



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

Determinar la presencia de *Haemophilus influenzae* biotipo I serotipo b, de exudados faríngeos provenientes de una población de adultos e infantes que asisten a consulta a unidades del IMSS e I.S.E.M.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A N :

GERARDO ALONSO PEREGRINA  
CESAR FLORENCIO MARTÍNEZ

ASESOR: QFI. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



LIBERTAD NACIONAL  
JUSTITIA  
SISTEMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen Garcia Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Determinar la presencia de Haemophilus influenzae biotipo  
I serotipo b, de exudados faringeos provenientes de una  
población de adultos e infantes que asisten a consulta a  
unidades del I.M..S.S. e I.S.E.M."

que presenta el pasante : Gerardo Alonso Peregrina

con número de cuenta: 9056951-1 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 3 de febrero de 2000

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL QFI. Andrea Angela Becerri! Osnava *Andrea A. Becerri!*

SECRETARIO QFB. Idalia Avila Miyazawa *Idalia Avila Miyazawa*

PRIMER SUPLENTE QFB. Judith Martínez Zamitiz *Judith Martínez Zamitiz*

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Guadalupe Avilés Robles *Guadalupe Avilés Robles*



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
 REPUBLICA NACIONAL  
 LEY FUNDAMENTAL DE  
 MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Determinar la presencia de Haemophilus influenzae  
biotipo I serotipo b, de exudados faringeos prove-  
nientes de una población de adultos e infantes que  
asisten a consulta a unidades del I.M..S.S. e I.S.E.M."  
 que presenta el pasante: César Florencio Martínez  
 con número de cuenta: 9056950-4 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 3 de febrero de 2000

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL QFI. Andrea Angela Becerril Osnaya

SECRETARIO QFB. Idalia Avila Miyazawa

PRIMER SUPLENTE QFB. Judith Martínez Zamitiz

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Guadalupe Avilés Robles

## A MIS PADRES

*MONICA Y SUFIMIO*

*Mamá, Papa: el final de un camino se acerca y comienzan otros, la realización de un sueño hoy llega a su termino, gracias por decidir ser mis padres, porque hoy soy lo que soy gracias a ustedes, pero sobre todo por darme la existencia y con esto espero compensarles un poco todos sus desvelos y preocupaciones.*

## A MIS HERMANOS

*Rosalba, Lipe, Floracio, Hilda, Karina, Aarón, Oscar Rene, Chevis: Gracias por su ayuda y apoyo en el transcurso de mi carrera en los buenos y malos momento, pero en especial gracias por ser mis Hermanos.*

## A MIS AMIGOS

*Gerardo, Charly, Arturote, Arturito, Toño David, José (Chino) y la Sra. Lucha Por haber compartido etapas de mi vida que han contribuido a mi formación y sobre todo por seguir caminando juntos aún en la distancia, Gracias.*

*Gracias a mis otros amigos Leonardo, Benito y Manuel por permitirme crecer juntos, porque la amistad es lo único que nos une en la distancia y el tiempo.*

*A mis amigas Raquel, Lupita y Susana por su apoyo y consejos*

*A todos ellos gracias por creer en mi*

## A MIS PADRES

*FELICIDAD ANTONIO Y MARÍA EUGENIA DEBARRERA*

*Por que con su ejemplo, consejos y entereza he  
llegado el día de hoy a las metas fijadas y soy lo que  
soy, gracias a ustedes.*

*Gracias por compartir y hacer posible éste momento  
tan importante para mí.*

*Pero sobre todo, por permitirme ser su hijo.*

## A MI ABUELITA TINA

*Por sus consejos, ayuda y comprensión,  
para que yo llegara a realizar una de mis  
más grandes metas, la cual constituye la  
herencia más valiosa que pudiera haber  
recibido.*

*Gracias por enseñarme a luchar por las  
cosas que realmente valen en la vida, pero  
sobre todo gracias por existir.*

## A MIS HERMANOS

*Beatriz, Miguel y Daniel. Por su  
ayuda y apoyo en el transcurso de mi  
carrera, así como por compartir una  
vida de hermanos que realmente atesoro.*

## A PATY

*La realización de un sueño esta a punto de culminar, por su amor y apoyo incondicional, gracias de todo corazón, ya que siempre estuvo a mi lado para alcanzar ese sueño. Y lo más importante, gracias por permitirme caminar por la vida con la persona más valiente y amorosa que jamás haya conocido.*

## A LA FAMILIA SOSA CRUZ

*Por que proyectaron en mi el espíritu de lucha para seguir adelante y no dejarme vencer ante los obstáculos que se me pudieron haber presentado.*

## A MIS AMIGOS

*Cesar, David, Charly, Arturo, Carolina, Jaime, Martha, Luz María, y todas aquellas personas que formaron parte de mi vida académica. Por haber compartido etapas de mi vida que han contribuido a mi formación y sobre todo por seguir caminando juntos aún en la distancia, Gracias.*

**A LA PROFESORA QFI ANDREA A. BECERRIL OSNAYA**

*Sabiduría es aprender  
A caminar en el tiempo  
Y a vivir en la eternidad.*

*Gracias por su apoyo, paciencia, asesoría y dirección en la  
realización del presente proyecto. Pero sobre todo gracias por  
compartir sus conocimientos, su tiempo y amistad con  
nosotros.*

**AL ING. JUAN GARIBAY B.**

*El hombre que hace que las cosas difíciles  
parezcan fáciles, es el maestro.*

*Por sus sugerencias, apoyo y dirección en el  
análisis estadístico de los datos experimentales.*

**Agradecemos profundamente la ayuda proporcionada por las siguientes personas:**

*M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez por su valiosa ayuda y consejos en el desarrollo del presente proyecto.*

*A la Química Yolanda Rivera por su asesoría, facilidades y material proporcionado en el transcurso del proyecto.*

*DR. Jorge Galván por las facilidades prestadas para la realización de la parte experimental.*

*A las Químicas Carmen Orozco y Rebeca Estrada por las facilidades otorgadas durante el transcurso del proyecto.*

*L.F.B. Guadalupe Avilés, por sus consejos brindados en el transcurso de la parte experimental.*

*A los profesores de Inmunología Víctor, Ladislao y Carlos por sus sugerencias y apoyo para la realización de este trabajo.*

*A todos ellos, nuestra gratitud y admiración por el interés mostrado, por sus valiosos consejos y por habernos dedicado parte de su tiempo.*

# INDICE

Lista de abreviaturas

Lista de cuadros

Lista de figuras

Lista de esquemas

Lista de tablas

HOJA

Resumen.....	1
I Introducción.....	2
II Generalidades.....	3
Historia.....	3
Clasificación taxonómica.....	4
Morfología.....	5
Aislamiento.....	7
Características nutricionales.....	7
Identificación bioquímica.....	9
Examen directo.....	10
Cultivo.....	10
Requerimientos de factores X y V.....	11
Catalasa.....	12
Oxidasa.....	12
Indol.....	13
Urea.....	13
MIO.....	14
Serología.....	15
Prueba de porfirina.....	17
Reacción de Quellung.....	17
Patogenia.....	17
Epidemiología.....	20
Tratamiento.....	21
Terapia intensiva.....	21

III	Objetivos.....	24
IV	Material y Métodos.....	25
	Biológicos.....	25
	Exudados faringeos Período y lugar de obtención.....	29
	Cristalería.....	26
	Medios de cultivo.....	26
	Reactivos analíticos.....	27
	Agar Chocolate modificado (ACh*).....	29
	Agar BHI.....	45
	Agar Sangre.....	47
	Oxidasa.....	32
	Catalasa.....	34
	Indol.....	36
	Urea.....	39
	MIO.....	41
	Serotipificación de <i>Hi</i> .....	43
V	Esquema de Trabajo de las muestras.....	28
VI	Análisis estadístico.....	49
VII	Resultados.....	53
VIII	Discusión.....	63
IX	Conclusiones.....	66
X	BIBLIOGRAFIA.....	70
	Anexo.....	68

## ABREVIATURAS

<b>Hi</b>	<b><i>Haemophilus influenzae</i></b>
<b>Hi b I</b>	<b><i>Haemophilus influenzae</i></b> biotipo I
<b>Hib</b>	<b><i>Haemophilus influenzae</i></b> biotipo I serotipo b
m.o.	microorganismo
OMS	Organización Mundial de la Salud
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
ACH	Agar Chocolate
ACH*	Agar Chocolate modificado
BHI	Agar Infusión Cerebro - Corazón
AS	Agar Sangre
Hia	<b><i>Haemophilus influenzae</i></b> serotipo a
CIE	Contrainmunolectroforesis
RIA	Radioinmunoensayo
NT	No tipificable
GC	Agar gonococo
g.l.	grados de libertad
r	renglones
c	columnas
e	valor esperado
o	valor observado
$X^2$	Ji-cuadrada de contingencia
$X^2_c$	Ji-cuadrada calculada
$X^2_t$	Ji-cuadrada de tablas
n	numero de muestras
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISEM	Instituto de Salubridad del Estado de México
PRP	Polirribosa ribitol fosfato
MIO	Ornitinadescarboxilasa
X	Haemina
V	Dinucleótido de nicotinamida y adenina

## LISTA DE CUADROS

PAGINA

CUADRO 1	Requerimiento de factores X y V de especies de <i>Haemophilus</i> .....	7
CUADRO 2	Propiedades diferenciales de especies de <i>Haemophilus</i> .....	13
CUADRO 3	Diferenciación de biotipo de <i>Haemophilus influenzae</i> .....	15
CUADRO 4	Enfermedades infecciosas asociadas con <i>Haemophilus influenzae</i> .....	19
CUADRO 5	Tipos de vacunas conjugadas.....	22

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Fenómeno de satelitismo.....	6
FIGURA 2	Tinción de GRAM para <i>Haemophilus influenzae</i> .....	10
FIGURA 3	Inhibición de Stafilococos y Estreptococos al utilizar el medio de agar Chocolate modificado con discos de bacitracina de 10 U.....	31
FIGURA 4	Crecimiento de <i>Haemophilus influenzae</i> en el medio de cultivo diseñado..	32
FIGURA 5	Prueba de Oxidasa.....	34
FIGURA 6	Prueba de Catalasa.....	36
FIGURA 7	Prueba de Indol.....	38
FIGURA 8	Prueba de urea.....	41
FIGURA 9	Prueba de MIO.....	43
FIGURA 10	Prueba de aglutinación con partículas de látex para el serotipo capsular b..	45

FIGURA 11 Dependencia de factores X y V en agar BHI.....	46
FIGURA 12 Dependencia de factores X y V en agar sangre.....	48

## LISTA DE ESQUEMAS

	PAGINA
ESQUEMA 1 Requerimiento de factores X y V de <i>Haemophilus influenzae</i> .....	11
ESQUEMA 2 Esquema de trabajo de las muestras de exudados faringeos.....	28

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1 Presencia de <i>Hi</i> en la muestra.....	54
TABLA 2 Presencia de <i>Hi</i> bI en la muestra.....	57
TABLA 3 Presencia de <i>Hib</i> en la muestra.....	59
TABLA 1a Valores observados y esperados de <i>Hi</i> .....	55
TABLA 2a Valores observados y esperados de <i>Hi</i> bI.....	58
TABLA 3a Valores observados y esperados de <i>Hib</i> .....	60
TABLA 1b Porcentaje de <i>Hi</i> en la muestra.....	61
TABLA 2b Porcentaje <i>Hi</i> bI en la muestra.....	61
TABLA 3b Porcentaje <i>Hib</i> en la muestra.....	62

## **TITULO**

“Determinar la presencia de *Haemophilus influenzae* biotipo I serotipo b, de exudados faríngeos provenientes de una población de adultos e infantes que asisten a consulta a unidades del IMSS e I.S.E.M.”

## **HIPOTESIS**

Dado que *Haemophilus influenzae* es la causa más común de meningitis bacteriana en infantes debido a portadores adultos, es por lo que en este estudio pretendemos establecer la presencia de *Haemophilus influenzae* biotipo 1 serotipo b, en tracto faríngeo de una población abierta de adultos e infantes que acuden a consulta en unidades del IMSS e I.S.E.M.

## RESUMEN

Se determino la presencia de Haemophilus Influenzae biotipo I serotipo b, en muestras de exudados faringeos provenientes de una población abierta que asiste a consulta en unidades del I.M.S.S. e I.S.E.M. dentro del área urbana y conurbada de Cuautitlán de Romero Rubio en el Estado de México.

Se prepararon medios de cultivo para el aislamiento de Haemophilus Influenzae serotipo b(Hib) con base de agar GC (para aislamiento de Gonococos) suplementado con medio para antibióticos N. 1 (Bioxón) en una proporción de 1:1; además este medio se sometió a una temperatura de 80 grados centígrados por espacio de 10-15 minutos y se le incorporo sangre de carnero desfibrinada al 5 % para enriquecer y achocolatar las placas de agar. El medio de agar chocolate recién preparado fue validado con cepas de referencia ATCC, además se hicieron pruebas de inhibición bacteriana con discos de bacitracina de 10U.; Parte fundamental de este proceso fue la utilización de una mezcla a concentraciones definidas de Streptococos, Staphylococos y Haemophilus para simular in vitro la posible flora bacteriana presente en la orofaringe, esta solución se trabajo como una muestra de exudado faringeo; Pero con una variante que fue la incorporación de discos de Bacitracina de 10 u., esto aseguro un crecimiento significativo de Hi en el medio, con una inhibición considerable de las cepas bacterianas no deseadas alrededor del disco.

Se estudiaron 270 muestras provenientes de pacientes que asistieron a consulta en las clínicas 62 y 57 del I.M.S.S. y del hospital General José Villada del I.S.E.M. Del total de la población analizada el 24.43 % (66 casos; 23 niños y 43 adultos) presento cultivo positivo a la presencia de Haemophilus Influenzae; De estos aislamientos se biotipificaron las muestras mediante pruebas bioquímicas (Gram, Oxidasa, Catalasa, Indol, Urea, MIO y dependencia de factores "X" y "V") detectandose 17 casos de portadores de Haemophilus Influenzae biotipo I (12 en adultos y 5 en infantes).

Los cultivos de Haemophilus Influenzae tipificados como Biotipo I fueron serotipificados con la ayuda de antisuero monoclonal para determinar la presencia de polisacarido capsular tipo b.

## INTRODUCCION

En nuestro país las infecciones del tracto orofaríngeo son de gran importancia debido a que tienen un elevado grado de morbiletalidad. *Haemophilus influenzae (Hi)*; así como otros microorganismos son responsables de causar diversos tipos de padecimiento en el tracto respiratorio superior e inferior en la población infantil y adulta (15,47,51), ocupando el primero y/o segundo lugar por frecuencia en infecciones tales como: meningitis, otitis media, conjuntivitis, epiglotitis, entre otras... (7,8,16,24,37,63). De acuerdo con cifras de la O.M.S., en el mundo mueren alrededor de dos millones de niños y un 30% son debidas a infecciones de vías respiratorias, el conocimiento de este problema es sumamente importante ya que las infecciones respiratorias, junto con la diarrea, son líderes de las enfermedades infecciosas en países en desarrollo y tercermundistas...(3,7,9,26,28,32,45,54,57,59). En la actualidad el reconocimiento del *Hi* como un agente etiológico de un importante número de infecciones de vías respiratorias esta provocando un mayor interés en este microorganismo, debido a ser considerado de la flora autóctona del tracto respiratorio superior, reportándose cifras de portadores del 8 al 60%, dependiendo de la población estudiada... (6,11,15,16,17,47).

