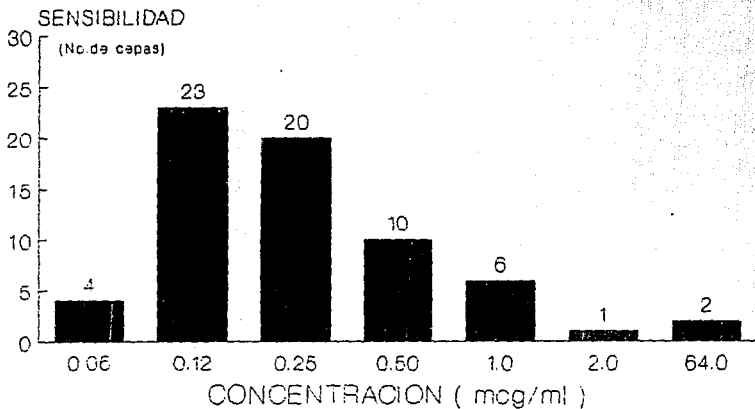


Fig.3

■ Amox.Clav.

Cuadro 8. Relación entre los serotipos, biotipos y la Resistencia a Eritrimicina.

Serotipo	BIOTIPOS				
	I	II	III	IV	V
b	-	-	-	-	-
acf	-	-	-	-	-
N.T.	-	-	-	1	-

SENSIBILIDAD DE H.influenzae

Resistencia a Miocamicina ≥ 64 mcg/ml

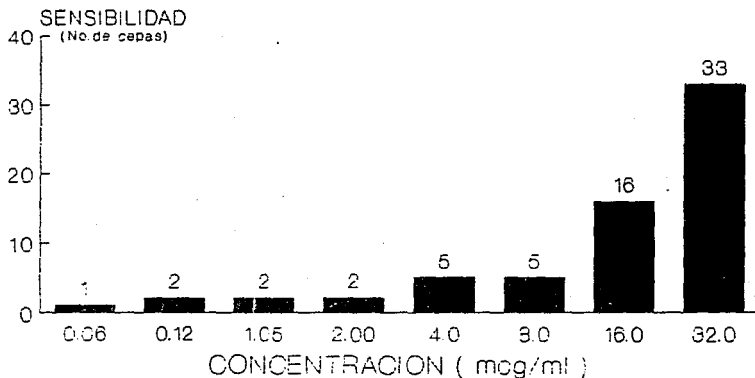


Fig.4

■ Miocamicina

Cuadro 9. Relación entre los serotipos, biotipos y la Resistencia a Penicilina.