Durante algún tiempo *Hi* fue una bacteria poco reconocida en nuestro país, no era recuperada de muestras clínicas y estaba considerada como un agente caprichoso, es decir, de difícil crecimiento en medios convencionales... (3,20,47,60). Por ello en la presente investigación realizamos un estudio para saber que tan frecuentemente se encuentra el *Haemophilus influenzae* biotipo I serotipo b (*Hib*) en una muestra poblacional de adultos e infantes que asisten a consulta a unidades del IMSS e I.S.E.M. , además de utilizar un medio de cultivo alternativo a los convencionales (agar chocolate modificado : *Ach\** diseñado para esta investigación y que será descrito posteriormente), para el aislamiento de este microorganismo.

# GENERALIDADES

## HISTORIA

Esta especie patógena fue aislada por primera vez por Pfeiffer durante la pandemia de gripe entre 1890 y 1892 de personas que sufrían de influenza, creyendo erróneamente que era la causa de la enfermedad la denominaron “Bacilo de la influenza” llamado más tarde *Haemophilus influenzae (Hi)*, pero solo hasta principios de 1930 fué considerado como el agente etiológico de la influenza epidémica, ya que para 1933 se aisló el virus de la influenza, el cual es el causante de la gripe epidémica, por consiguiente aún no se sabe el papel exacto desempeñado por el *Hi* en la pandemia de 1890 y 1918... (16). No puede negarse que en la mayor parte de los casos es considerado como un invasor secundario importante, puesto que se encontró un microorganismo predominante e incluso como una especie bacteriana en cultivos de los pulmones de cadáveres necropsados, pero no esta claro si actuaba de modo sinérgico con el virus para causar aquellas lesiones, este tipo de interacción sinérgica fue demostrada por Shope en 1931 para el virus de la gripe en cerdos y el *Haemophilus suis*, especie bacteriana estrechamente relacionada con *Hi*.

La meningitis bacteriana producida por *Hi* fue descrita por Slawky en 1899 y constituye la forma más frecuente de meningitis bacteriana en los niños. Pittman descubrió que las cepas de *Hi* que causan meningitis y otras infecciones agudas difieren de las cepas halladas en las vías aéreas de individuos sanos, tal diferencia estiba en que poseen cápsula, lo que proporciona una base para la comprensión actual de la enfermedad por *Hi*. Entre las enfermedades asociadas con la cápsula se encuentran las invasivas como la meningitis, pioartrosis, celulitis, neumonía, epiglotitis aguda, entre otras; sin embargo el *Hi* no capsulado son asociados a enfermedades respiratorias crónicas en adultos, causando infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos.

*Hi* puede ser aislado a partir del aparato respiratorio de niños afectados por una bronquitis obstructiva y de niños que sufren una otitis media (hasta un 25%), sin embargo se conoce muy poco su función etiológica en estos procesos...(5,10,12,34,36,44,64,65).

## **CLASIFICACION TAXONOMICA**

**FAMILIA:** Pasteurellaceae

**GENERO:** Haemophilus

**ESPECIE:** influenzae

**BIOTIPO:** I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII

**SEROTIPO:** a, b, c, d, e, f ... (35)

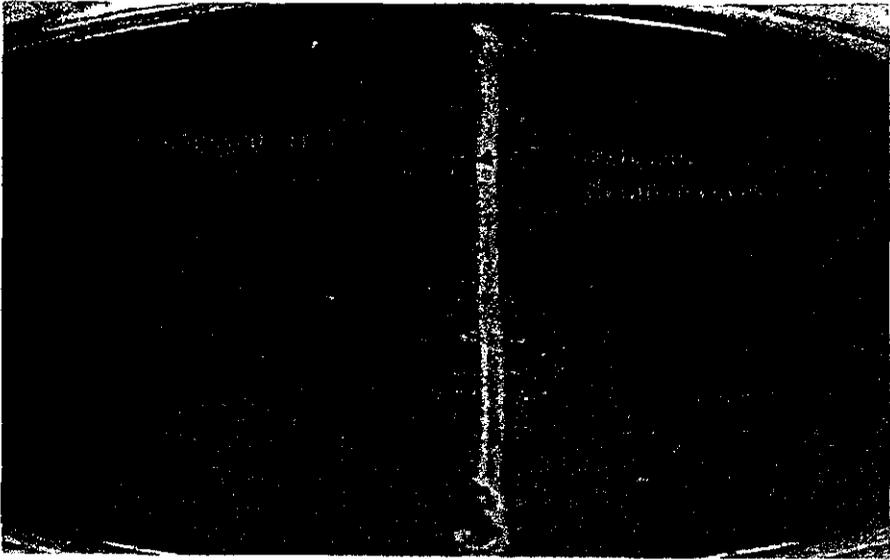
## MORFOLOGIA

El bacilo de Pfeiffer es una de las bacterias patógenas más pequeñas, rara vez mayor de 1.5  $\mu\text{m}$  por 0.3  $\mu\text{m}$  en el medio de cultivo, observadas en especímenes con infecciones agudas. Los extremos de estos microorganismos son redondeados, al microscopio no suelen observarse cápsulas (pero están presentes en las colonias lisas), no forman esporas y el bacilo es inmóvil. Tiene gran tendencia a adaptar unas formas filamentosas y otras anomalías en los cultivos que hasta cierto punto son característicos de la cepa.

La característica morfológica de *Hi*, al igual que todos los miembros del género, es su pleomorfismo, en el líquido cefaloraquídeo (LCR), líquido articular o cultivos primarios, los m.o. generalmente adquieren la forma de un pequeño cocobacilo gramnegativo a gramvariable, a menudo crece formando cadenas cortas, semejando a los *streptococos* y *neumococos*, también se encuentran bacilos largos, grandes cuerpos esféricos al igual que largos filamentos semejantes a grandes bacilos.

En los cultivos la morfología depende tanto de la edad así como de la composición del medio, de tal manera que en medios enriquecidos las formas cocobacilares predominan a las 6-8 horas de incubación, después de este periodo se encuentran bacilos más largos, bacterias lisadas y formas pleomórficas. Con agar sangre de conejo, se observan colonias muy pequeñas, redondeadas, discretas y transparentes, pueden llegar a tener el tamaño de una cabeza de alfiler. En medio de Levinthal, que contiene extracto de levadura, las colonias son algo más voluminosas, opacas y aplanadas, si se observan con luz oblicua se ven iridiscentes.

Cuando el agar sangre esta contaminado con otros microorganismos (*staphylococos*), las colonias son mucho mayores, más opacas y de un color blanco grisáceo conservadas junto a este agente contaminante, fenómeno denominado satelitismo figura 1



**FIGURA 1** Fenómeno de satelitismo de *Hi* en agar sangre con estria de *staphylococos*

Los organismos virulentos de un cultivo joven (6-18 horas), en medio enriquecido tienen una cápsula bien definida, al envejecer el cultivo, el organismo experimenta profundos cambios en su morfología, en las cepas capsulares, después de 24 horas de incubación comienza a desaparecer su cápsula e iridiscencia, los signos de autólisis, entre los que se incluyen la coloración irregular y la acumulación de restos amorfos resultan evidente a las 12 horas, la autólisis y la destrucción capsular son consecuencia de la acción de enzimas autolíticas... (4,5,12,65).

## AISLAMIENTO

### Características nutricionales.

El género *Haemophilus* deriva de una palabra griega que significa “Amante de la sangre”, de ahí que estos m.o. requieran de dos factores de crecimiento que están presentes en la sangre, identificados por Lwoff en 1937, y que los medios de cultivo convencionales no los tienen para poder desarrollarse, la presencia de Haemina (Protoporfirina o factor X) y de un Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD o NADP o factor V) son factores indispensables para lograr el crecimiento de este m.o., además de que estas características permiten una diferenciación entre las especies de *Haemophilus*. (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Requerimiento de factores de X y V de diversas especies de *Haemophilus*... (36,38,65)

Especies de <i>Haemophilus</i>	Requerimiento de factores	
	X	V
<i>H.aegyptius</i>	+	+
<i>H.influenzae</i>	+	+
<i>H.haemolyticus</i>	+	+
<i>H.ducreyi</i>	+	-
<i>H. aphrophilus</i> *	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+
<i>H. parahemolyticus</i>	-	+
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+
<i>H. segnis</i>	+	+

\*: Requiere mayor tensión de CO<sub>2</sub>

+: 90% ó más de cepas positivas

-: 10% ó menos de cepas positivas.

El factor X es termoestable y puede sustituirse por hemoglobina o hematina, las protoporfirinas férricas u otros compuestos similares son necesarios para la síntesis de enzimas que intervienen en su respiración aerobia. Este factor probablemente no sea una sola sustancia, sino más bien un grupo de compuestos tetrapirrólicos termoestables, que son proporcionados por diversos pigmentos que contienen hierro (p.e. hemina y hematina). Los compuestos del factor x se usan en la síntesis de catalasas, peroxidasas y del sistema de transporte de citocromos.

Los m.o. que dependen del factor X exógeno para su crecimiento son incapaces de sintetizar protoporfirinas a partir del ácido delta-amino-levulinico , reacción que sirve como base en la prueba de ALA-porfirina .

El factor V termolábil puede destruirse rápidamente por enzimas derivadas de células rojas no calentadas puede sustituirse por NAD o NADP pero no por ácido nicotínico o su amida, al parecer debe proporcionarse toda la molécula completa de coenzimas y se admite que esta sustancia solo la requieren especies denominadas **para**, este factor es sintetizado por diversos m.o. en gran cantidad (p.e *Staphylococcus aureus*, *Neiserias* y algunas levaduras).

Se han diseñado un diverso número de medios de cultivo, además del agar sangre con estría de *Staphylococcus* para el cultivo de estos m.o., entre los mejores para su aislamiento primario está el de Levinthal, el cual contiene extracto de sangre y sostiene un buen crecimiento; el de Fildes, que contiene una infusión de agar enriquecido con producto de digestión péptica de sangre; así como medios que contienen antibióticos para hacerlos selectivos de tal forma que inhiban las bacterias no deseadas, p.e. agar sangre Cassmán con discos de bacitracina de 10 U, o combinaciones de estos los cuales permiten diferenciar entre cepas capsuladas y no capsuladas.

Es importante señalar que el **Hi** capsulado, generalmente el tipo b, produce colonias mucoides y brillantes que son característicamente iridiscentes en agar de Levinthal y durante las 24 horas posteriores a la incubación se desarrolla una umbilicación central debido a la

excreción del polímero capsular, es decir, pérdida de cápsula.

El agar chocolate (Ach), es el medio de cultivo generalmente utilizado para aislar especies de *Haemophilus*, en su preparación se agrega sangre fresca a una base de agar caliente (80-90°C) hasta la aparición de un color marrón, y así lograr tener un crecimiento intenso del organismo para pruebas de aglutinación y otros fines, debido a que el calor libera los factores X y V de los eritrocitos y también inactiva las enzimas que encienden el factor v sin destruirlo.

El crecimiento máximo óptimo ocurre a 35-37°C y un pH de 7.2-7.8 en condiciones aerobias, aunque el m.o. es anaerobio facultativo, sus colonias sobre el agar llegan a alcanzar un diámetro de 1-2 mm en 18-24 hrs. estas colonias son transparentes a opacas y brillantes, en algunas ocasiones asemejan a gotas de rocío.

El m.o. muestra poca resistencia a las condiciones externas, muere rápidamente por desecación y generalmente no vive más de 48 hrs., su cultivo es de difícil crecimiento en el laboratorio, aún en condiciones favorables, debido a la tendencia de autolisarse, su mantenimiento se logra con frecuentes transferencias a Ach u otros medios enriquecidos o por liofilización o almacenamiento en el congelador...(3,4,5,10,12,16,34,47,65)

## IDENTIFICACION BIOQUIMICA

La identificación exacta del agente causal es un requisito para el manejo apropiado de la enfermedad por *Hi*; de ahí que se sugieran varios pasos para llevar a cabo su correcta identificación.

### A) Examen directo

Los frotis teñidos por tinción de Gram de muestras clínicas son útiles para proporcionar una rápida identificación presuntiva sin embargo debe tenerse cierto cuidado ya que varios microorganismos, p.e. *neumococos*, pueden interpretarse erróneamente como *Hi*, debido a una mala decoloración durante la tinción...(16).fig.2

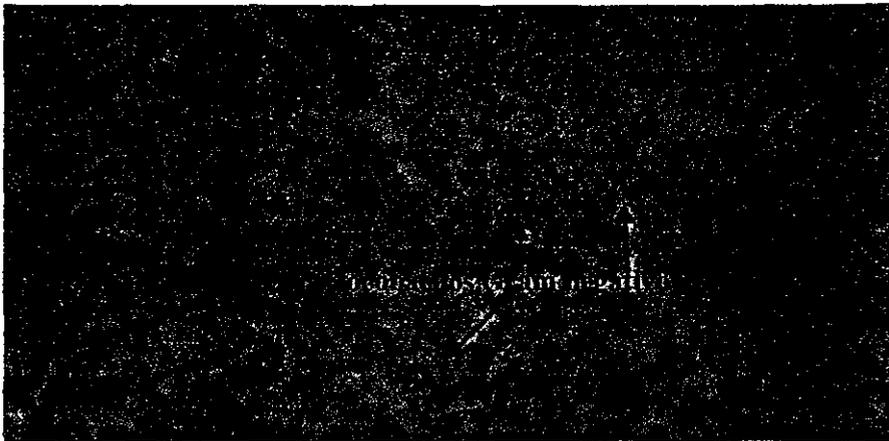


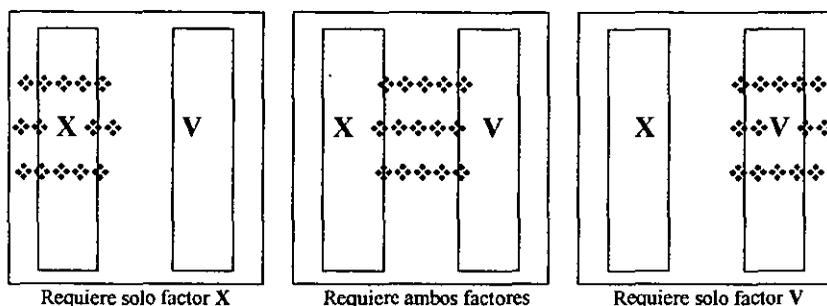
FIGURA 2 Tinción de GRAM de *Haemophilus influenzae*

### B) Cultivo

*Hi* es delicado por lo que muere de manera rápida en materiales clínicos, aun en condiciones favorables, debe de cultivarse en Ach u otros medios adecuados a 37°C/24 horas en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10%, algunos microorganismos como levaduras, *Neisserias* y *Staphylococos* son capaces de sintetizar NAD y exportarlo al medio de cultivo primario, después del periodo de incubación se pueden observar pequeñas colonias dentro del área hemolítica y adyacente a las colonias exportadores del factor (Satelitismo)...(16) fig. 1.