SEROTIPOS	BIOTIPOS				
	I	II	III	IV	V
b	2	-	1	1	-
acf	1	2	-	1	-
N.T.	4	-	4	3	-

SENSIBILIDAD DE H.influenzae

Resistencia a Ceftriaxone \geq 4 mcg/ml

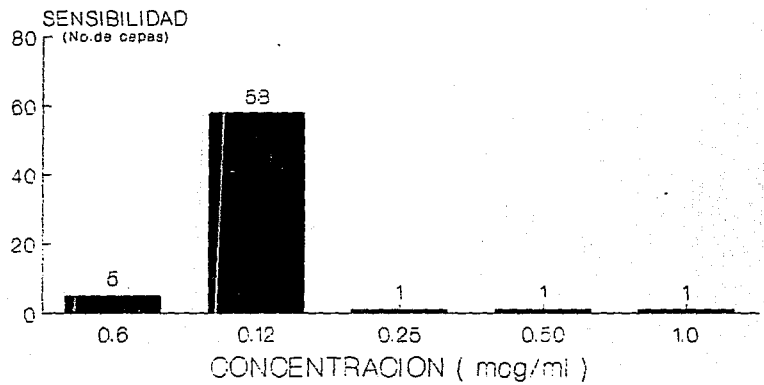


Fig 5

■ Ceftriaxone

SENSIBILIDAD DE H.influenzae

Resistencia a Cloranfenicol ≥ 8 mcg/ml

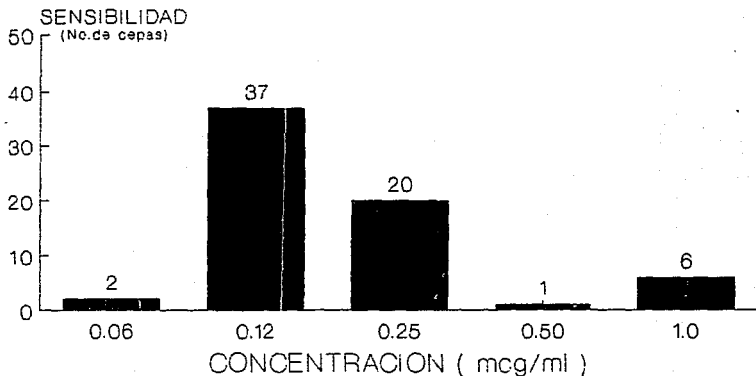


Fig 6

■ Cloranfenicol

SENSIBILIDAD DE H.influenzae

Resistencia a Eritromicina \geq 8 mcg/ml

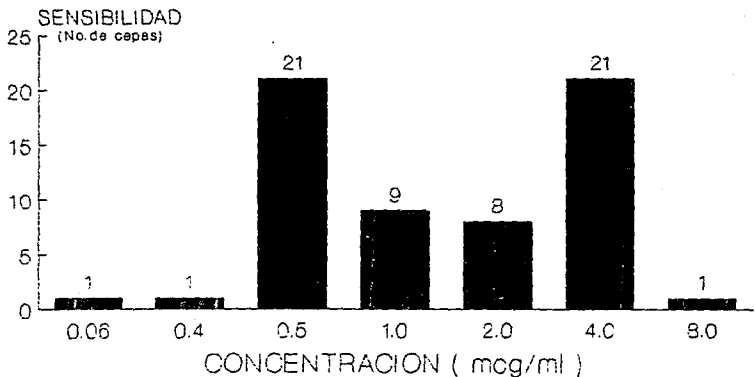


Fig.7

■ Eritromicina

SENSIBILIDAD DE H.influenzae

Resistencia a Penicilina \geq 1 mcg/ml

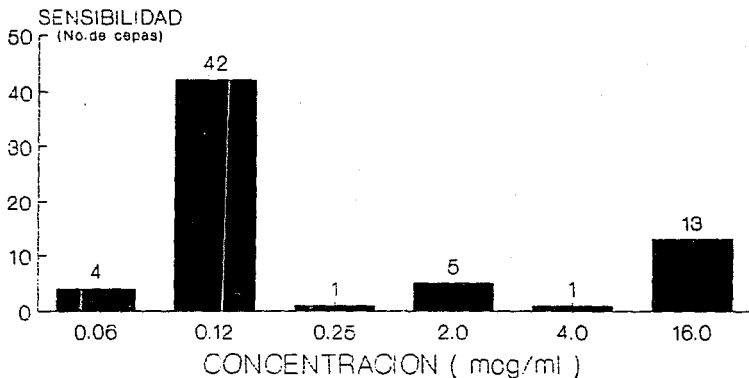


Fig 8

■ Penicilina

SENSIBILIDAD DE H.influenzae

Resistencia a Cefuroxime \geq 16 mcg/ml

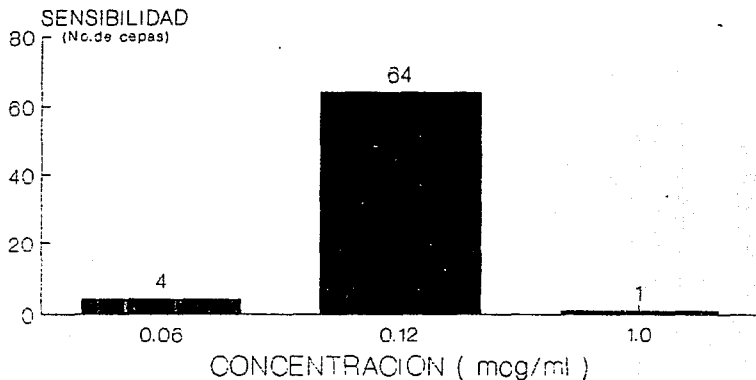


Fig 9

■ Cefuroxime

Cinco de las 18 cepas resistentes a Ampicilina fueron positivas en la determinación de β -Lactamasa (27.8%) . La relación entre la producción de β -Lactamasa , biotipos y serotipos de *H. influenzae* se muestra en el Cuadro 10. Del biotipo I se encontraron dos cepas , las tres restantes fueron de los biotipos II , III y IV . Los serotipos encontrados fueron dos del serotipo a, c-f , dos no tipificables y una cepa del serotipo b.

Cuadro 10. Relación entre los Serotipos, Biotipos y la Producción de β -Lactamasa de *H. influenzae*.

SEROTIPOS	BIOTIPOS				
	I	II	III	IV	V
b	1	-	-	-	-
acf	-	1	-	1	-
N.T.	1	-	1	-	-

En lo que respecta a la variación del número de aislamientos, *Haemophilus influenzae* en las tres épocas del año en las que se realizó el presente trabajo se observa en el Cuadro 11. En donde se muestra que para Verano se obtuvieron 21 muestras, para Otoño 115 muestras y 116 muestras para Invierno. El número de aislamientos más alto se obtuvo en la estación de Invierno con 37 cepas (31.9%), para Otoño se obtuvieron 33 cepas (28.7%) y para Verano se obtuvieron 0 cepas (28.6%).

En lo que respecta a los serotipos, en Otoño se encontraron el mayor número de cepas con serotipo b; en Invierno se obtuvieron el mayor número de cepas tipo a, c-f, no se encontró ninguna cepa en Verano. Las especies no tipificables se encontraron en mayor proporción en Invierno con 29 cepas.

En general, las especies no tipificables se encontraron en mayor proporción que los otros serotipos en las tres estaciones del año. Los biotipos más representados en estas épocas fueron los biotipos I con 13 cepas para Otoño e Invierno respectivamente, del biotipo IV se obtuvieron ocho y seis cepas respectivamente para Invierno y Otoño, solamente 3 para Verano. El biotipo V se encontró en mayor proporción en Otoño (cuadro 12).

Cuadro 11. Porcentaje de
Aislamientos de *H. influenzae*
en tres Estaciones del Año.

Estación del Año	Num. de Muestras	Num. de Aislamientos	Porcentaje
VERANO	21	6	28.5
OTOÑO	115	33	28.7
INVIERNO	116	37	31.9
TOTAL	252	7	89.1

La relación entre la sensibilidad a los 9 antimicrobianos probados en *Haemophilus influenzae*, la producción de *B*-Lactamasa y las épocas estacionales se muestran en los Cuadros 12 y 13. Se observa que la mayor cantidad de las cepas resistentes a Amoxicilina, Ampicilina, Amoxicilina Clavunato, Eritromicina y Penicilina, se encontraron en Invierno. En este mismo sentido está la producción de *B*-Lactamasa en donde tras de las cinco cepas positivas se encontraron en Invierno y en Otoño se obtuvieron las dos restantes.

Cuadro 12. Variación de Serotipos y Biotipos de *H. influenzae*, en tres estaciones del año.

Estación del año	SEROTIPOS			BIOTIPOS				
	b	acf	N.T.	I	II	III	IV	V
VERANO	2	-	4	1	1	1	3	-
OTOÑO	4	5	24	13	6	2	6	6
INVIERNO	1	7	29	13	5	10	8	1
TOTAL	7	12	57	27	12	13	17	7

Cuadro 13. Relación entre la Resistencia Antimicrobiana y la Producción de *B*-Lactamasa de *H. influenzae* en tres estaciones del año.