### C) Requerimiento de factores X y V

Las colonias sospechosas de *Hi* pueden sembrarse en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI), con discos o tiras embebidos con factores X y V, separados aproximadamente 1 cm. entre sí, ver esquema 1, se incuba a 37°C 24 horas, en atm. de CO<sub>2</sub> al 10%, al cabo de la cual se observan colonias que crecen entre ambos discos, esta prueba es útil para la diferenciación de cepas de *Haemophilus*. (Cuadro 1).



ESQUEMA 1 Requerimiento de factores para *Haemophilus*

También se puede lograr la dependencia de factores X y V utilizando la estria de *Staphylococcus*, esta técnica requiere de dos medios de agar: un medio deficiente de factores X y V (BHI) y un medio de agar sangre (AS), que contiene solo factor X, o el agar chocolate con termotratamiento de una hora a 60°C, cada uno de los medios se estria con una cepa de *staphylococcus* productora de factor V después de inocular la muestra en la superficie del agar. El desarrollo de las colonias solo en el medio de AS indica necesidad del factor X únicamente. La presencia de desarrollo solo cerca de la estria de *Staphylococcus* en agar sangre indica el requerimiento de ambos factores, y si el crecimiento se observa solo cerca de la estria de *Staphylococcus* en ambos medios, la especie solo necesita del factor V... (5,12,16,36,38,65). Esquema 1, fig 11 y 12.

## D) Bioquímica

Las cepas de *Haemophilus* se dividen en subgrupos y biotipos, dependiendo de la especie, identificandolas por medio de pruebas bioquímicas, ( catalasa, oxidasa, indol, urea y ornitín descarboxilasa ), basadas en propiedades fenotípicas del m.o..(cuadro.2 y 3).

I.- **CATALASA:** La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias anaerobias facultativas y aerobias que contienen el sistema citocromo, es una hemoproteína, en el que su grupo prostético esta formada por cuatro átomos de hierro trivalente que retiene su estado oxidado durante la actividad enzimática. La descomposición del peróxido de hidrogeno, que es el sustrato que se utiliza en esta reacción, se produce por la acción de dos enzimas: la catalasa y una peroxidasa, en esta descomposición se utilizan dos moléculas de peróxido, una actúa como sustrato y otra como dador catalizados por la catalasa dando como resultado un sustrato reducido y un dador oxidado (gas liberado)...(41) cuadro 2.

II.- **OXIDASA:** El sistema citocromooxidasa se encuentra por lo general en los organismos aerobios, lo que los hace capaces de utilizar el oxígeno como un aceptor de hidrógeno final para reducir el oxígeno molecular en peróxido de hidrogeno. La prueba de la oxidasa esta basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa su reacción se debe a que el sistema citocromooxidasa activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa final del sistema de transferencia de electrones, esta etapa es evidente por la utilización de diversos colorantes aceptores de electrones, que al inicio son incoloro , debido a la reacción de la oxidasa muestran un producto coloreado...(41) cuadro 2

**Cuadro 2.** Propiedades diferenciales de especies de *Haemophilus...*(36,38,65)

<b>Especies</b>	<b>catalasa</b>	<b>oxidasa</b>
<b>H. influenzae</b>	+	+
<b>H. aegyptius</b>	+	+
<b>H. haemolyticus</b>	+	+
<b>H. ducreyi</b>	+	+
<b>H. aphrophilus</b>	-	-
<b>H. parainfluenzae</b>	v	+
<b>H. parahemolyticus</b>	v	+
<b>H. paraphrophilus</b>	-	+
<b>H. Segnis</b>	+	+

+ = Positivo.

- = Negativo.

V = Variable.

III.- **INDOL:** El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol e indolacético, durante este proceso intervienen diversas enzimas llamadas “triptofanasas” estas enzimas catalizan la reacción de desaminación atacando a la molécula de triptófano en su porción lateral dejando intacto el anillo aromático en la forma de indol, el cual puede ser detectado por un reactivo que posea una combinación química que produzca un color definido (reactivo de Kovac's)...(41) cuadro 3.

IV.- **UREASA:** El sustrato urea es una diamida del ácido carbónico, a la que

frecuentemente se menciona como carbamida, la hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. La ureasa es una enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos...(41) cuadro 3.

**V.- ORNITINDESCARBOXILASA:** La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxílico dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico. El aminoácido L-ornitina es descarboxilado por la enzima ornitina descarboxilasa para dar la diamina putresina y anhídrido carbónico, esta diamina es estable en condiciones anaeróbicas, la bacteria es cultivada en anaerobiosis recubriendo la superficie del medio con parafina o vaselina...(41) cuadro 3.

*Hi* puede subdividirse en 8 biotipos sobre la base de tres reacciones bioquímicas...(35), producción de indol, actividad de ureasa y actividad de ornitina descarboxilasa (cuadro 3), los biotipos de *Hi* en particular han demostrado cierta relación con la fuente de aislamiento, existe una correlación entre el biotipo y el serotipo capsular de las cepas de *Hi*...(38), para fines epidemiológicos, la subtipificación sobre las bases de las proteínas de membrana externa o sus polisacáridos es una herramienta más sensible que la serotipificación...(4,28,41,49).

Las tres reacciones utilizadas para la subdivisión de los biotipos de *Hi* como pruebas rápidas, (indol, urea y MIO), tienen la ventaja de que no requiere crecimiento, los tres medios no necesitan incluir factores de crecimiento y los resultados se leen después de 12 a 24 hrs. de incubación...(35).

Cuadro 3. Diferenciación de biotipos de *Hi...*(35).

BIOTIPO	INDOL	UREASA	ORNITINA DESCARBOXILASA
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
VI	-	-	+
VII	+	-	-
VIII	-	-	-

+ el 90% de las cepas o más es positivo.

- el 10% de las cepas o menos es positivo.

### E) Serología

El uso de métodos serológicos para la identificación de cepas de *Hi* no se ha evaluado adecuadamente, por ende, la identificación serológica tiene valor únicamente para cepas capsuladas las cuales se dividen en serotipos (**a,b,c,d,e,f**) basándose esta clasificación en sus polisacáridos capsulares. Estos seis tipos de bacilos encapsulados contienen antígenos de cápsula específicos, de tal forma que los carbohidratos de los tipos **a**, **b**, y **c** son fosfopolisacáridos y el tipo **b** es un polirribosafosfato, el cual se ha purificado y se le ha encontrado que contiene ribosa, ribitol y fosfato como sus principales componentes, en lugar de hexosas y hexosaminas como los otros tipos.

De igual manera los tipos **a**, **b**, **c**, **d**, y **f** son tipos del ácido teicoico mientras que los del **d** y **e** son polisacáridos.

El establecimiento del tipo antigénico de estas cepas capsuladas puede lograrse por aglutinación, hinchazón de la cápsula, reacción de precipitina, (empleando polisacáridos extraídos), o por contraelectroforesis. Es importante señalar que la mayoría de las infecciones relacionadas con enfermedad invasiva son causadas por el tipo b...(36).

Para establecer un diagnóstico rápido de infección sistémica por *Hib*, actualmente se dispone de varias técnicas para la detección de su antígeno capsular como por ejemplo:

Contraelectroforesis (CIE).

Radioinmunoensayo (RIA).

Inmunofluorescencia.

Coagulación de proteína A.

ELISA.

Aglutinación con látex ... (4,5,10,36,38,65).

La suspensión celular para dichas técnicas debe obtenerse de un cultivo joven ( 6-18 hrs. ) ya que los cultivos viejos deterioran la cápsula.

En diversos estudios se ha evaluado la sensibilidad y especificidad relativas de la CIE, la aglutinación en látex y la coagulación para detectar el antígeno capsular de Hib en diversos líquidos corporales de pacientes con infecciones meningéas y no meningéas. Muchos estudios indican que la aglutinación con látex y la coagulación son más sensibles y detectan menor cantidad de antígeno que la CIE. En estudios clínicos la CIE detecto del 71 al 91% de las muestras en pacientes con meningitis, mientras que la aglutinación con látex y la coagulación detectaron de 82 al 100% , los métodos de aglutinación en látex resultan mejores al método de coagulación... (2,4,14,20,35,44).

## F) Prueba de la porfirina

El sustrato consiste en ácido delta amino levulínico hidrociorado y sulfato de magnesio, en 100ml de regulador de fosfato, la prueba positiva se indica por la presencia de fluorescencia a la exposición de una lámpara de UV, esto es producto de la síntesis del porfobilinógeno por parte del delta amino levulínico, sin embargo esta prueba no es útil para la identificación de *Hi* debido a la falta de la enzima porfobilinógeno sintetasa por parte de este m.o...(4,16,36,38), sin embargo ayuda a la identificación de otras especies de microorganismos..

## G) Reacción de Quellung

Este procedimiento implica disponer de suero tipo específico anti *Hi* (del tipo), el procedimiento se efectúa en laminillas donde se depositan cantidades casi iguales del antisuero y del espécimen, al observar la mezcla al microscopio, una prueba positiva hace evidente y prominente la cápsula que rodea al *Hib*... (4,16,38).

# PATOGENIA

Existe una marcada diferencia en la morfología colonial de *Hi* fase lisa y fase rugosa, la primera de ella es capsulada y de ordinario se considera como patógena, la segunda es patógena potencial sobre todo en procesos respiratorios crónicos. A semejanza de los *pneumococos* se ha comprobado mediante pruebas directas de aglutinación que *Hi* tiene una actividad antigénica heterogénea, es decir, contiene tres clases de antígenos de superficie: el polisacárido capsular, el lipopolisacárido y las proteínas de membrana externa...(13,25,34,49,52,55). La envoltura celular de *Hi* consiste en una membrana externa y una interna, que contienen antígenos proteicos y lipopolisacáridos, los anticuerpos contra este polisacárido capsular son independientes de la edad, aunque este sea el determinante crítico de

la virulencia. De las dos o tres docenas de proteínas detectadas en la membrana externa, solo un pequeño número es responsable de gran parte del contenido proteico de la superficie celular, algunas son conservadas en todas las cepas de *Haemophilus*, mientras que otras varían con el serotipo...(25).

Su patogenicidad en el hombre está bien demostrada por la ocurrencia de casos de meningitis altamente mortal que se presenta con mayor frecuencia en niños menores de dos años de edad...(37,52,54,57) aunque también se han observado casos en personas de edad avanzada...(28,57,59).

Las infecciones por *Hi* ocurren luego de la inhalación de gotitas infectadas de casos clínicamente activos, convalecientes portadores, por experiencia clínica se sugiere que los m.o. inicialmente colonizan la nasofaringe, en este sitio se transportan variantes lisas y rugosas de *Hi* estableciéndose en el árbol traqueobronquial, quizás en forma sinérgica con un virus o por parálisis de la función de aclaramiento de las cilias normales...(5,62,65). La adherencia de *Hi* es el primer fenómeno que se da en el proceso infeccioso y le permite a la bacteria colonizar la superficie mucosa del aparato respiratorio superior, establecerse y adaptarse al microambiente local de la nasofaringe humana, crecer y resistir los mecanismos de defensa del hospedero...(39,58). La interacción de la bacteria con el hospedero activa señales celulares que pueden conducir a una reacción inflamatoria o favorecer la penetración intracelular de la bacteria a los tejidos subyacentes. Se han descrito varias adhesinas en *Hi*: adhesinas fimbriales, no fimbriales y fibrillas que promueven la adherencia a diferentes receptores, condicionando el tropismo tisular...(23,62,) . Una vez adherido a la mucosa este m.o. puede diseminarse al aparato respiratorio o al torrente sanguíneo, la presencia del polisacárido capsular de tipo b permite al microorganismo resistir la acción del complemento con una mayor sobrevida y eventual multiplicación en la sangre...(62,65). Las infecciones respiratorias son fuentes importantes de una gran variedad de enfermedades metastásicas en meninges o articulares y la invasión de tejidos locales, en el cuadro 4 se muestran algunas de estas enfermedades asociados con *Hi*...(2,51).

**Cuadro 4. Enfermedades infecciosas asociadas con *Hi...* (36)**

<b>ENFERMEDAD</b>	<b>ESPECIE DE <i>Hi</i></b>	<b>MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b>
Faringitis aguda Epiglotitis Laringotraqueobronquitis	<i>Hib</i>	Mucosa enrojecida, hinchazón y exudado amarillo líquido y desigual, enfermedad que afecta a niños. rara en adultos.
Bronquitis Bronquiolitis Neumonía	<i>Hib</i>	Tos improductiva persistente, silbido, disnea, enfermedad de niños, pero puede ser causa de bronquitis crónica en adultos.
Otitis media	<i>Hib</i> 95% <i>Hia</i> y cepas NT infrecuentes	Fuerte dolor de oído, sensación de presión, dolor de cabeza y fiebre, secreción serosa de oído medio, muy común en niños y rara en adultos.
Meningitis	<i>Hib</i> Otros tipos infrecuentes	Rigidez cervical, dolor de cabeza y reflejos exagerados en niños mayores y adultos, en bebés anorexia, fontanelas y vomito.
Conjuntivitis "ojo rosado"	<i>Hi</i>	Esclerótica enrojecida, sensación de raspado, visión borrosa, lagrimeo y pesadez de párpado.
Endocarditis	<i>Hi</i>	Escalofríos fiebre, leucocitosis anemia, malestar anorexia, pérdida de peso y artralgias en grados variables de severidad.

Tomado parcialmente

## EPIDEMIOLOGIA

*Hi* es un parásito obligado de los humanos que se transmite a través de microgotas respiratorias, comúnmente individuos sintomáticos lo transportan en la nasofaringe, las tasas de los portadores son de aproximadamente 60-90% en niños pequeños y del 35% en adultos, aunque de manera global se manejan porcentajes que van del 8 al 60%...(16). De los aislamientos en niños solo el 5% son capsulados y de ellos solo la mitad es del tipo b, en adultos únicamente se ha reportado el 0.4% como tipo b...(65). La frecuencia de infecciones por *Hi* esta inversamente relacionada con la edad, solo un pequeño porcentaje ocurre en niños y adultos mayores, las infecciones en los dos primeros meses de vida son raras, debido quizás al pasaje transplacentario de anticuerpos maternos, siendo los segundos seis meses de vida la edad optima en que se presente con mayor frecuencia las infecciones con este m.o.