Estación del año	Amoxac	Ampic	Amox Clav	Eritro	Ponic	B-Lact.
VERANO	1	2	-	-	2	-
OTOÑO	2	5	-	-	6	2
INVIERNO	3	11	2	1	11	3
TOTAL	6	18	2	1	19	5

DISCUSION DE RESULTADOS.

El porcentaje de aislamiento obtenido de *Haemophilus influenzae* (30.1%) , en muestras de nasofaringe de niños portadores sanos, corresponde con lo reportado en la literatura. Esto es, en nuestro país se reporta un porcentaje de aislamiento de 15.4% (20) , obtenido en las épocas estacionales de Verano y Otoño y en estudios que se han realizado en la época de invierno principalmente (19), el porcentaje de aislamiento es de 36.2%. El presente trabajo se realizó en las épocas de Otoño e invierno aunque también se realizaron muestreos en Verano pero en menor proporción ; por lo tanto consideramos que el porcentaje de aislamiento puede estar en relación con las épocas estacionales del año, como lo sugieren algunos autores (4,20,25).

Las especies de *H. influenzae* No Tipificables, fueron las especies que encontramos en mayor porcentaje (75%), resultados que coinciden con estudios realizados en poblaciones abiertas, en donde se reporta a las especies de *H. influenzae* No Tipificables como las de mayor

porcentaje de aislamiento, mientras que en poblaciones cerradas, las especies con serotipo b, son las más importantes (2,25).

En nuestro país (2), se reporta que las especies No Tipificables se encuentran en su mayoría en nasofaringe y oído. El biotipo que se encontró con mayor frecuencia en las especies No Tipificables, fueron los biotipos I y IV, en este punto se reporta en la literatura internacional que en las especies tipificables los biotipos que se encuentran principalmente son el I y el IV y para las especies No Tipificables, los biotipos más frecuentes son el II, III y V (5,23). Consideramos que una probable explicación a esta divergencia de resultados, puede ser que los biotipos son endémicos de áreas particularmente geográficas, como lo señalan algunos autores (39).

De los nueve antimicrobianos que se probaron, cloranfenicol, Ceftriaxon, Cefuroxime y Miacamicina, fueron los más eficientes, ya que todas las especies fueron sensibles a estos antimicrobianos.

Existen estudios que han probado algunos de estos

antimicrobianos y han obtenido resultados similares (37), Sin embargo, existen otros reportes que mencionan especies resistentes a Cloranfenicol (25). En nuestro país, de los dos últimos reportes que se han publicado, se encontró en uno de ellos (20) que no había especies resistentes a cloranfenicol, mientras que en el otro reporte se encontraron especies resistentes tanto a Cloranfenicol y a Cefuroxima (2).

Para Amoxicilina se encontraron seis especies resistentes, 2 para Amoxicilina Clavunato y una para Eritromicina; en nuestro país, no existen reportes similares sobre estos antimicrobianos.

Para Penicilina y Ampicilina se obtuvieron resultados similares sobre resistencia a estos antimicrobianos.

Las especies que se obtuvieron con más alto porcentaje de resistencia a Ampicilina principalmente, fueron especies No Tipificables con biotipo I (14.4%), en estos resultados, no existe gran variación en lo que se reporta en la literatura (2,40), en donde se han encontrado a las especies No Tipificables como las más resistentes a este

antimicrobiano. Sin embargo, otros estudios, mencionan que especies con serotipo b, biotipo 1, son las especies de *H. influenzae*, que mas frecuentemente son encontradas como resistentes a este antimicrobiano (1,18,20,23,25).

Estos resultados muestran que las infecciones invasivas por *H. influenzae*, ocurren más comúnmente, con biotipos 1, serotipo b. En adultos se han encontrado resultados similares (19,40). Se menciona una proporción similar de resistencia a Ampicilina, entre especies de *H. influenzae* tipo b aislados de nasofaringe y de casos de enfermedades sistemicas y entre las especies No Tipificables aislados de nasofaringe y de casos de otitis media (32).

Una probable explicación a estas diferencias, es que probablemente, las especies resistentes a Ampicilina principalmente, muestren una variación geográfica (41).

De manera general, los casos de neumonía, bacteriemia y meningitis, son asociadas a especies tipificables, y en menor proporción por especies No Tipificables (40).

De las especies resistentes a Ampicilina sólo cinco (27.8%) fueron productoras de β -Lactamasa resultados que coinciden con lo reportado en nuestro país, en donde se menciona que las especies productoras de β -Lactamasa resistentes a Ampicilina varían del 20 al 30 % (2, 20). Aunque, en la literatura internacional , se reporta que el 95% de las especies resistentes a Ampicilina, se debe a la producción de β -Lactamasa (29). Consideramos, que el bajo porcentaje obtenido en este sentido, se debe a la baja sensibilidad del método utilizado ; otro factor que pudo haber afectado estos resultados, es que la determinación de este mecanismo de resistencia , se realiza en la última etapa del experimento, esto es, después de que se conservaron las especies aisladas a -70° C durante un periodo de 4 meses en promedio. Sin embargo, no descartamos que algunas de estas especies resistentes puedan tener algún otro mecanismo de resistencia, como puede ser la que se desarrolla como resultado de la mutación espontánea en un locus que controla la susceptibilidad a este antimicrobiano. Este tipo de mutaciones, también pueden conducir a la pérdida de PBP (proteína fijadora de penicilina; receptor), haciendo

a estos mutantes resistentes a este tipo de fármacos. Existen también otra clase de elementos genéticos extracromosómicos llamados plásmidos que pueden portar genes para la resistencia a uno y a menudo a varios medicamentos (3,22,30).

Los resultados obtenidos sobre la variación de los Serotipos , Biotipos y el número de aislamientos de *H. influenzae* en las tres épocas estacionales en las que se llevó a cabo el presente trabajo, son similares, principalmente en Otoño e Invierno, ya que las especies No Tipificables con biotipo 1 , son las que están más representadas en estas estaciones , estos resultados no se pueden extrapolar a la estación de Verano , ya que se obtuvieron pocas muestras en esta estación, por lo que consideramos que no son representativas de esta época .

En donde sí se encontraron diferencias significativas, es en el número de especies resistentes a Ampicilina principalmente , ya que en invierno se encontró el mayor porcentaje de especies resistentes (61.1%) y tres de las cinco especies productoras de β -Lactamasas. Es

probable que el porcentaje encontrado de especies resistentes se deba al alto porcentaje de enfermedades respiratorias prevalentes en invierno.

Con base en los resultados consideramos que el estudio de cepas en portadores es de adecuada utilidad, ya que permite conocer patrones de sensibilidad, biotipos, serotipos, semejantes a los que se identifican en cepas invasivas.

CONCLUSIONES.

1. El porcentaje de resistencia a Ampicilina en muestras de nasofaringe en niños portadores sanos si ha aumentado a partir del último reporte publicado bajo condiciones similares.

Los antimicrobianos más eficientes que se obtuvieron en el presente trabajo son : Cloranfenicol , Ceftriaxon , Cefuroxime y Mlocamicina , por lo que se pueden considerar principalmente al Clorantenicol , como un antibiótico de primera elección en enfermedades graves ocasionados por *Haemophilus influenzae*.

2. El porcentaje de aislamientos , Serotipos y Biotipos de *H. influenzae* , en las épocas estacionales de Otoño e Invierno fueron similares , no siéndolo así las especies resistentes que se encontraron, ya que el porcentaje mayor se obtuvo en invierno , por lo que consideramos que los factores que influyen en la incidencia de estas

especies son las bajas temperaturas que se presentan en esta época del año.

3. Existe una probable relación entre las cepas N.T., biotipo 1 y la resistencia a los antimicrobianos probados.

4. Por los resultados obtenidos en el número de especies que fueron positivas para la producción de β -Lactamasa, consideramos que no existe alguna relación predominante entre las especies β -Lactamasas positivas y sus biotipos.