Cada año se reconocen más casos de *Hi* en adultos que anteriormente no se detectaba...(6,8), esta incidencia ha aumentado hasta cuatro veces en las dos ultimas décadas, esto en gran medida al mejoramiento de técnicas de laboratorio para lograr la identificación de este m.o. Las enfermedades por *Hi* ocurren en todo el mundo siendo en su mayor incidencia en individuos susceptibles en familias y centros de atención diurna, expuestos a un caso primario, es decir, los individuos que se recuperan de la infección clínica por *Hi* pueden permanecer como portadores nasofaríngeos con una frecuencia del 2 - 5%...(51). Es importante señalar que las infecciones ocurren más frecuentemente en poblaciones de bajos recursos económicos, siendo estas las que tienen un mayor número de factores de riesgo predisponibles para la infección por *Hi*... (1) como deficiencias de Ig's, drepanocitosis, esplenectomía e infecciones pulmonares crónicas entre otras. La mayor incidencia de la enfermedad invasiva en individuos no inmunes y genéticamente susceptibles, enfatiza el papel crítico de los factores del huésped en las infecciones con *Hi* así como el sinergismo viral...(65)

## TRATAMIENTO

El tratamiento de la enfermedad invasiva por *Hi*. Es una emergencia médica, especialmente en meningitis y epiglotitis, cualquier demora innecesaria en iniciar el tratamiento puede marcar la diferencia entre la vida y la muerte. Hasta hace poco tiempo, las pruebas de susceptibilidad de los antimicrobianos eran innecesarias en el caso de *Hi*., debido a que virtualmente todas las cepas clínicamente significativas eran susceptibles a la penicilina y en especial a la ampicilina. De 1968 a 1975 se reportaron un gran número de casos de cepas resistentes a la ampicilina, de ahí que se volvió habitual llevar a cabo pruebas de susceptibilidad lo que condujo a que se recomendara tratar las infecciones con ampicilina y cloranfenicol...(20,21,30,36,64) .

Cuando *Hi* se volvió resistente a ambos medicamentos las cefalosporinas de tercera generación se convirtieron en el tratamiento de elección...(19,20,30,46,53), a las que la modificación en el núcleo B-lactámico les confiere amplio espectro, estabilidad, potencia y resistencia a las beta-lactamasas, ( lo cual es característico en el 20 al 40 % de los aislamientos de *Hi*...(16,30).

## TERAPIA INTENSIVA

El desarrollo de un inmunógeno de calidad y potencia que limite la colonización, adherencia e invasión, aún está en el terreno de la investigación. Durante las dos últimas décadas se ha investigado el desarrollo de una vacuna contra *Hib*, dado que la ausencia de anticuerpos para el polisacárido capsular polirribosaribitol fosfato (PRP), se correlaciona clínicamente con la enfermedad se han probado y preparado ampliamente vacunas con PRP...(16,65).

El problema de este tipo de enfermedades es a nivel mundial, primordialmente en niños menores de 5 años y que habiten en países en vías de desarrollo, con sus grandes sitios de concentración. En el año de 1985 se tenía la primera generación de vacunas contra *H*i**, la cual estaba estructurada a través de los azúcares de la cápsula de la bacteria, la cual estimula las células timoindpendientes ofreciendo protección pero de manera temporal... (25,61). Las vacunas de segunda generación son conjugados de proteínas que comparten características más inmunogénicas... (11,14,50,61).

Hoy en día contamos con cuatro tipos de vacunas conjugadas disponibles, las que comparten ciertas características, difiriendo en el tamaño de la cadena del PRP y la manera como se fijan, pero lo mas importante es su proteína portadora, (cuadro 5), que las hace diferentes unas de otras...(11,17,31,32,33,54,56).

CUADRO 5 tipos de vacunas conjugadas ... 11

VACUNA	CARACTERÍSTICAS
Level de practice	Conjugada a un CMR-97, que es una toxina de difteria no tóxica
MEANS	Conjugada con proteínas de membrana externa de <i>Neisseria meningitidis</i>
Pachere-Meniere	Conjugada con toxoide tetánico
Connot	Conjugada con toxoide diftérico

Finalmente, lo importante es que la conformación molecular de las vacunas estimule la respuesta en una población en un momento dado, la vacuna más eficaz induce títulos de anticuerpos más elevados, que produce inmunoglobulinas específicas de mayor afinidad y que garantiza la posibilidad de que el paciente no se enferme, en caso de que este expuesto a una cepa virulenta... (11,34,40).

Estudios realizados en diversos países con vacunas conjugadas han mostrado que la prevalencia de *Hib* ha disminuido considerablemente en la población vacunada, teniendo una eficacia del orden de un 30- 90 % dependiendo de la población en estudio... (2,9,43,48).

# OBJETIVOS

## GENERAL

Determinar la presencia de *Haemophilus influenzae* biotipo I serotipo b en una muestra poblacional de adultos e infantes que asisten a consulta en unidades del IMSS e ISEM.

## PARTICULARES

- ❖ Diseñar la técnica de trabajo y estandarizar el medio de cultivo para el primoaislamiento de *Haemophilus influenzae* a partir de muestras de exudados faríngeos
  
- ❖ Identificar y biotipificar *Haemophilus influenzae* biotipo I mediante pruebas bioquímicas (Oxidasa, Catalasa, Indol, urea, MIO).
  
- ❖ Determinar serotipo capsular b de las cepas aisladas de *Haemophilus influenzae* biotipo I.

## MATERIAL Y METODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras de exudado faríngeo\*

Clinicas en donde se realizó el estudio

Clinica u Hospital	Infantes < 5 años	Adultos > 5 años	total
Clinica 62 IMSS	30	113	143
Clinica 57 IMSS	24	80	104
Hospital ISEM Cuautitlán	4	19	23
total	58	212	270

### CEPAS BACTERIANAS ATCC UTILIZADAS COMO CONTROLES

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538**
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 6301**
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 19615**
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 9997**
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027**
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048**
<i>Haemophilus influenzae</i> biotipo I serotipo b***	

Sangre de carnero desfibrinada

## **CRISTALERIA**

Cajas de Petri  
Tubos de ensaye con tapón de rosca  
Matraces Erlenmeyer  
Probetas graduadas  
Vasos de precipitado  
Porta objetos

## **INSTRUMENTOS**

Microscopio óptico  
Refrigerador  
Estufa bacteriológica  
Mecheros de Bunsen  
Balanza analítica  
Balanza granataria  
Autoclave  
Asas bacteriológicas

## **MEDIOS DE CULTIVO**

Base de agar sangre  
Agar GC

Agar para antibióticos No. 1

Agar BHI

Agar MIO

Caldo Urea

## REACTIVOS ANALITICOS

Juego de Gram

Sustrato para Indol ( L- triptófano)

Buffer de fosfatos 0.05 M, pH 6.8

Reactivo de Kovac's

Sensidiscos impregnados con factores X y V

Discos para prueba de oxidasa

Peróxido de hidrógeno al 30 %

Discos de bacitracina de 10U

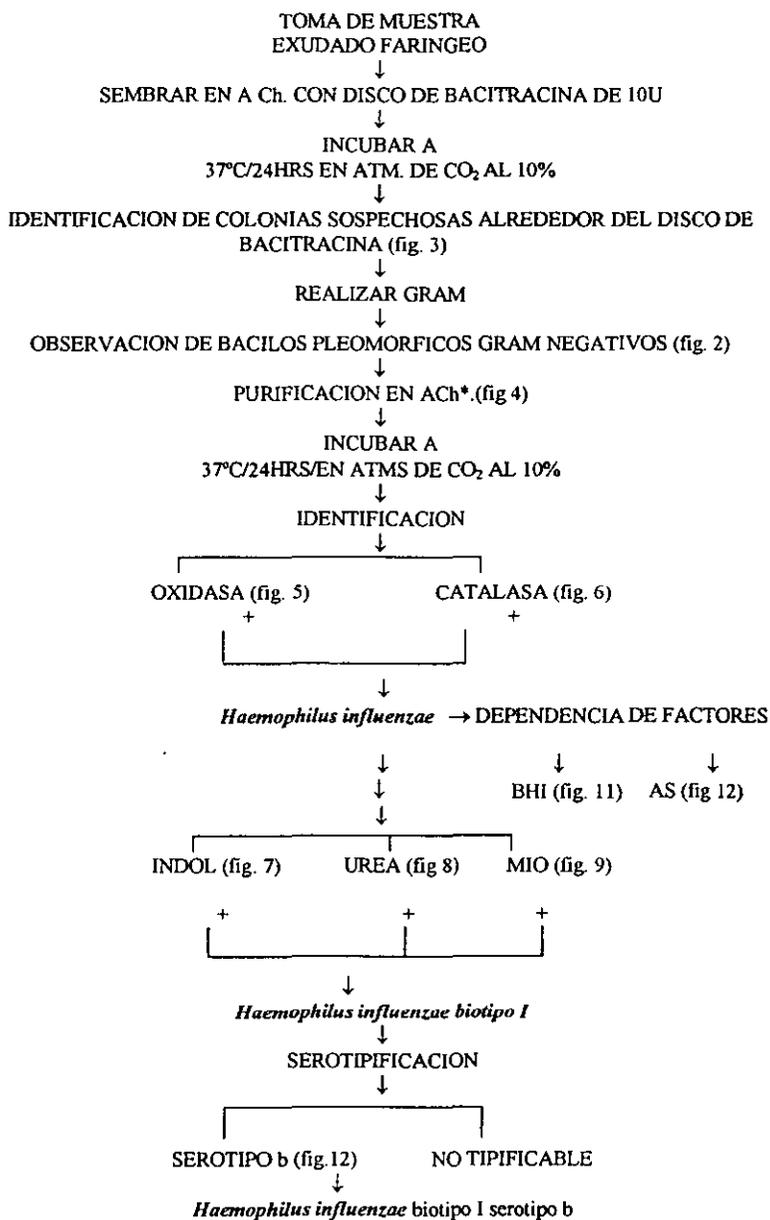
Reactivo de aglutinación de partículas de latex para Hib (DIFCO)

\* El número de muestra fue calculado estadísticamente como se muestra en el anexo 1

\*\* Fueron proporcionadas por ATYDE de México

\*\*\* Fue proporcionada por el Instituto de Infectología, donada por el QFB.Gerardo Bernardo Rojas Pedraza.

## ESQUEMA DE TRABAJO DE LAS MUESTRAS



ACh\* Agar Chocolate modificado

## METODOS

### PERIODO Y LUGAR DE OBTENCION

Las 270 muestras de exudado faríngeo fueron obtenidas en el periodo comprendido entre junio a septiembre de 1997 en las clínicas siguientes:

Clínica 62 IMSS

Clínica 57 IMSS

Hospital de Cuautitlán ISEM

Cabe señalar que el número de muestras de cada institución, a la que se muestreo, fueron los casos que llegaron durante ese periodo de estudio.

### MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO PARA EL AISLAMIENTO DE *Hib*

#### AGAR CHOCOLATE

El medio de cultivo diseñado para esta investigación fué elaborado en base a los requerimientos nutricionales de *Hib*, y lo único que se modificó fué su base.

Se utilizó como base:

Base de agar GC, que es un medio enriquecido a base de peptonas y almidón de maíz...(16)

Se complemento con medio para antibioticos No. 1, medio enriquecido a base de extracto de carne y levadura, en lugar del polienriquecimiento tradicional utilizado para el aislamiento de *Hib* (enriquecimiento de Fieldes e isovitalax)...(16,38,36)

## Preparación

La mezcla de ambos medios fue en proporción de 1:1, se les realizó un calentamiento previo (disolución de los medios) y se autoclaveo a 121°/ 15 libras/ 15 minutos.

Al medio obtenido se le mantuvo a una temperatura de 80° C aproximadamente en baño maria por espacio de 10-15 minutos para posteriormente agregar sangre de carnero desfibrinada al 5%, para achocolatar el medio, se deja disminuir la temperatura a 40°C aproximadamente y se sirve en cajas o placas de Petri.

## Control de calidad

El medio de agar chocolate modificado, (Ach\*), fue validado con cepas de referencia de *Streptococos* , *Staphylococos* y *Haemophilus*, en donde se comprobó la inhibición de *Staphylococos* y *Streptococos* por discos de bacitracina de 10 U alrededor de este a diferentes concentraciones, (  $1 \times 10^8$  ufc/ml y  $3 \times 10^8$  ufc/ml del nefelometro de Mc Farland). fig 3.

Se utilizó para esta validación una mezcla de *Streptococos*, *Staphylococos* y *Haemophilus* simulando in vitro la posible flora bacteriana presente en la orofaringe, esta solución se trabajo como una muestra de exudado faríngeo, en la que se comprobó que en el medio existía un crecimiento significativo de la bacteria de interés, fig. 4. *Hi*, además de la inhibición de las cepas no deseadas alrededor del disco.

## Modo de uso

Posteriormente los medios preparados fueron inoculados con las muestras de exudado faringeo. Para poder hacer el medio selectivo para *Hi*, a los medios ya preparados se les aplicó el disco de bacitracina de 10 U, en el área más abundantemente inoculada, *Hi* es reconocido por su desarrollo alrededor del disco de bacitracina...(2). Esto se realizó en lugar de incorporar al medio bacitracina...(16,47), cefsulodina...(3), vancomicina, nafcildina...(2), como inhibidores de bacterias mixtas.

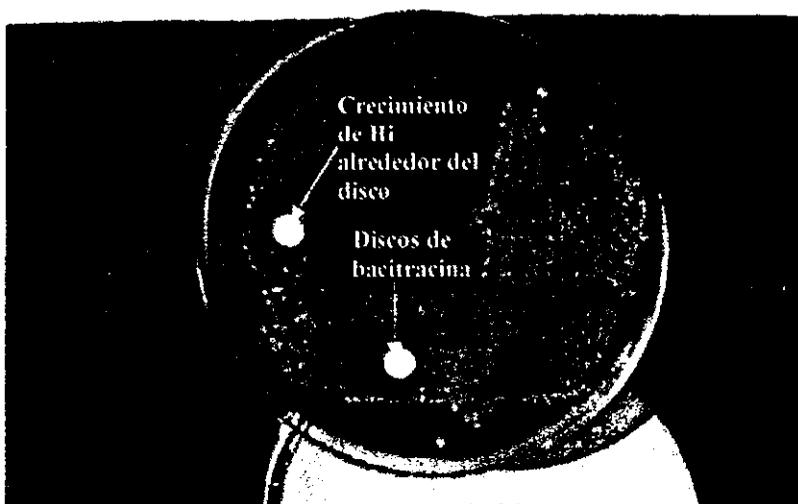


fig 3 inhibición de *Staphylococcus* y *Streptococcus* al utilizar el medio de ACh\* con discos de bacitracina de 10 U

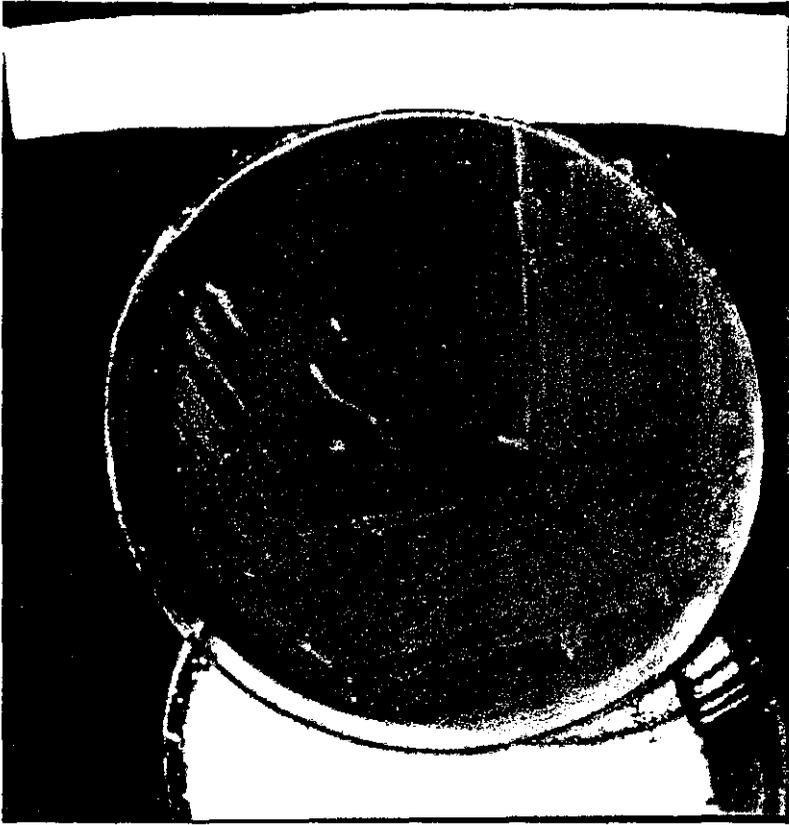


fig. 4 crecimiento de *Hi* en ACh\*

## OXIDASA

### Fundamento

Determinar la presencia de las enzimas oxidasas, la prueba de la oxidasa esta basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa; esta reacción se debe a la presencia del sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular el que a su vez actúa como receptor de electrones en la etapa terminal del sistema

de transferencia de electrones...(41).