5. Los cambios que ha sufrido el *Haemophilus influenzae* tanto en la susceptibilidad como en sus mecanismos de resistencia hace necesario que se realice un constante seguimiento sobre la sensibilidad y resistencia de este patógeno. Por lo que proponemos que se realice un seguimiento a lo largo de las cuatro épocas estacionales del año durante tres años como lapso mínimo.

LITERATURA CITADA.

1. Albritton WL., Penner S., Slaney L., Brunton J. : Biochemical Characteristics of *Haemophilus influenzae* in relationship to source of isolation and antibiotic resistance. J Clin Microbiol. 1978, 7: 519-523.
2. Arredondo JL., Espinoza EL., Zepeda H. Infecciones por *Haemophilus influenzae*, Problema actual en Pediatría. Bol. ed. Hosp. Infant. Méx. 1987, 44: 77-85.
3. Bell MS., Plowman D., Mechanisms of Ampicillin Resistance in *Haemophilus influenzae* from Respiratory Tract. Lancet 1980, 9 : 279-280.
4. Berman S. Epidemiology of Acute Respiratory Infections in Children of Developing Countries. R.I.D. 1991 ; 13 (suplement G), S454-S461.

5. Brabender W., Hoges RG., Barbenes GW., Clinical Significance of Serotype, Biotype, and β -Lactamase Production of Respiratory Isolates of *Haemophilus influenzae*. Am J Clin Pathol. 1984, 29: 157-163.

6. Bradshaw JL. Microbiología de Laboratorio. Ed. El Manual Moderno, S.A de C.V. Mex. 1973, 1-20, 75-85, 102-109

7. Branson, Dorothy. Métodos en Bacteriología Clínica. Manual de Test y Procedimientos. Ed. Medica Panamericana, Arg. 1974. 17-71.

8. Brayan HA., Bryan HC., Bryan GC. Bacteriología, Principios y Prácticas. Ed. CECSA. Sexta Edición. Méx. 1971, 332-335, 283-287.

9. Cepella BA. Nociones Elementales de Microbiología Medica. Ed. Francisco Mendez, Méx. 1984, 138-142, 185-189.

10. Collard P. El Desarrollo de la Microbiología. Ed. Reverté, Esp. 1985. 1-12.

11. Colee JG., Path FR. Microbiología Médica Aplicada. Ed. H. Blume Ediciones. Méx. 1978, 2-27.

12. Collins CH., Métodos Microbiológicos. Ed. Acribia. España. 1969. 235-237; 264-273; 366-377.

13. Donn L. William. Meteorología. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, España. 1978, 48-75.

14. Faddin Mac JF. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Medica Panamericana S.A. de C.V. Primera Reimpresión, 1990. 148-150; 267-284.

15. Fey H. Compendio de Bacteriología General Médica. Ed. Acribia, España. 1978. 85-108.

16. Funkhouser A., Steinhoff CH., Ward J. *Haemophilus influenzae* Diseases and Immunization in Developing Countries. Rev Infec Dis. 1991, 13; S542-S554.

17. Frobisher M. Microbiología. 13a Edición. Ed. Interamericana, Méx. 1976; 131-132.

18. Goldberg R., Washington JA II : The Taxonomy and Antimicrobial Susceptibility of the *Haemophilus* species in Clinical specimens. Am J Clin Pathol 1978; 70: 899-904.

19. Granoto PA., Jurek EA., Weiner LB. Biotypes of the *Haemophilus influenzae* : Relationship to Clinical Source of Isolation, Serotype and Antibiotic Susceptibility. Am. J Clin Pathol 1983; 79 : 73-77.

20. Guiscafré H., García-Melgar M., Jaime CM., et al. Frecuencia de *Haemophilus influenzae* Resistente a Ampicilina y de *Streptococcus pneumoniae* Resistente a Penicilina en Portadores Sanos. Arch. Invest. Med. (Mex). 1981, 12 : 141-150.

21. Guiscafré H. Marrufo CE., Trejo PJ. Meningitis por *Haemophilus influenzae* y Neumococo. Bol. Med. Hosp. Infec. Mex. 1984, 41 : 262-267.