## **Interpretación**

Colonias oxidasa positivas: la colonia toma un color rosado (bacterias viables), después marrón y finalmente negras (bacterias no viables).

Cuando se emplea una mezcla del reactivo P-fenilendiamina alfa naftol, la reacción oxidasa positiva esta indicada por un color azul.

Colonias oxidasa negativas: no se produce cambio de color en las colonias o solo adquieren un color rosado pálido por el reactivo puede producirse una coloración negra del medio circundante.

## **Técnica**

Discos de oxidasa (método indirecto)

a) Humedecer el disco con agua destilada estéril y colocar el disco en una caja de Petri o portaobjetos, después agregar con un aplicador algunas colonias de un cultivo joven.

b) Observar si se produce cambio, una reacción positiva ocurre a los pocos segundos fig. 5...(41)

## **Control de calidad**

Para el control de calidad se utilizaron cepas control positivo y control negativo de referencia

Control positivo (CP) : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Control negativo(CN) : *Escherichia coli* ATCC 19615

Control de referencia (TIPO) : *Hib.*

Blanco de reactivo.

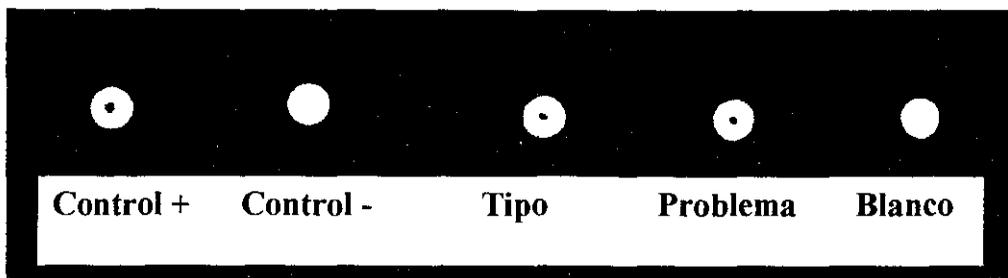


fig 5 Reacción de Oxidasa

## CATALASA

### Fundamento

Comprobar la presencia de la enzima catalasa. La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen el sistema citocromo, por lo general los organismos que no poseen el sistema citocromo carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno. La catalasa es una hemoproteína, el grupo prostético está formado por cuatro átomos de hierro trivalente por molécula, que retiene su estado oxidado durante la actividad enzimática. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en dos substratos secundarios ( agua y oxígeno molecular ), sin embargo no tiene acción contra otros peróxidos...(41).

## **Interpretación**

Prueba positiva. Formación inmediata de burbujas visibles (formación de Oxígeno molecular).

Prueba negativa. No hay formación de burbujas.

## **Técnica**

Método del portaobjetos

a) Colocar con un aplicador de madera una colonia de un cultivo joven sobre un portaobjetos.

b) Agregar una gota de peróxido de hidrogeno al 0.5 % sobre la colonia.

c) Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de Oxígeno) como un resultado positivo. fig 6...(41)

## **Control de calidad**

Para el control de calidad se utilizaron cepas control positivo y control negativo de referencia

Control positivo ( CP ): *Staphilococos aureus* ATCC 6538

Control negativo ( CN ): *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301

Control de referencia ( TIPO ): *Hib.*

Blanco de reactivo.

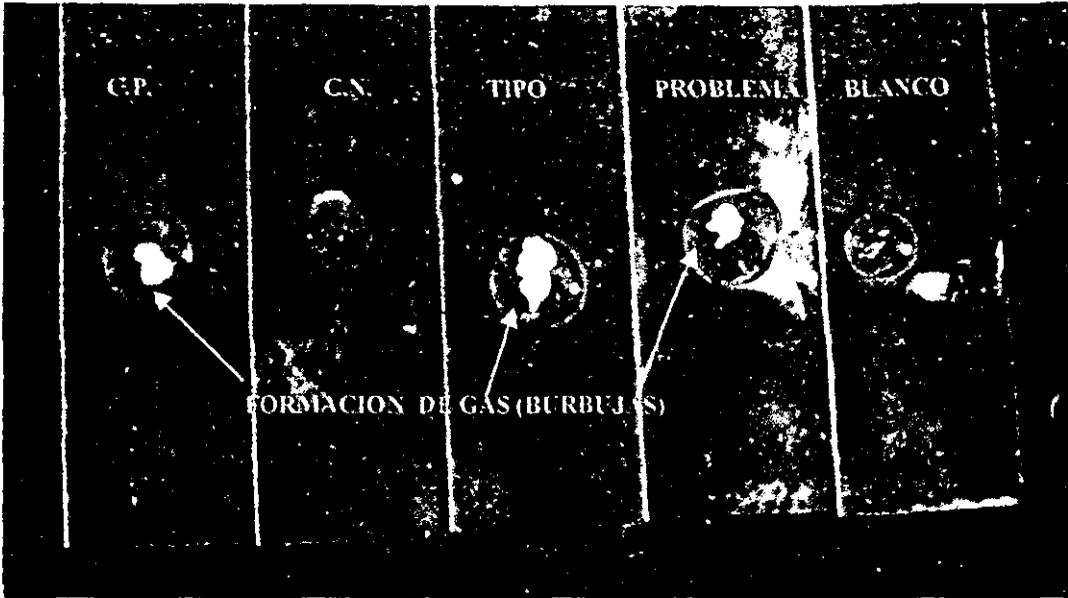


Fig. 6 prueba de catalasa

## INDOL

### Fundamento

Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el Indol de la molécula de triptófano.

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: Indol, escatol e indolacético, por diversas enzimas intramoleculares (triptofanasa) lo que indica un sistema completo de enzimas

vinculadas con la producción de indol. El principal intermediario en la degradación del triptófano es el ácido indolpirúvico del cual puede formarse indol, el cual es detectado por el reactivo de Kovac's o Erlich's...(41).

### **Interpretación**

Prueba positiva: Un anillo rojo en la superficie del medio en la capa Alcohólica.

Prueba negativa: No se produce color en la capa alcohólica, toma el color del reactivo de Kovac's (amarillo).

Variable: Un color anaranjado en la superficie del medio debido al desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser el precursor de la formación de indol. fig 7

### **Técnica**

Caldo de triptófano

Material: l-triptófano.

Buffer de fosfato 0.05 M. a pH de 6.8 .

### **Preparación**

Hacer un caldo de L -triptófano en Buffer de fosfato 0.05M pH 6.8 al 0.05% calentando ligeramente hasta su disolución.

Esterilizar mediante filtración ( Milipore de 0.2 micras).

Distribuir de 3 a 4 ml. En tubos de ensaye.

Inocular los tubos con colonias de cultivos jóvenes e incubar 24 hrs./ 37 grados centígrados.

Agregar de 4 a 5 gotas del reactivo de Kovac's al tubo, una reacción positiva se caracteriza por la aparición de un halo rojo en la superficie...(41)

## Control de calidad

Para el Control de Calidad, se utilizan cepas control positivo y control negativo de referencia.

Control Positivo (CP). : *Echerichia coli* ATCC 19615

Control Negativo (CN). : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997

TIPO : *Hib.*

Blanco de reactivo.

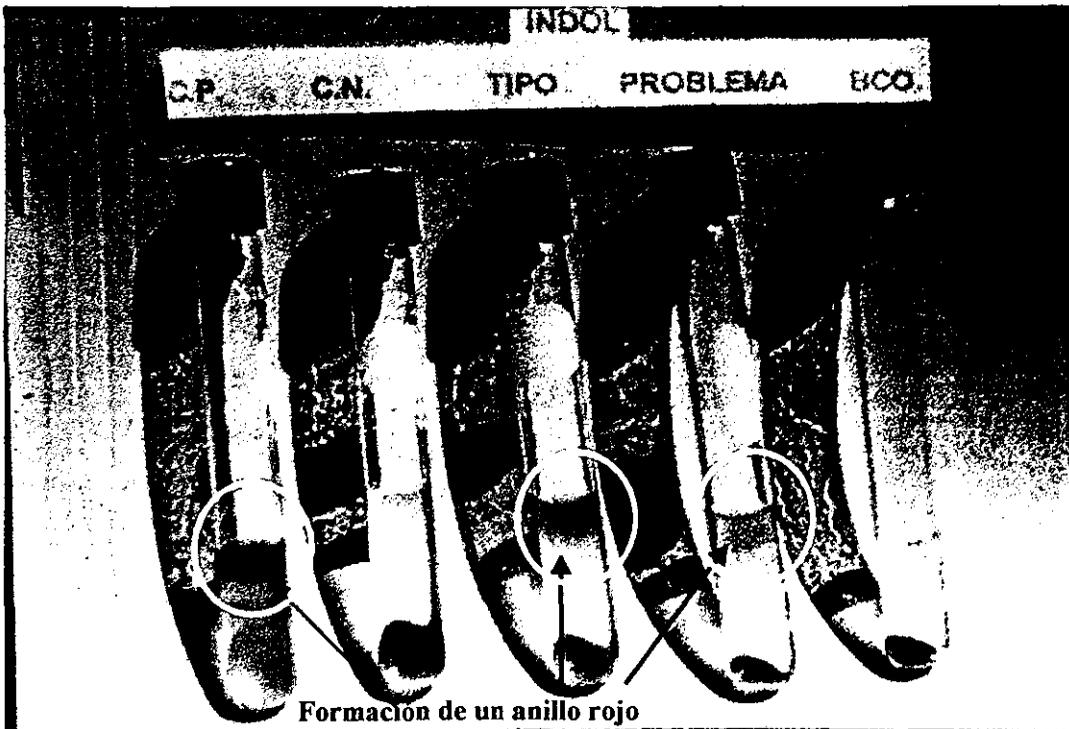


fig 7 Prueba de indol

# **UREA**

## **Fundamento**

Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.

El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico a la que frecuentemente se menciona como carbamida. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, la cual la desdobla en dos moléculas de amoníaco. La ureasa es una importante enzima microbiana, vinculada con la descomposición de compuestos orgánicos, clasificada como una amidasa; por lo que cataliza la hidrólisis de las amidas. Las que son capaces de romper por hidrólisis el enlace entre el nitrógeno y el carbono...(41).

## **Interpretación**

Reacción positiva: color rojo rosado intenso en todo el medio de crecimiento.

Reacción negativa: no se produce cambio de color ( amarillo o anaranjado).

## **Técnica**

Caldo de urea de Stuart

Pesar las cantidades exactamente de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.

Calentar muy ligeramente para su disolución.

Distribuir en tubos aproximadamente de 3-4 ml.

Esterilizar en autoclave 7 lb / 10 min.

Dejar enfriar antes de su uso.

## **Inoculación**

Se inocula el tubo con un asa la cantidad recogida de un cultivo joven, repitiendo la operación tres veces.

Se agita suavemente el tubo para lograr la suspensión bacteriana.

Se incuba 37°C durante 24 horas y se observa la reacción positiva cuando aparezca una coloración rojo rosado intenso en el medio...(41)

## **Control de calidad**

Para el Control de Calidad. se utilizan cepas control positivo y negativo de referencia.

Control Positivo (CP). *Klepsiella Pneumoniae* ATCC 9997

Control Negativo (CN). *Echerichia coli* ATCC 19615

TIPO *Hib*.

Blanco de reactivo.

Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.

Calentar muy ligeramente para su disolución.

Distribuir en tubos aproximadamente de 3-4 ml.

Esterilizar en autoclave 7 lb / 10 min.

Dejar enfriar antes de su uso.

## **Inoculación**

Se inocular el tubo con un asa la cantidad recogida de un cultivo joven, repitiendo la operación tres veces.

Se agita suavemente el tubo para lograr la suspensión bacteriana.

Se incuba a 37°C durante 24 horas y se observa la reacción positiva cuando aparezca una coloración rojo rosado intenso en el medio...(41)

## **Control de calidad**

Para el Control de Calidad, se utilizan cepas control positivo y negativo de referencia.

Control Positivo (CP). *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 9997

Control Negativo (CN). *Echerichia coli* ATCC 19615

TIPO *Hib*.

Blanco de reactivo.

Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.

Calentar muy ligeramente para su disolución.

Distribuir en tubos aproximadamente de 3-4 ml.

Esterilizar en autoclave 7 lb / 10 min.

Dejar enfriar antes de su uso.

## **Inoculación**

Se inocula el tubo con un asa la cantidad recogida de un cultivo joven, repitiendo la operación tres veces.

Se agita suavemente el tubo para lograr la suspensión bacteriana.

Se incuba 37°C durante 24 horas y se observa la reacción positiva cuando aparezca una coloración rojo rosado intenso en el medio...(41)

## **Control de calidad**

Para el Control de Calidad. se utilizan cepas control positivo y negativo de referencia.

Control Positivo (CP). *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 9997

Control Negativo (CN). *Echerichia coli* ATCC 19615

TIPO *Hib*.

Blanco de reactivo.



**Formación de un color rojo-rosado**

fig 8 Prueba de urea

## **DESCARBOXILACION DE ORNITINA (MIO)**

### **Fundamento**

La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico. las enzimas descarboxilasas son numerosas y cada una específicas para un sustrato determinado . Las tres descarboxilasas,

lisina, la ornitina y la arginina, son formadas por un organismo y cultivadas en un medio ácido en presencia de un sustrato específico, los productos de la decarboxilación provocan una desviación del pH hacia la alcalinidad. El a.a. L-ornitina es decarboxilado por la enzima ornitina-decarboxilasa para dar la diamina putresina y anhídrido carbónico.

## **Interpretación**

Prueba positiva: púrpura turbio a un púrpura amarillento apagado

Prueba negativa: color amarillo claro y brillante

## **Técnica**

Método de Brooker y col.

Pesar las cantidades exactamente de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.

Calentar muy ligeramente para su disolución.

Distribuir en tubos aproximadamente de 3-4 ml.

Esterilizar en autoclave 15 lb / 15 min.

Dejar enfriar antes de su uso.

## **Inoculación**

Poner un inculo espeso, recogido con un asa, en el medio preparado

Cubrir con una gota de vaselina o parafina fundida.

Incubar a 37°C / 24hrs...(41)

## **Control de calidad**

Para el Control de Calidad. se utilizan cepas control positivo y negativo de referencia

Control Positivo (CP) *Enterobacter aerogenes* ATCC13048

Control Negativo (CN) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997

TIPO: Hib  
Blanco de reactivo



fig 9 prueba de MIO

## PRUEBA DE AGLUTINACION CON PARTICULAS DE LATEX

### Fundamento

El uso de métodos serológicos para la identificación de especies de cepas de *Haemophilus* no se ha evaluado adecuadamente. Los serotipos capsulares pueden determinarse por aglutinación. La suspensión de células usadas para la prueba de aglutinación en porta objetos debe prepararse de un cultivo joven, pues la estructura capsular tiende a deteriorarse en cultivos mas viejos, la suspensión celular debe tener densidad suficiente para permitir que la reacción antígeno-anticuerpo quede completada en un minuto...(38)

## **Interpretación**

Una reacción fuertemente positiva ocurre cuando todas las bacterias se aglutinan y el líquido entre los racimos queda claro

Una reacción negativa la suspensión permanece sin cambio.

## **Técnica**

Se coloca una gota del reactivo de aglutinación ( 50 - 100 µl ) en un porta objetos.

Se le agrega una asada de la cepa problema , proveniente de un cultivo joven y se agita ligeramente.

una reacción positiva se caracteriza por la formación o presencia de aglutinación...(38)

## **Control de calidad**

Para el Control de Calidad. se utilizan cepas control positivo y negativo de referencia

Control Positivo (CP) *Hib* de referencia

Control Negativo (CN) *Hib* no tipificable

Blanco de reactivo

## **Interpretación**

Una reacción fuertemente positiva ocurre cuando todas las bacterias se aglutinan y el líquido entre los racimos queda claro

Una reacción negativa la suspensión permanece sin cambio.

## **Técnica**

Se coloca una gota del reactivo de aglutinación ( 50 - 100  $\mu$ l ) en un porta objetos.

Se le agrega una asada de la cepa problema , proveniente de un cultivo joven y se agita ligeramente.

una reacción positiva se caracteriza por la formación o presencia de aglutinación...(38)

## **Control de calidad**

Para el Control de Calidad. se utilizan cepas control positivo y negativo de referencia

Control Positivo (CP) *Hib* de referencia

Control Negativo (CN) *Hib* no tipificable

Blanco de reactivo

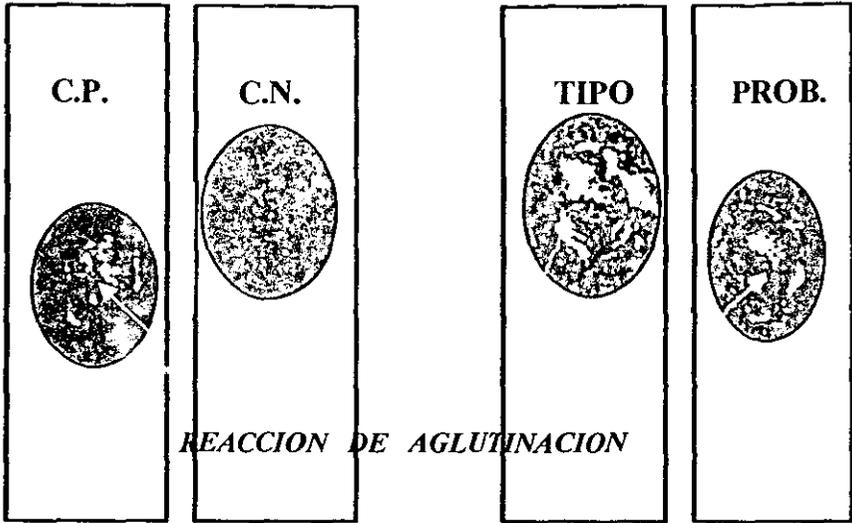


fig 10 Reacción de aglutinación con partículas de latex

**PRUEBA DE DEPENDENCIA DE FACTORES X Y V EN  
MEDIOS DE BHI Y AS.**

**AGAR INFUSION CEREBRO CORAZON (BHI)**

Estos medios de cultivo se basan en el principio del caldo ROSENOW preparado con trozos de cerebro y son adecuados para el cultivo de muchas bacterias exigentes, este medio es especialmente adecuado para el cultivo de *Staphylococcus*, *Pneumococcus*, entre otros.

## Composición

Sustrato alimenticio (extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona D(+))glucosa, cloruro de sodio, hidrogeno fosfato disodico, agar-agar.

## Preparación

Disolver 52 g/l del medio y esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C, 15 lb de presión.

Verter en placas y dejar solidificar...(42)

## Empleo e interpretación

Como se describe en la pag 11 fig 11

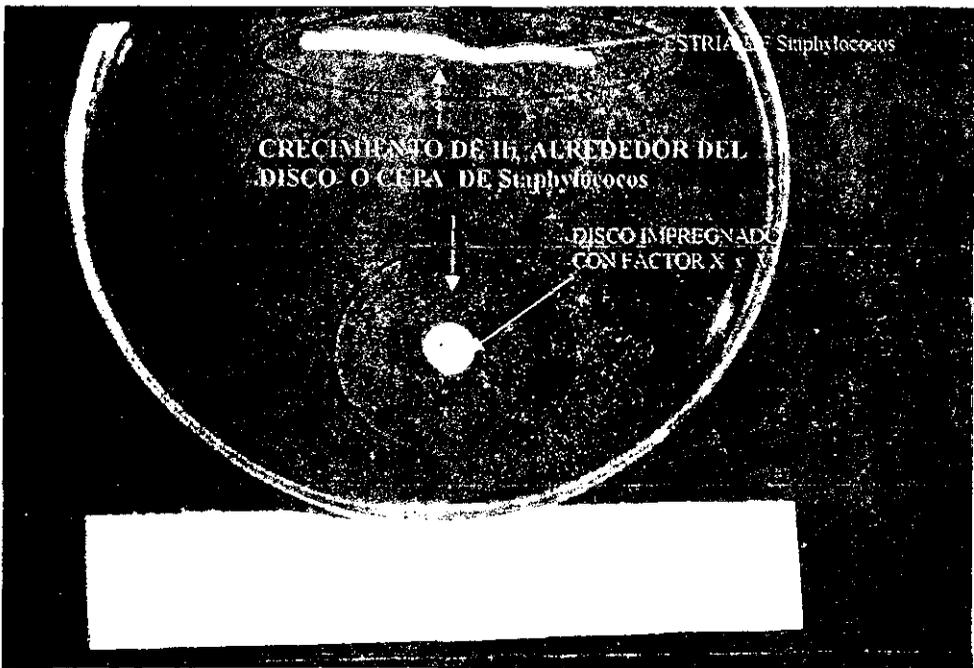


fig 11 Agar BHI para dependencia de factores X y V

## **AGAR SANGRE**

Este medio de cultivo dispone de una excelente y abundante base nutritiva que ofrece condiciones óptimas de crecimiento a todos los m.o. presentes , su pH (6.8) es especialmente favorable para la conservación de los eritrocitos y para la formación de halos hemolíticos claros .

### **Composición**

Sustrato nutritivo, cloruro de sodio, agar-agar, sangre de carnero desfibrinada.

### **Preparación**

Disolver 40 g/l, esterilizar en autoclave (15 MIN, 121°C, 15lb), dejar enfriar a 45-50°C, incorporar 5-8% de sangre de carnero desfibrinada y verter en placas y dejar solidificar...(42)

### **Empleo e interpretación**

Como se describe en la pag. 11 fig 12

## **AGAR SANGRE**

Este medio de cultivo dispone de una excelente y abundante base nutritiva que ofrece condiciones óptimas de crecimiento a todos los m.o. presentes , su pH (6.8) es especialmente favorable para la conservación de los eritrocitos y para la formación de halos hemolíticos claros .

### **Composición**

Sustrato nutritivo, cloruro de sodio, agar-agar, sangre de carnero desfibrinada.

### **Preparación**

Disolver 40 g/l, esterilizar en autoclave (15 MIN, 121°C, 15lb), dejar enfriar a 45-50°C, incorporar 5-8% de sangre de carnero desfibrinada y verter en placas y dejar solidificar...(42)

### **Empleo e interpretación**

Como se describe en la pag. 11 fig 12



fig 12 agar sangre para dependencia de factores X y V

## ANALISIS ESTADISTICO

Para la realización del análisis estadístico se aplicó la prueba de Ji-cuadrada de contingencia ( $\chi^2$ )...( 63), como a continuación se demuestra:

Calculo de la zona de rechazo de  $H_0$

$$g.l. = (r - 1)(c - 1)$$

donde  $r$  = renglones

$c$  = columnas

$$g.l. = (2 - 1)(2 - 1)$$

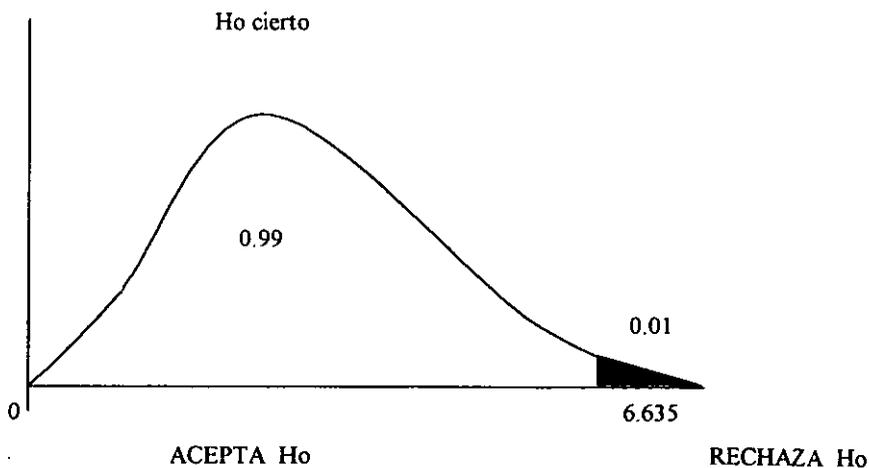
g.l. = grados de libertad

$$g.l. = 1$$

si consideramos  $\alpha = 0.01$

entonces  $X^2_t = X^2_{g.l.;\alpha}$

$$X^2_{1;0.99} = 6.635 \text{ ...}(tablas...63)$$



# ANALISIS ESTADISTICO

Para la realización del análisis estadístico se aplicó la prueba de Ji-cuadrada de contingencia ( $\chi^2$ )...( 63), como a continuación se demuestra:

Calculo de la zona de rechazo de  $H_0$

$$g.l. = (r - 1)(c - 1)$$

donde  $r$  = renglones

$c$  = columnas

$$g.l. = (2 - 1)(2 - 1)$$

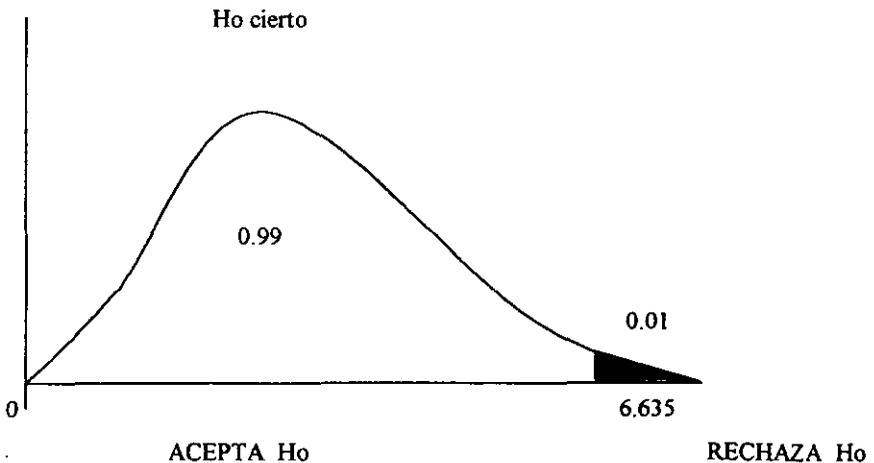
g.l. = grados de libertad

$$g.l. = 1$$

si consideramos  $\alpha = 0.01$

entonces  $X^2_t = X^2_{g.l.;\alpha}$

$$X^2_{1;0.99} = 6.635 \dots(\text{tablas} \dots 63)$$



Para cada uno de los datos obtenidos,( tablas 1,2,3), se calculan sus valores esperados en relación a los observados utilizando las siguientes ecuaciones:

$$e_{1,1} = \frac{(\sum r_1)(\sum c_1)}{\eta}$$

$$e_{1,2} = \frac{(\sum r_1)(\sum c_2)}{\eta}$$

$$e_{2,1} = \frac{(\sum r_2)(\sum c_1)}{\eta}$$

$$e_{2,2} = \frac{(\sum c_2)(\sum c_2)}{\eta}$$

			TOTAL
NINOS	$e_{1,1}$	$e_{1,2}$	$r_2$
ADULTOS	$e_{2,1}$	$e_{2,2}$	$r_2$
TOTAL	$c_1$	$c_2$	$\eta$

en donde:

Para cada uno de los datos obtenidos,( tablas 1,2,3), se calculan sus valores esperados en relación a los observados utilizando las siguientes ecuaciones:

$$e_{1,1} = \frac{(\sum r_1)(\sum c_1)}{\eta}$$

$$e_{1,2} = \frac{(\sum r_1)(\sum c_2)}{\eta}$$

$$e_{2,1} = \frac{(\sum r_2)(\sum c_1)}{\eta}$$

$$e_{2,2} = \frac{(\sum c_2)(\sum c_2)}{\eta}$$

			TOTAL
NIÑOS	$e_{1,1}$	$e_{1,2}$	$r_2$
ADULTOS	$e_{2,1}$	$e_{2,2}$	$r_2$
TOTAL	$c_1$	$c_2$	$\eta$

en donde:

## RESULTADOS

Se estudiaron 270 muestras de exudados faríngeos en una población de adultos\* e infantes\* que acudieron a consulta en unidades del IMSS ( clínica # 62, clínica # 57 ) e ISEM. (Hospital General "José Vicente Villada") de los cuales el 24.43%, (66 casos; 23 niños y 43 adultos ), presentó cultivo positivo a la presencia de *Haemophilus influenzae*, tabla 1 y 1b . Detectándose 17 casos de portadores de *Haemophilus influenzae* serotipo b en la población estudiada, (datos observados en las tablas 2 y 2b); en el cual el grupo en donde existe mayor prevalencia es el adulto, 12 casos (4.44%). Los casos detectados con *Haemophilus influenzae* biotipo I se probaron para determinar presencia de cápsula por medio de serotipificación encontrándose cifras del 4.81 % del total de muestras trabajadas, las tablas 3 y 3b muestran los resultados (13 casos), en donde observamos los casos considerados como positivos y negativos así como los porcentajes encontrados para cada grupo estudiado .

En las tablas 1a, 2a y 3a se muestran los valores observados (o) y esperados (e) en base al análisis estadístico, las cuales nos son útiles para determinar la aceptación o rechazo de nuestras hipótesis

A los resultados obtenidos se les aplico la prueba de  $\chi^2$  como a continuación se demuestra:

\* NOTA: en nuestro estudio nos referimos a individuos adultos como a los pacientes mayores de 5 años, y a los individuos infantes como a los pacientes menores de 5 años.

## RESULTADOS

Se estudiaron 270 muestras de exudados faríngeos en una población de adultos\* e infantes\* que acudieron a consulta en unidades del IMSS ( clínica # 62, clínica # 57 ) e ISEM. (Hospital General "José Vicente Villada") de los cuales el 24.43%, (66 casos; 23 niños y 43 adultos ), presentó cultivo positivo a la presencia de *Haemophilus influenzae*, tabla 1 y 1b . Detectándose 17 casos de portadores de *Haemophilus influenzae* serotipo b en la población estudiada, (dato: observados en las tablas 2 y 2b); en el cual el grupo en donde existe mayor prevalencia es el adulto, 12 casos (4.44%). Los casos detectados con *Haemophilus influenzae* biotipo I se probaron para determinar presencia de cápsula por medio de serotipificación encontrándose cifras del 4.81 % del total de muestras trabajadas, las tablas 3 y 3b muestran los resultados (13 casos), en donde observamos los casos considerados como positivos y negativos así como los porcentajes encontrados para cada grupo estudiado .

En las tablas 1a, 2a y 3a se muestran los valores observados (o) y esperados (e) en base al análisis estadístico, las cuales nos son útiles para determinar la aceptación o rechazo de nuestras hipótesis

A los resultados obtenidos se les aplico la prueba de  $\chi^2$  como a continuación se demuestra:

\* NOTA: en nuestro estudio nos referimos a individuos adultos como a los pacientes mayores de 5 años, y a los individuos infantes como a los pacientes menores de 5 años.

**Tabla 1.** presencia de *Hi* en la muestra poblacional de adultos e infantes  
( valores observados oij ).

Hi / grupo	Positivos	%	Negativos	%	Total
Niños	23	8.51	35	12.96	58
Adultos	43	15.92	169	62.59	212
Total	66	24.43	204	75.55	270

Para la tabla 1, se establecen  $H_0$  y  $H_1$

$H_0$  : *Hi* es independiente de la edad

$H_1$  : *Hi* es dependiente de la edad

Se realiza su análisis estadístico

$$e_{11} = \frac{(58)(66)}{270} = 14.2$$

**Tabla 1.** presencia de *Hi* en la muestra poblacional de adultos e infantes  
 ( valores observados oij ).

Hi \ grupo	Positivos	%	Negativos	%	Total
Niños	23	8.51	35	12.96	58
Adultos	43	15.92	169	62.59	212
Total	66	24.43	204	75.55	270

Para la tabla 1, se establecen  $H_0$  y  $H_1$

$H_0$  : *Hi* es independiente de la edad

$H_1$  : *Hi* es dependiente de la edad

Se realiza su análisis estadístico

$$e_{11} = \frac{(58)(66)}{270} = 14.2$$

$$e_{12} = \frac{(58)(204)}{270} = 43.8$$

$$e_{21} = \frac{(212)(66)}{270} = 51.8$$

$$e_{22} = \frac{(212)(204)}{270} = 160.2$$

conjuntando estos valores con los de la tabla 1 tenemos la tabla 1a

**Tabla 1a** : valores observados (o) y esperados(e) de *Haemophilus influenzae* en base al análisis estadístico

Hi grupo	Positivos		Negativos		Total
	o	e	o	e	
Niños	23	14.2	35	43.8	58
Adultos	43	51.8	169	160.2	212
Total	66		204		270

calculamos  $X^2$

$$X^2_c = \frac{(23 - 14.2)^2}{14.2} + \frac{(35 - 43.8)^2}{43.8} + \frac{(43 - 51.8)^2}{51.8} + \frac{(169 - 160.2)^2}{160.2}$$

$$X^2_c = 5.45 + 1.77 + 1.49 + 0.48$$

$$X^2_c = 9.20$$

tomando nuestro criterio de aceptabilidad tenemos que :

como 9.20 es mayor a 6.35 entonces se **rechaza**  $H_0$  , por lo que  $H_1$  es **aceptada**.

De la misma forma procedemos para la tabla 2 y 3

**Tabla 2.** presencia de *Hi* biotipo I en la muestra poblacional de adultos e infantes ( Valores observados o  $ij$  ).

Hi / grupo	Positivos	%	Negativos	%	Total
Niños	5	1.85	18	6.66	23
Adultos	18	4.44	31	11.48	43
Total	23	6.29	49	18.14	66

Es importante señalar que los porcentajes que se muestran en esta tabla son en base al número total de muestras tomada (270).

Para la tabla 2 establecemos  $H_0$  y  $H_1$

$H_0$  : *Hi* biotipo I es independiente de la edad

$H_1$  : *Hi* es dependiente de la edad

**Tabla 2a** . Valores observados (o) y esperados (e) en la muestra de *Hibi* en base al análisis estadístico.

Hibi grupo	Positivos		Negativos		Total
	o	e	o	e	
Niños	5	5.9	18	17.9	23
Adultos	12	11.1	31	31.9	43
Total	17		49		66

para este caso

$$X^2_o < X^2_t$$

por lo que se **acepta**  $H_0$

**Tabla 3.** Presencia de *Hib* en la muestra poblacional de adultos e infantes (valores observados o  $ij$  ).

Hib / grupo	Positivos	%	Negativos	%	Total
Niños	4	1.48	1	0.37	5
Adultos	9	3.33	3	1.11	12
Total	13	4.81	4	1.48	17

Es importante señalar que los porcentajes que se muestran en esta tabla son en base al número total de muestras tomada (270).

Para la tabla 3 establecemos  $H_0$  y  $H_1$

$H_0$  : *Hib* es independiente de la edad

$H_1$  : *Hib* es dependiente de la edad

**Tabla 3a.** Valores observados (o) y esperados (e) de *Hib* en la muestra en base al análisis estadístico.

Hib grupo	Positivos		Negativos		Total
	o	e	o	e	
Niños	4	3.8	1	1.2	5
Adultos	9	9.2	3	2.8	12
Total	13		4		17

Como en este caso se tienen valores menores de 5 se realiza la corrección de Yates en donde obtenemos que:

$$X^2_c < X^2_t$$

por lo que se acepta  $H_0$

## ESTADISTICA DESCRIPTIVA

**Tabla 1b.** porcentajes de *Hib* encontrados en la muestra estadística  
... (45,47,51)

	POSITIVOS	%	REFERENCIA
NINOS	23	8.51	8 – 90 %
ADULTOS	43	15.92	35 %
TOTAL	66	24.43	

**Tabla 2b.** porcentajes de *Hib* biotipo I en la muestra estadística  
...(16,47)

	POSITIVOS	%	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
NINOS	5	1.85	Más del 90% de Hib son biotipo I
ADULTOS	12	4.44	
TOTAL	17	6.29	

**Tabla 3b** .Porcentajes de *Hib* encontrados en la muestra estadística  
 ...(23,51)

	POSITIVOS	%	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
NIÑOS	4	1.48	2 - 6 %
ADULTOS	9	3.33	1.1 %
TOTAL	13	4.81	

En estas tablas 1b, 2b y 3b se muestran los porcentajes encontrados experimentalmente así como los reportados bibliográficamente cuyo análisis a continuación se describe.

## DISCUSION

En la actualidad *Hi* ha cobrado cierta importancia como bacteria patógena para el humano, por ende es considerada como potencialmente contagiosa, debido a que se encuentra como miembro de la flora oral autóctona...(47) aunado a que entre la población existen diversos factores que la hacen altamente susceptibles para que se lleve a cabo la colonización en el humano, especialmente en niños menores de 5 años y personas mayores, de este m.o., por diferentes mecanismos propios de su especie...(1,23,30,51).

En nuestro estudio el aislamiento de *Hib* fué realizado básicamente en tres etapas, esto para entender mejor como se comporta *Hib*.

### AI SLAMI EN TO DE *Hi*

En esta etapa los resultados muestran que existe una mayor recuperación de *Hi* en el grupo de adultos en la muestra estudiada, tabla 1, esto con base en que el estudio estadístico muestra una diferencia significativa entre los casos observados y esperados, tabla 1a, por lo que se dice, para este caso la bacteria va a depender de la edad, esto en cuanto al periodo en el cual se realizó el estudio. Es importante tomar en cuenta al grupo de mayor riesgo que es el de los menores de 5 años, como lo demuestran estudios realizados en diferentes países...(7,11,23,28,29,43,45), sin embargo el grupo de niños mayores y adultos son considerados como portadores comunes de este m.o. entre quienes la transmisión se conoce que ocurre, y un brote pudiese parecer raro, de ahí que en este grupo de edades se encuentre una mayor recuperación de este m.o....(5,6,40,47,51,65).

## IDENTIFICACION DE *Hi* biotipo I

Para este caso el estudio estadístico nos muestra que el aislamiento de *Hi* biotipo I no se relaciona con la edad, en base a nuestra hipótesis establecida, debido a que no existe diferencia significativa entre los casos observados y esperados, tabla 2 y 2a, aunque está reportado por diversos autores, que existe una mayor incidencia del biotipo I en la población pediátrica con diferentes patologías, por ser está la más susceptible... (11,23,26,27,28,30,35,40,43,47,51,52), sin embargo es importante tener en cuenta los diversos factores de riesgo que puedan afectar a la población haciendola más susceptible a este m.o..

## IDENTIFICACION DE *Hib*

Al analizar la tabla 3 y 3a , se observa que no hay diferencia estadística significativa, lo cual nos indica que la presencia de *Hib* no está condicionada hacia la edad, sin embargo, se han encontrado reportes en los que existe un mayor aislamiento de casos de *Hib* en niños menores de 5 años, lo que es más, en la mayoría de los trabajos realizados este m.o. se encuentra presente en la población pediátrica....(7,8,40,43,45,46,52), de ahí que nuestro estudio se enfocara hacia esta población.

La importancia de este estudio , aunque no corrobora lo que hasta hoy en día ha estado manejándose, es decir, que la población en la que mayormente se presenta este m.o. es la pediátrica ( infantes menores de 5 años),si nos da una pauta para establecer que la presencia de *Hib* va a estar afectada por diversos factores de riesgo como lo son: la época del año, grupo de edad, zona geográfica, así como el medio de cultivo empleado para el aislamiento de este m.o., como lo describen diversos autores en varios países...(1,6,7,11,30,47,51).

Finalmente podemos señalar que en este estudio, los valores obtenidos experimentalmente caen dentro de los que son reportados en la literatura, tablas 1b, 2b, y 3b...(5,16,23,45,47,51,65) a excepción de *Hib* para adultos, (3.33%), en los que se reportan valores del 1.1%, pero posiblemente se deba a las diferentes condiciones comentadas anteriormente, cabe señalar que los valores bibliográficos que presentamos en estas tablas son una recopilación de datos de diferentes estudios, realizados en varios países, esto debido a que no se tienen valores establecidos para *Hib*, ya que los diferentes factores de riesgo que lo condiciona van a determinar su presencia en una zona u otra.

## CONCLUSIONES

De la población estudiada (270 muestras) se encontró que en el 4.81 % de los casos (13 individuos) existe **Hib** como parte de la flora normal de la faringe, dato que concuerda claramente con lo reportado en la bibliografía (1.55- 6.0 %) aunque su presencia no va a estar condicionada por la edad, como se ha demostrado en base al estudio estadístico, si va a depender de la zona en la que se realice el estudio, por lo que habrá zonas de mayor y menor riesgo en base a sus características geográfica.

La estandarización y validación del medio de cultivo empleado para el aislamiento de **Hib** (Agar para Antibiótico # 1 + Agar G.C. en una proporción de 1:1 ; con la incorporación de discos de bacitracina de 10 U ), para llevar a cabo el primoaislamiento de **Hi** a partir de exudados faríngeos, el cual en comparación con el medio de cultivo tradicional (Agar Chocolate ) ofreció varias ventajas como lo son una buena recuperación, así como un crecimiento abundante de la bacteria para los fines requeridos fig 4.

La identificación y biotipificación por medio de pruebas bioquímicas (Gram, Oxidasa, Catalasa, Indol, Urea, MIO y dependencia de factores "X" y "V" ) de **Haemophilus Influenzae**, es importante, ya que al llevar a cabo un correcto aislamiento y diagnóstico de **Hi** en portadores sanos, se puede tener una forma de prevenirlo por medio un tratamiento profiláctico conllevando a que se estaría previniendo una posible enfermedad de tipo crónico y/o agudo, que puede evitarse en la mayoría de los casos, como se ha demostrado, este m.o. esta presente en un porcentaje significativo dentro de la muestra en estudio, 4.81% , en comparación a los reportados en la literatura (tabla 3b).

La serotipificación del polisacárido capsular b en las cepas identificadas como **Hib** I se realizó mediante el empleo de antisuero monoclonal ( Reactivo de aglutinación con partículas de latex para serotipificar **Haemophilus influenzae** serotipo b, DIFCO ) en cultivos

bacterianos jóvenes; esto debido a que *Hib* tiene la capacidad de autolisar su cápsula , lo que al suceder proporciona un incorrecto diagnóstico, cabe destacar que es importante llevara cabo la serotipificación porque a partir de esta podemos establecer más específicamente que tipo de m.o. esta afectando a la población y asi poder dar un tratamiento profiláctico adecuado y específico.

## ANEXO

### Número de muestras

El estudio realizado involucró 270 muestras de exudados faríngeos, tomadas al azar a personas que acudían a clínicas del IMSS e ISEM por problemas en tracto orofaríngeo.

El número de muestras fué calculado estadísticamente en base a la confianza que queremos del estudio como a continuación se muestra:

$$n = \frac{z_0^2 pq}{e^2}$$

Donde:            n = número de muestras  
                       $z_0$  = tablas estadísticas  
                      p y q = variables estadísticas  
                      e = error máximo permitido

Si consideramos que nosotros requerimos de una confianza del 95%, entonces:

$$1 - \alpha = 95\% > Z_0 = 1.96 \text{ (tablas)...(63)}$$

Para que el estudio sea significativo se realiza el calculo para obtener el menor error estándar, por lo que consideramos:

$$e = 0.06 \text{ (6\%, aunque se recomienda como ideal 4\%)}$$

$$p = 0.5$$

$$q = 0.5$$

Es importante señalar que a mayor número de muestras tendremos un mínimo error standard, por ende a un menor número de muestras se tendrá un mayor error standard, de ahí que consideremos una p y q de 0.5 ya que en estas condiciones tendremos el número máximo de muestras a una e de 6% .

Sustituyendo valores en nuestra ecuación:

$$n = \frac{(1.96)^2(0.5)(0.5)}{(0.06)^2}$$

$$n = \frac{0.9604}{0.0036}$$

$n = 266.7 \approx 270$  muestras de exudados faringeos que se recomienda estadísticamente.

Para que el estudio sea significativo se realiza el calculo para obtener el menor error estándar, por lo que consideramos:

$$e = 0.06 \text{ (6\%, aunque se recomienda como ideal 4\%)}$$

$$p = 0.5$$

$$q = 0.5$$

Es importante señalar que a mayor número de muestras tendremos un mínimo error standard, por ende a un menor número de muestras se tendrá un mayor error standard, de ahí que consideremos una p y q de 0.5 ya que en estas condiciones tendremos el número máximo de muestras a una e de 6% .

Sustituyendo valores en nuestra ecuación:

$$n = \frac{(1.96)^2(0.5)(0.5)}{(0.06)^2}$$

$$n = \frac{0.9604}{0.0036}$$

$n = 266.7 \approx 270$  muestras de exudados faringeos que se recomienda estadísticamente.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Aino K Takala and Denis A. Clemens, Socioeconomic Risk factor for invasive *Hib* disease, JID, 1992:165, (suppl 1) p. s11 - s15.
2. Aino K Takala et al Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (*Hib*) in Children immunized with an *Hib* conjugate vaccine; JID 1991 164; p 982-986.
3. A. Smit and M. Baker; Cefsulodin Chocolate Blood agar a selective medium for the recovery of *Haemophilus influenzae* from the respiratory secretions of patients with Cystic fibrosis; JMM; vol. 46; 1997 p 818 - 822.
4. Balows, Albert; Manual of clinical Microbiology, 1991; p 463 - 469
5. Bernal D. Davis; Tratado de Microbiología; 1983; p 818 - 822.
6. Bijlmer H.A.; World-Wide epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis industrialized versus non-industrialized countries; Vaccine; 1991; (suppl 9); p s5 - s9.
7. Bijlmer H.A: et al; The epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis in children under five years of age in the Gambia west Africa; JID; 1990:161; p 1210 - 1215
8. Carlos Avila Figueroa; Epidemiología molecular de las infecciones por *Haemophilus influenzae* no tipificable; Enfermedades infecciosas e infectología, 1997; vol. 1 No. 2 ; p.42.
9. Christopher K. Farley, Joanne M. White and Norman T. Begg; Fast-tacking meningococcal vaccination; The Lancet; 1994; vol. 344; p 1164 - 1165.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aino K Takala and Denis A. Clemens, Socioeconomic Risk factor for invasive *Hib* disease, JID, 1992;165, (suppl 1) p. s11 - s15.
2. Aino K Takala et al Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (*Hib*) in Children immunized with an *Hib* conjugate vaccine; JID 1991 164; p 982-986.
3. A. Smit and M. Baker; Cefsulodin Chocolate Blood agar a selective medium for the recovery of *Haemophilus influenzae* from the respiratory secretions of patients with Cystic fibrosis; JMM; vol. 46; 1997 p 818 - 822
4. Balows, Albert; Manual of clinical Microbiology, 1991; p 463 - 469
5. Bernal D Davis; Tratado de Microbiologia, 1983; p 818 - 822.
6. Bijlmer H A ; World-Wide epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis industrialized versus non-industrialized countries; Vaccine; 1991; (suppl 9); p s5 - s9.
7. Bijlmer H:A. et al; The epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis in children under five years of age in the Gambia west Africa; JID; 1990;161; p 1210 - 1215
8. Carlos Avila Figueroa; Epidemiología molecular de las infecciones por *Haemophilus influenzae* no tipificable; Enfermedades infecciosas e infectología, 1997; vol. 1 No. 2 ; p.42.
9. Christopher K. Farley, Joanne M. White and Norman T. Begg; Fast-tacking meningococcal vaccination; The Lancet; 1994; vol. 344; p 1164 - 1165.

10. Collins Métodos Microbiológicos; 1993, p 487 - 494.
11. Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica ; Infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* tipo b; infectología , edición especial : 1993; p 97 - 100.
12. Delat, Adrian N:C: Microbiología ; 199 ; p 190 - 192.
13. D. Hansman and Lawrence; Outer-membrane proteins and immunoblot analysis of Australian isolates of *Haemophilus influenzae*; JMM, 1987; vol. 38, No. 5, p 378 - 383.
14. Dr. Ann Davis and Dr. Gorge Bull; Vacuna contra *Hib* ; Infectología, 1987, año 7 No. 2 p 79 - 86
15. Dr. Demostenes Flores Barreto; Microbiología de las infecciones de las vía respiratorias y su impacto en la morbilidad infantil; infectología edición especial, 1993, p 63 - 64
16. Dr. Ernesto Calderón Jaimes et al ; Epidemiología de las infecciones por *Haemophilus influenzae*; Infectología ; 1982, vol. 2 , p 37 - 44.
17. Dr. John Robbins; Vacunas; *Haemophilus influenzae* y Neumococo; infectología, edición especial, 1993, p 21.
18. Dr. Manuel López A. et al; Otitis media, Diagnostico, Manejo y Prevención. Infectología, 1981, p 11 - 20.
19. Dr. Miguel Angel Salazar; Experiencia Clínica Nacional con Proxetil cefpodoxima; infectología, edición especial, 1993, p 49 -- 53
20. Dr. Michell Cohen et al; Resistencia bacteriana a los antibióticos; Atención médica, 1994, p 53 - 63.

21. Dra. Silvia Giano Cerezo; Sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias aisladas a partir de hemocultivos; infectología; 1984, año 4, No. 6 , p 158 - 163.
22. Elizabeth E. Hiner and Carl E. Frasch; Spectrum of disease due to *Hib* occurring in Vaccinated Children; JID, 1988, vol. 158, No. 2, p 343 - 348.
23. Elodia Guillermina Sosa Iglesias y Leopoldo Portillo Gomez, Adherencia de *Haemophilus influenzae*; Enfermedades infecciosas y Microbiología; 1998, vol. 18 No 2 , p 63 - 69.
24. E. Richard Moxon and Rino Rappouli; *Haemophilus influenzae* infection and Whooping cough; The Lancet; 1990, vol 335, p 1324 - 1329.
25. Georffreg A. Weiberg et al; Lipoproteins of *Hib*; JB; 1988, vol. 170, No. 7, p 4161 - 4164.
26. George A. Geller, Jay D. Wagner and Anita Brilla; *Hib* disease in Latuia, The Lancet, 1994, vol. 344, p 959.
27. Gillian Urwin, J.M Mouser and Mei Fang Yuang; Cloal Analysis of *Hib* isolates in The United Kingdom; 1995, vol 43, p 43 - 49.
28. I.M: Landgraf and M.F.P: Vieira; Biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* from pacientes pacientes with meningitis in the Cyte of Sao Paulo Brazil, JCM, 1993, vol. 31, No. 3 p 743 - 745.
29. Janett R Glisdore, et al Relationship of *Hib* pilus structure and adherence to human erithocytes; Infection and immunity; 1989, vol. 57, No. 10, p 3259 - 3260.

30. Jerome O. Klein, Manejo de la otitis media aguda en una época de cambio de la susceptibilidad a los antibióticos; *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 1998, vol. 18, No. 1, p 39 - 43
31. Juhani Eskola, Analisis of *Hib* conjugate and Diphtheria-Tetanus Pertusis (DPT) combination vaccines; 1996, vol. 174, suppl 3, p s302 - s305.
32. Juhani Eskola; et al; A Randomized; perspective field trial of a conjugate vaccine in the protection of infantes and young children against invasive *Hib* disease; *The New England Journal of Medicine*; 1990, vol. 323, No. 20, p 1381 - 1387.
33. John D. Clemens et al; Impact of *Hib* polisaccharide-Tetanus protein conjugate vaccine on responses to concurrently administres DPT vaccine; *JAMA*, 1992, vol. 267, No. 5, p 673 - 678.
34. Jussi Martsola et al; Experimental *Hib* bacteremia and endotoxemia by means of immunolimus assay; *JID*; 1991:164, p 353 - 358.
35. Killian M. Biberstein; *The Bergey's Manual of systematic Microbiology*; 1994 ; p 563.
36. Koneman; *Diagnóstico microbiológico*; 1992, p 373 - 393.
37. Lembo R. Robinet al; Diagnósstico de meningitis bacteriana en niños; *Infectología*, 1990, año 10, No. 3, p 171.
38. Lennette; *El Manual de Microbiología Clínica*; 1993; p 487 - 494.
39. L. M. T. Sterk et al; Differential binding of *Haemophilus influenzae* to human tissues by fimbriae; *JMM*. 1991, vol. 35, No. 3, p 129 - 138.

40. L. Von Alphen, et al ; Differences in subtype distribution of *Hib* from carriers in the general population and patients with meningitis; *JMM*, 1991, vol. 34, p 313 - 316.
41. Mac Faddin; Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica; 1990, p 39,188.
42. Manual de medios de cultivo, 1994; E. Merck; Darmstadt, Alemania
43. Marco Caro-Cassali et al; Enfermedad sistémica por *Hib* en el Hospital Nacional de niños, un año después de la introducción de la vacuna conjugada; *Bol Medica Hospital Infantil Mex.*; 1995, vol 52, No. 7, p 426 - 428.
44. Marcus; Introduction at Microbiology; 1993, p 391 - 395.
45. María Rosario Z. Capeding et al; Evaluation of sampling sites for detection of Upper Respiratory Tract, carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among healthy Filipino infants; *JCM*, 1995, vol. 33, No. 11, p 3077 - 3079.
46. Mair Powwel; Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*; *JMM*, 1998, vol. 27, p 81 - 87.
47. Moreno Altamirano et al; *Mycoplasma pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* en escolares de diferentes zonas de la Ciudad de México; *Bioquimia*, 1990, vol 15, No. 1, p.26- 30.
48. MRE Slack; Invasive *Haemophilus influenzae* disease, the impact of immunization; *JMM*, 1995, vol. 42, p 75 - 77.
49. N.I. Leves et al; The elucidation of novel capsular genotypes of *Hib* with the polimerase chain reaction; *JMM*, 1995, vol. 43, p 120 - 124.

50. Noticeboard; Vaccination against *Hib*; The Lancet; 1990, vol 335, p 1324 - 1329.
51. Perri F. Smit et al; Cluster of *Hib* infections in adults; JAMA, 1988, vol. 260, No. 10, p 1446 - 1449.
52. P. D.R. Johnson, S.J. Macinnes and L. Gilbert; Antibodies to *Hib* Outer-Membrane Proteins in children with epiglottitis or meningitis and in healthy controls; Infection and Immunity; 1993, vol. 61, No. 4, p 1531 - 1537.
53. Paul N. Goldwater; Effect of cefotaxime or ceftriaxona, treatment on nasopharyngeal *Hib* colonization in children; Antimicrobial agent and chemotherapy; 1995, vol 39, No. 9, p.2150- 2152.
54. Pierre Lavigne; Prevention of *Haemophilus influenzae* meningitis; The Lancet; 1994, vol. 344, p 1165.
55. P.R. Langford, A.E. Williams and E.R. Maxon; Immunization Outer-Membrane proteins of *Hib* in Infection; JGM; 1992, vol. 138, p 155 - 159.
56. R. Booy, et al; Efficacy of *Hib* conjugate vaccine PRP-T; The Lancet, 1994, vol 344, p.362- 366.
57. Robert B. Wainwright; The US Arctic investigation program infectious disease prevention and control research in Alaska; The Lancet, 1996, vol. 347, p 517 - 520.
58. Robert C. Read et al; Interaction of nontypable *Haemophilus influenzae* with human respiratory mucosa in vitro; JID, 1991, vol. 163, p 549 - 558.
59. Rudiger Van Kries et al; Preventing *Haemophilus influenzae* meningitis: Germany experience; The Lancet, 1994, vol. 344, p 469.

50. Noticeboard; Vaccination against *Hib*; The Lancet; 1990, vol 335, p 1324 - 1329.
51. Perri F. Smit et al; Cluster of *Hib* infections in adults; JAMA, 1988, vol. 260, No. 10, p 1446 - 1449.
52. P. D.R. Johnson, S.J. Macinnes and L. Gilbert; Antibodies to *Hib* Outer-Membrane Proteins in children with epiglottitis or meningitis and in healthy controls; Infection and Immunity, 1993, vol. 61, No. 4, p 1531 - 1537.
53. Paul N. Goldwater; Effect of cefotaxime or ceftriaxona, treatment on nasopharyngeal *Hib* colonization in children; Antimicrobial agent and chemotherapy; 1995, vol 39, No. 9, p.2150- 2152.
54. Pierre Lavigne; Prevention of *Haemophilus influenzae* meningitis; The Lancet, 1994, vol. 344, p 1165.
55. P.R. Langford, A.E. Williams and E.R. Maxon; Immunization Outer-Membrane proteins of *Hib* in Infection; JGM; 1992, vol. 138, p 155 - 159.
56. R. Booy, et al; Efficacy of *Hib* conjugate vaccine PRP-T, The Lancet, 1994, vol 344, p.362- 366.
57. Robert B. Wainwright; The US Arctic investigation program infectious disease prevention and control research in Alaska; The Lancet, 1996, vol. 347, p 517 - 520.
58. Robert C. Read et al; Interaction of nontypable *Haemophilus influenzae* with human respiratory mucosa in vitro; JID, 1991, vol. 163, p 549 - 558.
59. Rudiger Van Kries et al; Preventing *Haemophilus influenzae* meningitis: Germany experience; The Lancet, 1994, vol. 344, p 469.

60. S.F. Peeller et al; Provisional identification of *Haemophilus influenzae* from sputum cultures within 1 H by rapid enzyme test; JMM, 1991, vol. 35, No. 1, p 49 - 52.
61. S. Zielen et al; Efficacy of *Hib* vaccine; The Lancet, 1994, vol. 344, p 828 - 829.
62. Turk D.C.; The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*; JMM; 1984, vol. 18. No. 1, p 1 - 16.
63. Wayne, Daniels, Bioestadística, bases para el análisis de las ciencias de la salud, 1993,p 459 - 495.
64. Witton; Microbiología, 1975, p 427 - 428.
65. Zinsser et al; Microbiología; 1993, p 590 - 600.

60. S.F. Peeller et al; Provisional identification of *Haemophilus influenzae* from sputum cultures within 1 H by rapid enzyme test; JMM, 1991, vol. 35, No. 1, p 49 - 52.
61. S. Zielen et al; Efficacy of *Hib* vaccine; The Lancet, 1994, vol 344, p 828 - 829.
62. Turk D.C.; The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*; JMM; 1984, vol. 18. No 1, p 1 - 16.
63. Wayne, Daniels, Bioestadística, bases para el análisis de las ciencias de la salud, 1993, p 459 - 495.
64. Witton; Microbiología, 1975, p 427 - 428.
65. Zinsser et al; Microbiología; 1993, p 590 - 600.