22. Jawatz E. Microbiología Médica. Ed. Manual Moderno S.A. de C.V. Méx. 13a Edición. 1989, 142-173 ;194-203.

23. Kamme C. Biotypes of Capsulated and non-capsulated *Haemophilus influenzae* : Correlation between biotypes and β -Lactamase Production. Acta Pathol. Microbiol.Scand. (B) 1980; 88: 261-264.

24. Koneman EW. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana. 3a Reimpresión. Méx. 1991, 13-151; 257-268; 310-311; 380-402.

25. Lerman SJ., Kucera JC. Nasopharyngeal Carriage of Antibiotic-Resistent *Haemophilus influenzae* in Healthy Children. Pediatrics, 1979; 64: 287-291.

26. Lennette., Balows., Manual de Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana. 4a Edición, Arg. 1987. 203-228; 486-494; 1283-1302.

27. Long SS., Teter MJ., Guilligan PH. Biotype of *Haemophilus influenzae* : Correlation with virulence and Ampicillin Resistance. J Infect Dis. 1983; 147: 800-806.

28. Madigan MT. Brock TD. Microbiologia. Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana. Méx. 4a Edición, 1984; 285-288; 560-565; 674-676.

29. Medeiros A., O'Brien F. Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae* Type b Possessing a TEM-Type β -Lactamase by little permeability barrier to Ampicillin. Lancet 1975; 1: 716-719.

30. Mendelman PH., Chaffin OD., Stull LT., et al. Characterization of Non- β -Lactamase Mediated Ampicillin Resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother. 1984; 26 : 235-244.

31. National Committee for Clinical Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Growth Aerobically M7-T2, Villanova, PA. 1990; 1-31.

32. Schiffer MS., Scheerson R. Clinical, Bacteriology and Immunological Characterization of Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae* type b. Lancet 1974; 2: 257-258.

33. Seeley HW., Demark VP. Microbios en Acción. Manual de Laboratorio para Microbiología. Ed. Blume, Esp., 1971; 30-34;97-103.

34. Sosa Iglesias EG., Giono CS., Escobar GA. Manual de Procedimientos para el Aislamiento e Identificación de *Haemophilus*. Inst. Nac. Diag. Refer. Epidem. Méx. 1992; 1-57.

35. Syndey MF., William JM. Diagnostico Microbiológico. 6a Edición. Ed. Médica Panamericana, Arg. 1982; 28-33; 172-175; 286-289; 513-532; 587-619.

36. Taylor LM. Sinopsis de Microbiología Médica. Aspectos Clínicos Teraupeuticos. Ed. Trillas - UAM-X. Méx. 1990; 45-65.

37. Thirumoorthi MC., Kobos MP. and Dajani AS. Susceptibility of *Haemophilus influenzae* to Chloramphenicol and Eight Beta-Lactam Antibiotics. Antimicrob Agents and Chemotherapy. 1981; 20: 208-213.

38. Terrence S., Azemun P., Roberts M. Rapid Detection of Chloramphenicol Resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemotherapy. 1981; 20: 68-70.

39. Thornsberry C., Gavan TL. and Gerlach EH. In Sherris JC. Editor; New Developments in Antimicrobial Agent Susceptibility Testing. Cumitech 6. Washington DC., 1977; American Society for Microbiology.

40. Tsai WC., Wu JJ. Serotypes and Biotypes and Antibiotic Susceptibility of *Haemophilus influenzae* Encountered in a Clinical Laboratory in Taiwan. Clin J Microbiol. 1979; 12: 140-148.

41. Wallace RJ., Baker CJ., Quinones FJ., et al.
Non-Typable *Haemophilus influenzae* (Biotype 4) as a
Neonatal Maternal and Genital Pathogen. Rev Infect Dis.
1983; 5: 123-136.

42. Williams JD., Kattan S., Cavanagh P. Penicillinase
Production by *Haemophilus influenzae*. Lancet 1974; 2:
103-105.

ESTA TERCIA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA