



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FRECUENCIA DE Haemophilus influenzae EN  
INFECCIONES DE VIAS RESPIRATORIAS BAJAS  
EN PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE  
CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ" 1997 al 2000.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
VERONICA RODRIGUEZ GALICIA



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2005

m. 346722



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.

## JURADO ASIGNADO

### PROFESORES:

PRESIDENTE: MA. DEL CARMEN CORTÉS DECUIR

VOCAL: ANTONIO CASTILLO DURAN

SECRETARIO: EDUARDO RIVERA MARTÍNEZ

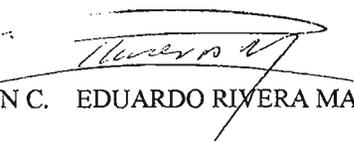
1er. SUPLENTE: ROSALBA ESQUIVEL COTE

2do. SUPLENTE: ALBERTO GÓMEZ GUTIÉRREZ

### SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE  
CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ

### ASESOR DEL TEMA:

  
M. EN C. EDUARDO RIVERA MARTÍNEZ

### SUPERVISOR TECNICO:

  
Q. F. B. MA. DEL ROSARIO VÁZQUEZ LARIOS

### SUSTENTANTE:

  
VERÓNICA RODRÍGUEZ GALICIA

“Aquello en lo cual persistimos se convierte en fácil de hacer, no porque la naturaleza de la tarea haya cambiado, sino porque nuestro poder para realizarla ha cambiado”.

Heber J. Grant.

Dedicada a los que me han dado la mejor herencia:

A mis padres,

Lydia Galicia Mancilla

y

David A. Rodríguez Gayosso

A mis hermanos:

Israel y David

Por su cariño y paciencia

A cada una de las personas que me enseñaron, ayudaron, animaron, tuvieron paciencia y tolerancia durante todo este tiempo.

Gracias.

# INDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 ANTECEDENTES	1
1.2 GENERALIDADES	4
1.2.1 MORFOLOGÍA	4
1.2.2 FISILOGÍA	5
1.3 IDENTIFICACIÓN	8
1.3.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	8
1.3.2 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE <u>Haemophilus influenzae</u>	10
1.3.3 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA	11
1.4 VÍAS DE TRASMISIÓN	19
1.5 FACTORES DE PATOGENICIDAD Y MANIFESTACIÓN CLÍNICA	21
1.6 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD	24
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	28
<b>III. HIPÓTESIS</b>	30
<b>IV. OBJETIVOS</b>	31
<b>V. PARTE EXPERIMENTAL</b>	32
a) DIAGRAMA DE FLUJO	32
b) DIAGRAMA DE FLUJO	33
5.1 MATERIAL Y MÉTODO	34
5.1.1 MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES	34
5.1.2 MEDIOS PREPARADOS EN EL LABOARTORIO	34
5.1.3 REACTIVOS	34

5.1.4 MICROSISTEMA	34
5.1.5 SENSIDISCOS	34
5.1.6 MATERIAL BIOLÓGICO	34
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	35
6.1 RECUPERACIÓN DE LAS CEPAS	35
6.1.1.1 PRUEBA PRESUNTIVA	35
6.1.1.2 PRUEBA CONFIRMATIVA	35
6.1.1.3 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD	36
6.1.1.4 SEROTIPIFICACIÓN	36
6.1.1.5 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA (CLSI)	37
<b>VII RESULTADOS</b>	38
<b>VIII DISCUSIÓN</b>	45
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	49
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	50

# I. INTRODUCCIÓN.

## 1.1 Antecedentes.

Haemophilus influenzae es un bacilo pequeño (0.2 x 0.3 a 2 µm) Gram negativo, que forma parte de la flora normal de las vías respiratorias superiores. Se han reportado diversos porcentajes para los portadores asintomático de éste microorganismo y estos varían de país a país, por ejemplo en los países industrializados el rango es de 1 a 5 % de la población y hasta más del 40 % en países en desarrollo. Dichos porcentajes están sujetos a variación incluso dentro de un mismo país, esto se debe al tipo de población y/o áreas de estudio y en general son más bajos en adultos que en niños en edad escolar. La colonización por cepas no tipificables es mucho más común. Las tasas de portación son alrededor del 60 al 90 % en los niños pequeños sanos y del 35 % en los adultos. Aproximadamente el 75 % de los niños sanos menores de cinco años de edad portan cepas no tipificables de Haemophilus influenzae en la nasofaringe en contraste con un 2 a 5 % que albergan cepas del serotipo b. De las cepas aisladas de niños cerca del 5 % son encapsuladas y la mitad de ellas son del tipo b. En los adultos solo el 0.4 % de los aislamientos corresponde al serotipo b.

La frecuencia de las infecciones invasoras se relaciona de manera inversa con la edad; solo un pequeño porcentaje ocurre en adultos y en niños mayores. Las infecciones en los dos primeros meses de vida son raras, probablemente debido a la transferencia de anticuerpos maternos. Las infecciones por Haemophilus influenzae tipo b (Hib) que ocurren con mayor frecuencia en la edad pediátrica son: meningitis, epiglotitis, artritis y neumonía. Las infecciones más frecuentes por Haemophilus influenzae no serotipificable (NT) son: otitis media, sinusitis, bronquitis crónica y neumonía. Hasta hace un tiempo se pensaba que la infección sistémica por Haemophilus influenzae era poco común en adultos, pero ahora se le reconoce cada vez con mayor frecuencia.

Las enfermedades por Haemophilus influenzae ocurren en todo el mundo y en su mayor parte son de naturaleza endémica. Las infecciones sistémicas se producen con mayor frecuencia entre personas susceptibles en familias y en centros diurnos. Los factores del huésped que parecen contribuir a este aumento de la susceptibilidad incluyen deficiencias de inmunoglobulina, drepanocitosis, esplenectomía previa e infecciones pulmonares crónicas. En el caso del adulto el alcoholismo incrementa el riesgo de neumonía por Haemophilus influenzae (Gasso et al, 1981; [http://165.158.110/spanish/huphup\\_hib\\_epideprev.htm](http://165.158.110/spanish/huphup_hib_epideprev.htm)).

La mortalidad por neumonía se estima entre 2 y 30 %, esta última cifra en pacientes hospitalizados. El diagnóstico de la neumonía adquirida en la comunidad es quizás uno de los más difíciles y solo alcanza en 40 a 60 % de los estudios incluidos en estudios prospectivos. De acuerdo con los datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en la semana 36 del 2003 se habían reportado 105, 968 casos de enfermedades infecciosas del aparato respiratorio en la República Mexicana.

En todo el mundo Streptococcus pneumoniae es el agente identificado con mayor frecuencia, responsable de un promedio de 35 % del total de los casos de neumonía adquirida en la comunidad y hasta de 50 a 65 % de aquellos en los que se logra establecer el agente causal. En el cuadro 5 se muestra los agentes causantes de neumonía adquirida en la comunidad en adultos (Soto et al, 1999).

**Cuadro 5. Principales agentes causales en casos de neumonía adquirida en la comunidad en adultos.**

Bacterias	%	Otros agentes	%*
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	50-60	<u>Mycoplasma pneumoniae</u>	10
<u>Haemophilus influenzae</u>	8-10	<u>Chlamydia pneumoniae</u>	5-10
Bacilos entéricos Gram negativos ( <u>Klebsiella sp.</u> <u>Escherichia coli</u> ).	5	<u>Legionella pneumophila</u>	5-10
<u>Staphylococcus aureus</u>	3-5	Virales (influenza)	5-10
<u>Moraxella catarrhalis</u>	1-3	Sincitial respiratorio	5-10

\*Por extrapolación de datos obtenidos en otras partes del mundo, la epidemiología de estos agentes aún no se ha estudiado de manera suficiente en México. *Enf.Infec y Microbiol* 1999; 19(6):303.

## 1.2 Generalidades.

### 1.2.1 Morfología.

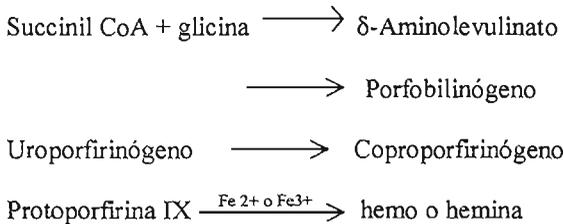
El género Haemophilus pertenece a la familia Pasteurellaceae y comprende un grupo de bacilos o cocobacilos Gram negativos pequeños no esporulados, no móviles, aerobios o anaerobios facultativos. El nombre del género proviene del griego *haemo* sangre y *philus* amor, amistad. (que ama la sangre). Crecen a temperatura óptima de 35<sup>0</sup> a 37<sup>0</sup>C y una baja presión de CO<sub>2</sub> con requerimiento exigentes para su crecimiento ( MacFaddin, 2000).

Las cepas de Haemphililus influenzae pueden ser o no capsuladas. En las primeras se pueden diferenciar seis serovares o serotipos diferentes (a - f), basándose en la estructura antigénica de los polisacáridos capsulares, demostrables por la Reacción de Quellung, (reacción de hinchazón con antisuero específico para cada tipo). En general las colonias son muy pequeñas similares a gotas de rocío y tienen apariencia áspera o rugosa. Mientras que Haemophilus influenzae encapsulado por lo general el tipo b produce colonias mucoides y brillantes. Después de 48 horas de incubación se desarrolla una umbilicación central a causa de la excreción de un polímero capsular. Las colonias mucoides a menudo se convierten espontáneamente en rugosas debido a la pérdida de la cápsula.

A pesar de que tanto las cepas capsuladas como no las capsuladas (no serotificable) pueden causar infección, las serotipo b son las responsables de más del 90 % de las enfermedades severas en los niños menores de cinco años. En el esputo o en las aspiraciones del oído, los microorganismos no serotificable a menudo se observan más alargados que los microorganismos encapsulados y pueden presentar una coloración bipolar con la tinción de Gram.

### 1.2.2 Fisiología.

Todas las especies de Haemophilus requieren uno o los dos factores de crecimiento presentes en la sangre denominados X y V (cuadro 1). El factor X termoestable es la protoforfirina IX, el precursor de la hemina que es el grupo prostético en los citocromos y en enzimas del hemo como la catalasa y la peroxidasa. Las especies no dependiente de la hemina como el Haemophilus parainfluenzae sintetizan la hemina por la vía común del detrapirrol, pero los microorganismos dependientes de la hemina han perdido la capacidad de convertir el ácido  $\delta$ -aminolevulinico en protoforfirina. Al parecer las especies hemina-dependiente carecen de todas las enzimas para la síntesis del tetrapirrol con excepción de la ferroquelatasa o hemo-sintetasa, que este presente en forma variable y que cataliza la inserción final de  $Fe^{2+}$  o  $Fe^{3+}$  en el anillo de protoporfirinas como se muestra en el siguiente esquema:



Cuando crece Haemophilus influenzae en una atmósfera de  $CO_2$  tiene un metabolismo anaerobio y no produce citocromos. Por lo tanto, el requerimiento de hemina está muy reducido si no ausente por completo.

Dado que Haemophilus parainfluenzae no requiere una fuente de hierro exógena y por eso es menos flexible en su metabolismo en condiciones de anaerobiosis continua produciendo y utilizando el sistema citocromo.

Haemophilus en un medio anaerobio utiliza nitrato como el aceptor de electrones. La única quinona producida por el Haemophilus influenzae es la dimetilmenaquinona (DMK), pero algunas especies también producen ubiquinona. Mientras que la ubiquinona es utilizada en los sistemas de transporte de electrones que conducen solo aceptores de alta potencia, como el oxígeno o el nitrato, la DMK puede ser utilizada para el transporte de electrones tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. De esta manera, la expresión de DMK le permite al Haemophilus influenzae producir energía tanto por fosforilación al nivel de sustrato como por fosforilación oxidativa (Zinsser, 1996).

El agar chocolate es el medio más utilizado para el aislamiento de la especie de Haemophilus influenzae. Para su preparación se añade sangre a la base de agar y se le calienta aproximadamente a 80 ° C hasta que tome un color marrón. El calor libera los factores X (hemina), el cual suministra los compuestos necesarios para la síntesis de citocromos, y también el factor V (nicotinamida adenina dinucleótido o NAD), que es una coenzima que participa en las reacciones de oxidorreducción del metabolismo celular en las células sanguíneas y también inactiva las enzimas que degradan al factor V sin destruir este factor (MacFaddin, 2000). Los medios de agar-sangre comunes permiten la proliferación de Haemophilus influenzae sólo cuando la placa de agar se inocula de manera cruzada con Staphylococcus aureus (prueba de satelitismo) u otro microorganismo que excrete el factor V. La proliferación en agar semisólido es evidente 18 a 24 horas después de su inoculación.

**Cuadro 1. Propiedades de las diferentes especies de Haemophilus.**

Especies	Factores requeridos		Crecimiento en CO <sub>2</sub>	Hemólisis	Acido de la D- xilosa
	V	X			
<u>Haemophilus influenzae</u>	+	+	-	-	+
<u>Haemophilus aegyptius</u>	+	+	-	-	-
<u>Haemophilus haemolyticus</u>	+	+	-	+/-	+/-
<u>Haemophilus ducreyi</u>	-	+	-	-	-
<u>Haemophilus parainfluenzae</u>	+	-	-	+	-
<u>Haemophilus parahaemolyticus</u>	+	-	-	+	-
<u>Haemophilus paraphrohaemolyticus</u>	+	-	+	-	-
<u>Haemophilus aphrophilus</u>	-	+	+	-	-
<u>Haemophilus paraphrophilus</u>	+	-	+	-	-
<u>Haemophilus segnis</u>	+	-	-	-	-

Adaptado de Killan y Biberstein. En Krieg y Holt (dir.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1 Williams & Wilkins, 1986, pág. 564.

## 1.3 IDENTIFICACIÓN.

### 1.3.1 Pruebas Bioquímicas.

Para la identificación correcta de las especies de Haemophilus se realiza una serie de pruebas bioquímicas dentro de las cuales se encuentra la fermentación de carbohidratos, la presencia de actividad enzimática y el crecimiento en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (cuadro 3).

La superficie de varias cepas de Haemophilus influenzae está cubierta por una cápsula de polisacáridos que permite clasificar serotipos antigénicos del a al f. El polisacárido tipo b es un polímero de D-ribosa-ribosil-fosfato, también conocido como PRP, es el más virulento y está asociado con infecciones sistémicas, especialmente en niños menores de 5 años. Su cápsula polisacárida es antifagocítica ( [http://165.158.110/spanish/huphup\\_hib\\_epideprev.htm](http://165.158.110/spanish/huphup_hib_epideprev.htm)). En 1976 Killan, en su estudio taxonómico del género Haemophilus estandarizó un sistema para biotificar a Haemophilus influenzae basándose en pruebas bioquímicas de indol, ureasa y ornitina descarboxilasa (cuadro 3). Killan dividió las cepas de Haemophilus influenzae en cuatro biotipos del I al IV. Estos biotipos son independientes del serotipo del microorganismo; es decir, que organismos de diferentes serotipos o cepas no serotipificable podía tener el mismo patrón de reacciones biotípicas. Mediante estas mismas pruebas se han descrito además, cuatro biotipos adicionales de Haemophilus influenzae (V, VI, VII y VIII). En forma similar se han delineado siete biotipos de Haemophilus parainfluenzae (denominados I a IV y VI a VIII) (<http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologia.php?mostrar=negativos>).

Los estudios de biotipificación sugieren que Haemophilus influenzae es bioquímicamente heterogéneo y que los factores no capsulares, con frecuencia predecibles por la biovariedad, se asocian con la virulencia. En un estudio realizado por Biberstein y cols. aislaron 157 cepas de Haemophilus influenzae en casos de meningitis el 94 % pertenecía a la biovariedad I, la cual es poco frecuente en el tracto respiratorio. Las cepas no encapsuladas que a menudo están

implicadas en la conjuntivitis, la bronquitis crónica, la sinusitis y la otitis media habitualmente pertenecen a las biovariedades II y III, las mismas que colonizan la nasofaringe de la mayoría de las personas sanas (Zinsser, 1996).

**Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para la identificación de las especies de Haemophilus.**

Microorganismos	Glucosa	Sacarosa	Lactosa	Manosa	Xilosa	ONPG
<u>Haemophilus influenzae</u>	+	-	-	-	+/-	-
<u>Haemophilus haemolyticus</u>	+	-	-	-	+/-	-
<u>Haemophilus parainfluenzae</u>	+	+	-	+	-	+/-
<u>Haemophilus parahaemolyticus</u>	+	+	-	-	-	-
<u>Haemophilus segnis</u>	D	D	-	-	-	+/-
<u>Haemophilus paraphrophilus</u>	+	+	+	+	+/-	-
<u>Haemophilus aphrophilus</u>	+	+	+	+	+/-	-
<u>Haemophilus ducreyi</u>	-	-	-	-	-	-

Adaptado de Koneman y cols. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. Panamericana 1999, pág. 375

**Cuadro 3. Pruebas para la identificación de Haemophilus influenzae.**

Biotipo	ALA	Indol	Ureasa	Ornitina dextrboxilasa	Producción de ácido a partir de:						
					*Glu	*Sac	*Lac	*Fruc	*Rib	*Xil	*Man
I	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
II	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
III	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
IV	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
V	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VI	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VII	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
VIII	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-

Adaptado de Kilian y Biberstein. En Krieg y Holt (dir.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. I Williams & Wilkins, 1986, pág. 564.

Adaptado de Koneman y cols. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. Panamericana 1999, pág. 375

\* Glu= Glucosa, Sac =Sacarosa, Lac=Lactosa, Fruc=Fructuosa, Rib=Ribosa, Xil=Xilosa, Man=manosa.

### **1.3.2 Métodos de identificación de Haemophilus influenzae.**

Los métodos que se utilizan convencionalmente para la identificación de Haemophilus influenzae, se basan en el uso de medios selectivos, enriquecidos y de requerimientos nutricionales a las pruebas bioquímicas. Una de las desventajas de este tipo de estudio es el tiempo para la identificación del microorganismo, por lo que es de gran utilidad el uso de microsistemas. Algunos de ellos son los siguientes:

Sistema RIM (Rapid Identification Method)-*Haemophilus* (Ortho Diagnostics Systems).

IDS RapID NH (RENEL).

Tarjeta “*Neisseria-Haemophilus* Identification (NHI)” (BioMeriux).

HNID (Dade/MicroScan).

Panel BBL Crystal *Neisseria/Haemophilus* ID. (BD Biosciences).

### 1.3.3 Estructura Antigénica.

*Haemophilus influenzae* contiene tres clases principales de antígenos de superficie: el polisacárido capsular, el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de la membrana externa (fig. 1).

El LPS es un componente estructural a la membrana externa, los determinantes antigénicos de superficie del LPS son los llamados somáticos o antígenos O, los cuales son los responsables de la actividad de endotoxina en las bacterias gram negativas.

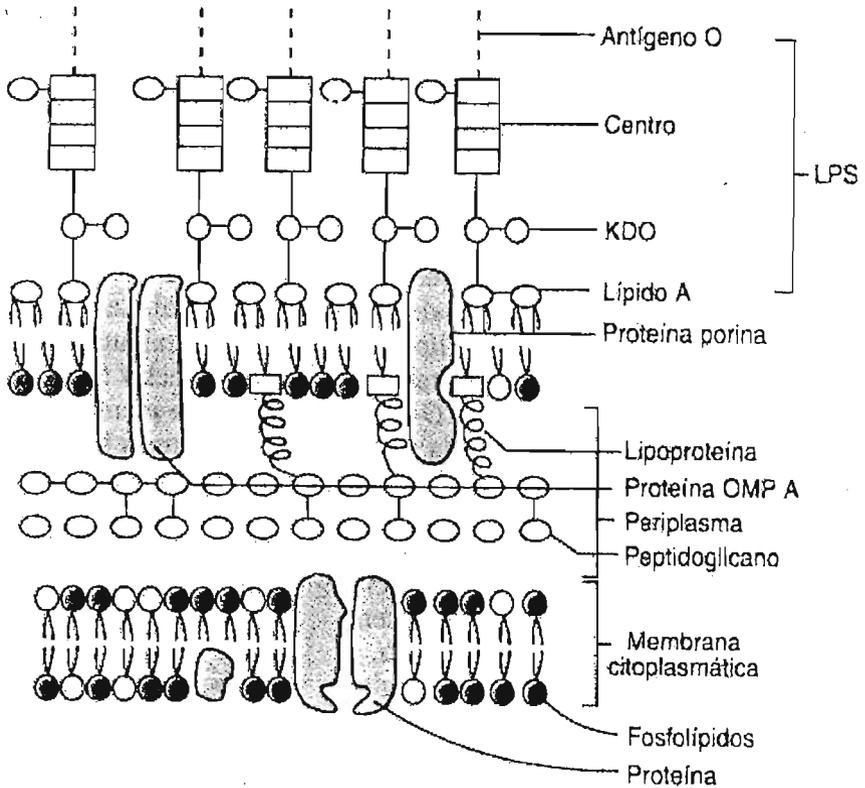


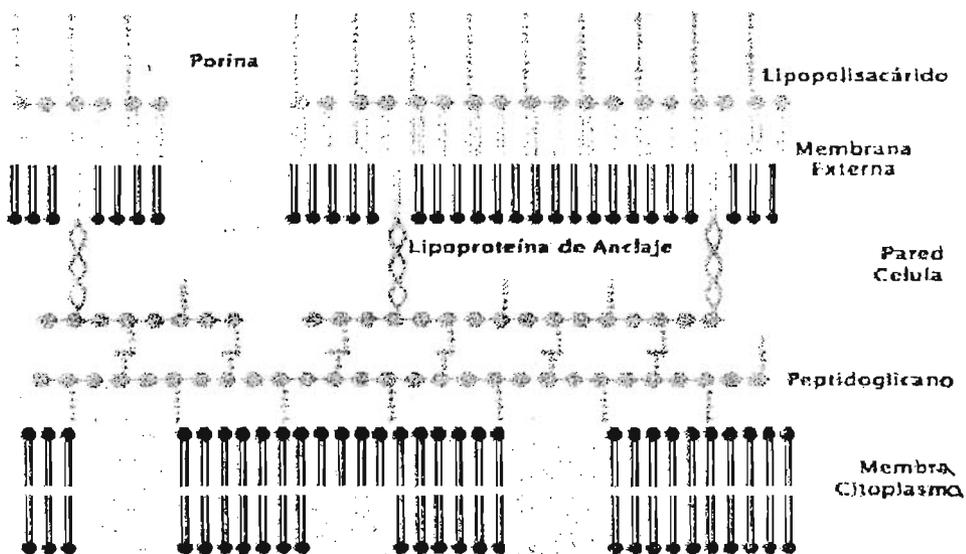
Figura 1. Esquema de una bacteria gram negativa.

Adaptado de Koneman y cols. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. Panamericana 1999, pág. 13.

Los complejos glucolípidos de las moléculas de los LPS están compuestos por una porción lipídica llamada lípido A, está se encuentra en la última capa de la membrana externa. El lípido A está compuesto por un disacárido de glucosamina y parece ser el principal responsable de las manifestaciones de la actividad endotoxica en los pacientes que presentan sepsis (fiebre, choque, colapso vascular, hemorragias). La endotoxina también puede provocar una coagulación intravascular diseminada, esto debido a la activación del complemento.

Aunque la mayoría de las cepas recuperadas de las infecciones sistemáticas pertenecen al tipo b, también se han recuperado los serotipos a, c, d, e y f (<http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologia.php?mostrar=negaravirus>).

El principal determinante antigénico del Haemophilus influenzae encapsulado es el polisacárido capsular (cuadro 4). Este polisacárido confiere la especificidad de tipo del microorganismo y es la base para el agrupamiento de los microorganismos en seis serotipos o serovares, denominadas del a al f. Los antígenos capsulares producidos por los serotipos a, b, c y f son del tipo del ácido teicoico, mientras que los serotipos d y e son polisacáridos. El polímero capsular del serotipo b es único en el sentido de que contiene los azúcares pentosa, ribosa y ribitol fosfato, en lugar de las hexosas o hexosaminas que se encuentran en los otros serotipos. Casi todas las cepas asociadas con la enfermedad invasora pertenecen al serotipo b, principal antigénico es su fracción oligosacárida no toxica. El lipooligosacárido (LOS) de Haemophilus influenzae tipo b, consiste en un solo lípido A y una estructura análoga al oligosacárido de la base química o core del lipopolisacárido (LPS) de las enterobacterias (fig. 2).



**Fig. 2. Estructura de la pared celular bacteria Gram negativa.**

Adaptado de <http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologia.php?Mostrar=negativos>.

El fundamento de la tipificación serológica de Haemophilus influenzae es una mezcla de una fracción de la bacteria de los cultivos que se han caracterizado bioquímicamente con una gota de anticuerpo. En caso de que la mezcla aglutine para el antígeno presente en el organismo, entonces se identifica el serotipo en dicho organismo.

Dentro de los métodos para serotipificar se encuentran: a) reacción de Quellung, b) la aglutinación en portaobjetos, c) aglutinación en látex, d) contrainmunolectroforesis, e) agar antisuero, f) inmunofluorescencia y coaglutinación (Grasso et al, 1981).

La substancia capsular tipo b es un polímero lineal compuesto de ribosa, ribitol (un azúcar de cinco carbonos) y fosfato, o polirribosil-ribitol-fosfato (polyribosyl-ribitol-phosphate, PRP) (figura 3), desempeña un papel importante en la patogenia de la enfermedad invasora causada por estos microorganismos.

**Cuadro 4. Polisacáridos capsulares de Haemophilus influenzae.**

Serotipo	Azúcar	PO4	Acetilo
a	Glucosa	+	-
b	Ribosa y ribitol	+	-
c	Galactosa	+	-
d	Hexosa	-	-
e	Hexosamina	-	+
f	Galactosamina	+	+

Adaptado de Zinsser, Microbiología Panamericana, Buenos Aires, 1996, pág.641.

Las infecciones sistémicas por lo regular son provocadas por cepas encapsuladas, por lo que la susceptibilidad a dichas infecciones se correlaciona en gran parte con la ausencia de anticuerpos séricos contra la cápsula del tipo b. La cápsula interfiere con los mecanismos de defensa obstaculizándola interacción entre la bacteria y las células del huésped. La carga negativa del polisacárido capsular resulta en la repulsión entre la bacteria y las células epiteliales también cargadas negativamente y en el enmascaramiento de adhesinas bacterianas, previniendo el contacto íntimo (Soja et al, 1998). Los anticuerpos contra el polisacárido capsular del tipo b pueden ser generados por la infección provocada por las bacterias que poseen antígenos de superficie que reaccionan en forma cruzada.

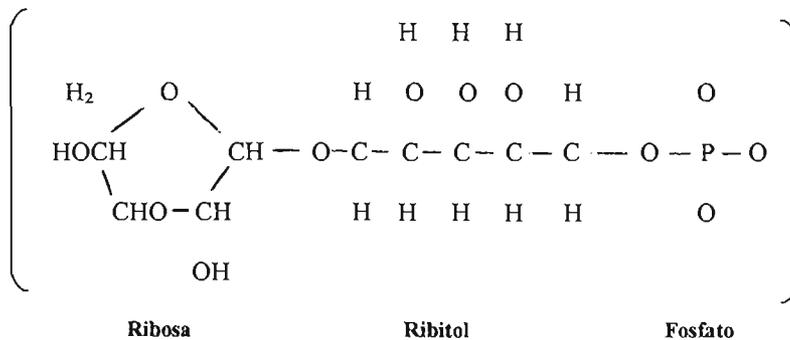


Figura 3. Estructura del polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae*. (PRP)  
 Adaptado de Koneman y cols. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. Panamericana 1999, pág. 13.

Es probable que en el género Haemophilus la virulencia sea multifactorial, entre los componentes que probablemente influyan en el proceso infeccioso se encuentran las proteínas de la membrana externa y el LOS. Cada una de estas moléculas de superficie pueden ser responsables de una función específica asociada con la virulencia, como por ejemplo la adherencia, la capacidad de invasión o la resistencia a la fagocitosis.

Haemophilus influenzae es una de las cinco especies bacterianas que se sabe que produce proteasas de IgA, son endopeptidasas neutras cuya capacidad única es de hidrolizar la cadena pesada de la IgA1 humana como único sustrato conocido. Dado que Haemophilus influenzae infecta principalmente las superficies mucosas en el ser humano, donde las defensas del huésped están mediadas por la IgA secretora.

Haemophilus influenzae es el único miembro del género que produce esta enzima, y produce tres tipos diferentes de proteasas IgA que rompe las distintas uniones peptídicas dentro de la región bisagra de la IgA. El tipo de proteasa producido se correlaciona con el serotipo del aislamiento; es decir, que las cepas no tipificables también producen uno de los tres tipos de proteasa (Zinsser, 1996). Es poco lo que se sabe acerca del papel de la adherencia del Haemophilus influenzae a las superficies epiteliales en la patogenia de la infección. No obstante, algunos estudios indican que más del 90 % de las cepas no tipificables se adhieren a las células epiteliales en la boca humana, mientras que sólo un 5 % de las cepas son del tipo b. Estas diferencias marcadas podrían contribuir a las variaciones en la colonización observadas entre las cepas de tipo b y las no tipificables. De ahí entonces que, la tendencia de las cepas no tipificables causan infecciones localizadas y las del tipo b se asocian con infección invasora. La carga negativa del polisacárido capsular resulta en la repulsión entre la bacteria y las células epiteliales también cargadas negativamente y en el enmascaramiento de adhesinas bacterianas, previniendo el contacto cercano.

(<http://www.Microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologia.php?mostrar=negativos>).

Las fimbrias son adhesinas bacterianas, las cuales, por su estructura fina y larga, abaten la repulsión electrostática y el enmascaramiento que provoca la cápsula. Generalmente las cepas aisladas de la nasofaringe tienen fimbrias, mientras que las cepas aisladas de la sangre o del líquido cefalorraquídeo (LCR) no son fimbriadas (García et al, 2002).

Se ha demostrado que las fimbrias median la adherencia a células epiteliales orofaríngeas, eritrocitos, células epiteliales bucales, células del epitelio respiratorio y levaduras; se distribuyen de manera homogénea sobre la superficie del microorganismo (Wilson et al, 1999; Finegold, 1970; Falla et al, 1993).

Se han identificado adhesinas no fimbriales en Haemophilus influenzae no tipificables designadas como proteína HMW1 y proteína HMW2, una segunda familia de proteínas de alta masa molecular (104kDa); las dos primeras son homólogas parcialmente y están relacionadas antigénicamente con las hemaglutininas filamentosas de Bordetella pertussis, que es un factor de colonización, estas adhesinas median la unión a diferentes células epiteliales humanas (Falla et al, 1993; Jongensen, 1992).

Barekamp et al en 1996, descubrieron una familia de proteínas de alta masa molecular que denominaron HMW1-HMW2 *like* de 114 kDa y están codificadas por el gen *hia*; se expresan en cepas no tipificables de Haemophilus influenzae.

Sirakova et al, 1994 y St Geme III et al, 1996, encontraron fimbriillas de superficie, finas y cortas, de sólo 50nm de longitud, al examinar Haemophilus influenzae por microscopia electrónica de transmisión, que son distintas de las fimbrias y tienen especificidad de unión celular diferente.

También hallaron que en la adherencia por fimbriillas influye la capsulación (Heelan et al, 1992;

Las adhesinas fimbriales y las no fimbriales de Haemophilu influenzae median el tropismo tisular, pero difieren en especificidad. La adherencia mediada por fimbrias ocurre en células del

epitelio columnar pseudoestratificado y ciliado, pero no en células cúbicas o escamosas y se relaciona con la habilidad de Haemophilus influenzae para colonizar o causar infección en los tejidos u órganos con esos tipos de células (Mendelaman et al, 1984 ).

Una característica funcional aparentemente importante en el desarrollo de la enfermedad por Haemophilus influenzae es la variación de la fimbria. Durante la infección natural, las cepas de origen nasofaríngeo son frecuentemente fimbriadas, mientras que su contraparte isogénica de sitios sistémicos no tienen fimbria (Mendelman et al, 1986).

La unión a células sanguíneas mediada por fimbrias puede incrementar la eliminación de la bacteria en la circulación sanguínea (Dealofeu et al, 1994).

#### 1.4 VIAS DE TRANSMISIÓN.

La infección por Haemophilus influenzae ocurre después de la inhalación de secreciones orales (estornudos). Se desconocen los factores que influyen en la eficacia de la transmisión y la habilidad de colonización, por lo general un periodo largo, con una colonización de las mucosas respiratorias es la regla para la posterior enfermedad invasiva. Durante su colonización sintomática en la nasofaringe, Haemophilus influenzae se adapta a su microambiente, se multiplica e inhibe el movimiento mucociliar y evade los mecanismos de defensa del huésped. Estudios morfológicos sobre cultivos de pólipos nasales y adenoides de origen humano infectados experimentalmente con Haemophilus influenzae han relevado que este microorganismo es atrapado por el moco. Este hecho previene que se elimine por los mecanismos de defensa, ya que el moco es una barrera de difusión para solutos y es impermeable por las células de defensa del huésped; además, los productos bacterianos provocan la hiperplasia de glándulas productoras de moco y estimulan su producción, lo cual es una característica de las infecciones de pacientes con bronquitis crónica en donde los bronquios se ven comprometidos por la colonización de Haemophilus influenzae.

La diseminación de las bacterias de la nasofaringe al resto del aparato respiratorio ocurre con frecuencia. El crecimiento persistente de Haemophilus influenzae resulta en la colonización del epitelio de la nasofaringe, lo cual produce una reacción inflamatoria en el tejido (fig. 4). El portador asintomático puede desarrollar infección en el aparato respiratorio, que puede traducirse en daño al epitelio, permitiendo a la bacteria alcanzar la submucosa y finalmente el torrente sanguíneo.

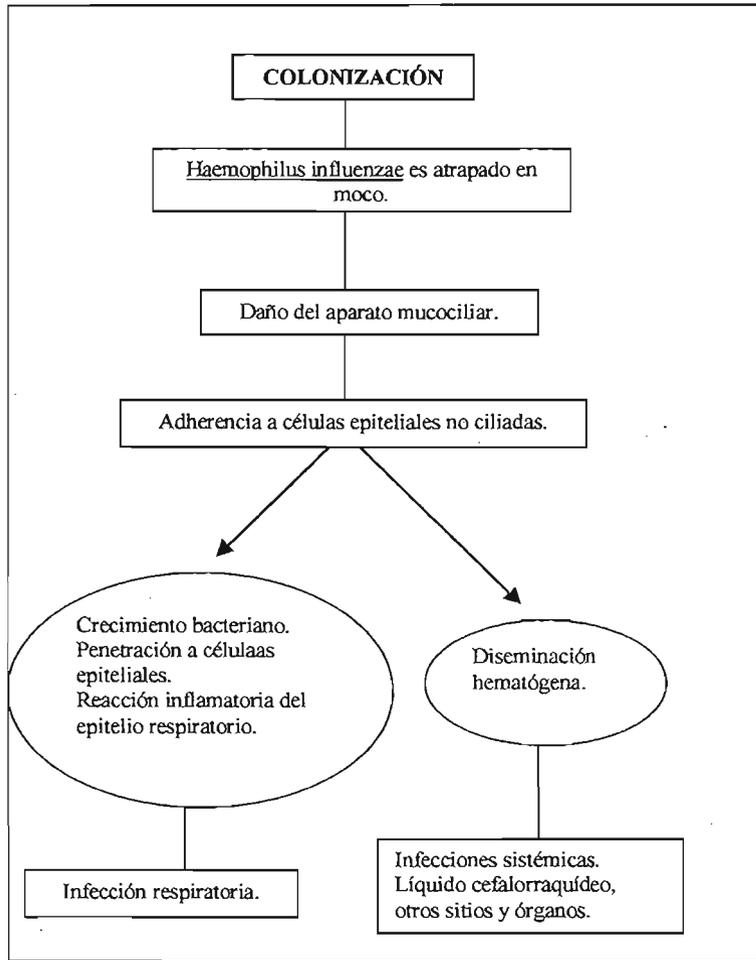


Figura 4. Fenómeno fisiopatológico de la infección por Haemophilus influenzae tipo b. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 1998;18(2):64

## 1.5 FACTORES DE PATOGENICIDAD Y MANIFESTACIÓN CLÍNICA.

La multiplicación de las bacterias estimula al huésped a desarrollar una respuesta inflamatoria. Si esta respuesta es deficiente las bacterias continúan con la colonización, un gran número de neutrófilos llega al árbol bronquial, lo que conlleva a que la respuesta inflamatoria se vuelva crónica (Sosa et al, 1998). Durante esta reacción inflamatoria, el epitelio respiratorio y el endotelio vascular se vuelven permeables, permitiendo así que los factores como las inmunoglobulinas y el complemento entren en las vías respiratorias desde la circulación sanguínea, potenciando de esta forma a la respuesta inflamatoria.

Durante la fagocitosis de las bacterias por los neutrófilos, una cantidad pequeña de enzimas (proteasas, como la elastasa) sale del neutrófilo. En el pulmón normal existe una antiproteinasa (O-1-antitripsina), que neutraliza las enzimas proteasas. Dichas enzimas libres pueden producir una lesión en el epitelio respiratorio. Por lo que, la infección de las vías respiratorias persiste y puede producirse una lesión del tejido respiratorio directamente por los productos bacterianos, y de forma indirecta por la inflamación crónica. Esta lesión causa un deterioro posterior en las defensas del huésped y puede producirse un círculo vicioso (fig.5) que induce una progresión insidiosa de la enfermedad respiratoria (Wilson R, 1992).

La infección bacteriana lleva a un aumento de la producción del moco, a una disminución del movimiento ciliar y a la lesión del epitelio respiratorio. En pacientes con infecciones frecuentes, los bronquios se engrosan y cicatrizan, por lo que reciben un aporte menor de irrigación y hay un contenido mayor de secreción purulenta con millones de bacterias. Con frecuencia, Haemophilus influenzae y Moraxella catarrhalis producen enzimas  $\beta$ -lactamasas que se encuentran en el moco y neutralizan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (ampicilina, amoxicilina). La producción de estas enzimas por una especie de bacteria puede proteger a otra especie implicada

en la infección, a este fenómeno se le llama patogenicidad indirecta, debido a la transmisión del gen  $\beta$ -lactamasa.

Haemophilus influenzae es responsable de aproximadamente el 20 % de las bacteremias que ocurren en los niños febriles sin ninguna evidencia de enfermedad local. Los niños de entre 6 a 36 meses que ha sido sometidos a una esplenectomía (extirpación total o parcial del bazo) son particularmente más susceptibles. También puede presentarse en adultos con enfermedades neoplásicas que reciben quimioterapia. El curso clínico puede progresar hacia choque séptico y a menudo a la muerte a las pocas horas de la evaluación médica inicial.

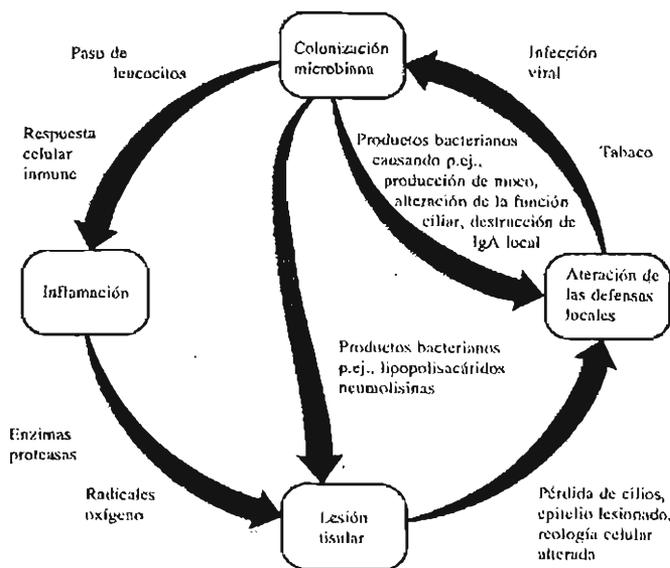


Figura 5. Ciclo de las lesiones mediadas por bacterias y lesiones inflamatorias por el huésped, provocadas por las bacterias, que pueden desarrollarse durante las infecciones de las vías aéreas. Según Cole y Wilson (Wilson R, 1992; Cole et al, 1989).

Haemophilus influenzae tipo b es una causa común de piartrosis (pus en una cavidad articular) en la niñez y se asocia con pericarditis (inflamación del pericardio), en general como parte de un episodio neumónico. Casi todos los casos de neumonía por Haemophilus influenzae se deben al tipo b y ocurren en niños muy pequeños. En los adultos la neumonía se desarrolla con mayor frecuencia en personas ancianas con enfermedad pulmonar, alcoholismo o inmunodeficiencia, aunque no están exentos los individuos previamente sanos.

## 1.6 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana.

El papel principal del personal del laboratorio de microbiología clínica es proporcionar información con la que el médico pueda diagnosticar y tratar las enfermedades infecciosas, las dos piezas más importantes para esta información son: a) el agente causal y b) el antimicrobiano que puede proporcionar la terapéutica adecuada. Una de las escuelas de mayor influencia en el área de evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana es la Americana, que cuenta con la Norma editada anualmente por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) antes llamado National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), un elemento importante que establece que antibióticos deben ser evaluados y los rangos de interpretación para cada bacteria. Con ello se asegura un estudio completo y racional de la susceptibilidad al antibiótico. Sin embargo, debemos recordar que el reporte de la sensibilidad a algunos antibióticos puede inducir el uso indiscriminado de estos. Por ello, si bien la evaluación de todos los antibióticos es necesaria, el reporte de todos o solo algunos de ellos, es decisión de cada hospital, basándose en las estrategias de control y uso racional de los mismos. Considerando estos aspectos preliminares, es necesario desarrollar programas de vigilancia de la resistencia antimicrobiana, pero es fundamental asegurar la calidad de los resultados de laboratorio.

El problema de la resistencia que presentan las bacterias a los antimicrobianos es mundial (Bessu, 1991). Esta resistencia a los antimicrobianos es el resultado de varios factores, dentro de las cuales está el uso indiscriminado del antimicrobiano tanto por prescripción médica como por automedicación. En muchos casos no se completa el esquema, y estos son insuficientes para erradicar los agentes infecciosos pero con un efecto que daña el equilibrio sobre la flora normal de las mucosas y el tracto gastrointestinal (Soto et al, 1999).

Debido a la gran variabilidad de la sensibilidad a los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de las infecciones producidas por Haemophilus influenzae, es necesario el

conocimiento exacto de su sensibilidad y la prevalencia de cepas resistentes en los diferentes países y comunidades del país en donde se realice el estudio, para poder prescribir adecuadamente al paciente y evitar el surgimiento de cepas resistentes. En los años 60 las infecciones por Haemophilus influenzae eran tratadas empíricamente con ampicilina; sin embargo, a partir de 1970 en Europa y EUA se detectaron cepas resistentes a ampicilina. En los últimos años, se ha encontrado resistencia a la ampicilina, es mediada por la  $\beta$ -lactamasa producida por los plásmidos tanto en aislamientos capsulados tipo no b, como en cepas no serotificables de Haemophilus influenzae. La mayoría de las cepas resistentes producen solo una de clase de enzima: una  $\beta$ -lactamasa tipo TEM-1 y con menos frecuencia ROB-1. Las  $\beta$ -lactamasas mediadas por plásmidos son principalmente de los tipos TEM y SHV (Oguri et al, 2002).

El primer aislamiento documentado de ampicilina resistente fue en el año de 1972 en Europa y en los EUA en los años 1973-1974 en cepas de Haemophilus influenzae tipo b. Doern et al, demostraron una prevalencia del 15.2% para la producción de  $\beta$ -lactamasa en Haemophilus influenzae en una población de niños y adultos. La frecuencia de degradación enzimática de la ampicilina fue del 21% para las cepas capsuladas de Haemophilus influenzae tipo b y del 12% para las cepas no capsuladas. La resistencia intrínseca a la ampicilina no mediada por  $\beta$ -lactamasa, se detectó en solo el 0.1% de las cepas.

En los últimos años, se han encontrado resistencia a la ampicilina mediada por la  $\beta$ -lactamasa producidas por plásmidos tanto en aislamientos capsulados de otros tipos a excepción del b, como en cepas no serotificables de Haemophilus influenzae.

La frecuencia de degradación enzimática de la ampicilina fue del 21% para las cepas capsuladas de Haemophilus influenzae tipo b y del 12% para las cepas no capsuladas. La resistencia

intrínseca a la ampicilina no mediada por  $\beta$ -lactamasa, se detectó en solo el 0.1% de las cepas. Además, de la producción de la  $\beta$ -lactamasa, se ha aislado cepas de Haemophilus influenzae que son resistentes a la ampicilina pero no producen  $\beta$ -lactamasa, son cepas  $\beta$ -lactamasa negativa ampicilina resistente (BLNAR), los dos posibles mecanismos de resistencia de estas cepas son: a) la resistencia mediante la producción de  $\beta$ -lactamasa TEM-1 o ROB-1 y b) por una alteración de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) relacionada a la síntesis de peptidoglucano. Otras cepas de Haemophilus influenzae que también se han aislado son las  $\beta$ -lactamasa positiva amoxicilina resistente (BLPACR). El papel de la  $\beta$ -lactamasa y la alteración de las proteínas de unión a penicilina en la infección es el desarrollo de la resistencia a la amoxicilina y amoxicilina/clavulanato en cepas de Haemophilus influenzae (Seki et al, 1999).

Las cefalosporinas de primera generación son poco eficaces contra Haemophilus influenzae, las cefalosporinas de segunda generación, como el cefamandol y la cefuroxima, son eficaces y no se han reportado cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación, siendo que las ceftriaxona presenta la mejor actividad. Dentro del grupo de los macrólidos y quinolonas, la sensibilidad antimicrobiana va desde un 31% hasta un 94% y 99% respectivamente.

En el caso de trimetoprim/sulfametoxazol presenta una sensibilidad antimicrobiana que va desde un 47.9% hasta el 90%.

En México, hay pocos reportes de sensibilidad antimicrobiana; dos de ellos realizados en 1981. En el primero solo se reportó 14% de resistencia a ampicilina; y en el segundo se reporta 26.8% de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa, un 76% de sensibilidad a ampicilina y un 95% a cotrimoxazol. En el estudio realizado por Alexander Project durante el periodo de 1996 a 1997 reporta un 25% de producción de  $\beta$ -lactamasa y 25% de resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las infecciones de las vías respiratorias bajas son la causa más importante de mortalidad en todo el mundo por tener dos consecuencias: a) Infección bronquial crónica y b) neumonía comunitaria.

La neumonía es una infección de los pulmones durante la cual la proliferación de microorganismos en los alvéolos estimula una respuesta inflamatoria y propicia el daño o la destrucción de los tejidos pulmonares. A diferencia de la neumonía, la infección bronquial suele producirse en el marco de una disminución en las defensas de las vías respiratorias bajas y solamente un reducido número de especies bacterianas suelen asociarse a la infección bronquial, que suelen formar parte de la flora normal en el huésped. Todo lo anterior crea condiciones permisivas, dando lugar a la diseminación de las bacterias en nasofaringe y vías respiratorias altas.

Haemophilus influenzae es la especie con gran importancia en salud pública como agente patógeno en el humano. Haemophilus influenzae no serotificable constituye alrededor del 70 % de los aislados de pacientes con exacerbaciones infecciosas pulmonares crónicas; seguido de otras bacterias como Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae y otras especies de Haemophilus ( Wilson et al, 1992).

Haemophilus influenzae fue aislado por primera vez por Pfeiffer durante la pandemia de influenza 1892. Donde su presencia en la nasofaringe de los pacientes con influenza y en los cultivos de pulmón postmortem condujo a la suposición errónea de que era el agente etiológico; de ahí su designación del bacilo de la influenza.

Se estima que anualmente, a nivel mundial al menos 3 millones de casos serios de enfermedad son provocados por Haemophilus influenzae tipo b, con una mortalidad entre 380,000 y 700,000 en niños menores de cinco años, a pesar de que en la actualidad se cuenta con antibióticos

potentes y métodos de diagnóstico más precisos para la identificación del agente causal. Es por esto, que el presente trabajo tiene por objeto la identificación, serotipificación de Haemophilus influenzae de las cepas aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH) con infecciones en vías respiratorias bajas, así como determinar el perfil de susceptibilidad.

### **III. HIPÓTESIS.**

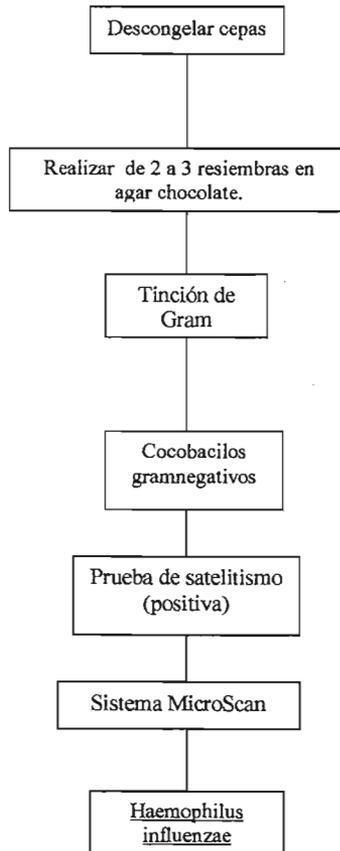
- ◆ El serotipo que se presenta con mayor frecuencia es no serotificable más que el serotipo b.
- ◆ El biotipo más frecuente es el II.
- ◆ Las cepas aisladas son productoras de  $\beta$ -lactamasa.
- ◆ Las cepas aisladas son susceptibles a la mayoría de los antibacterianos seleccionados.

#### IV. OBJETIVOS

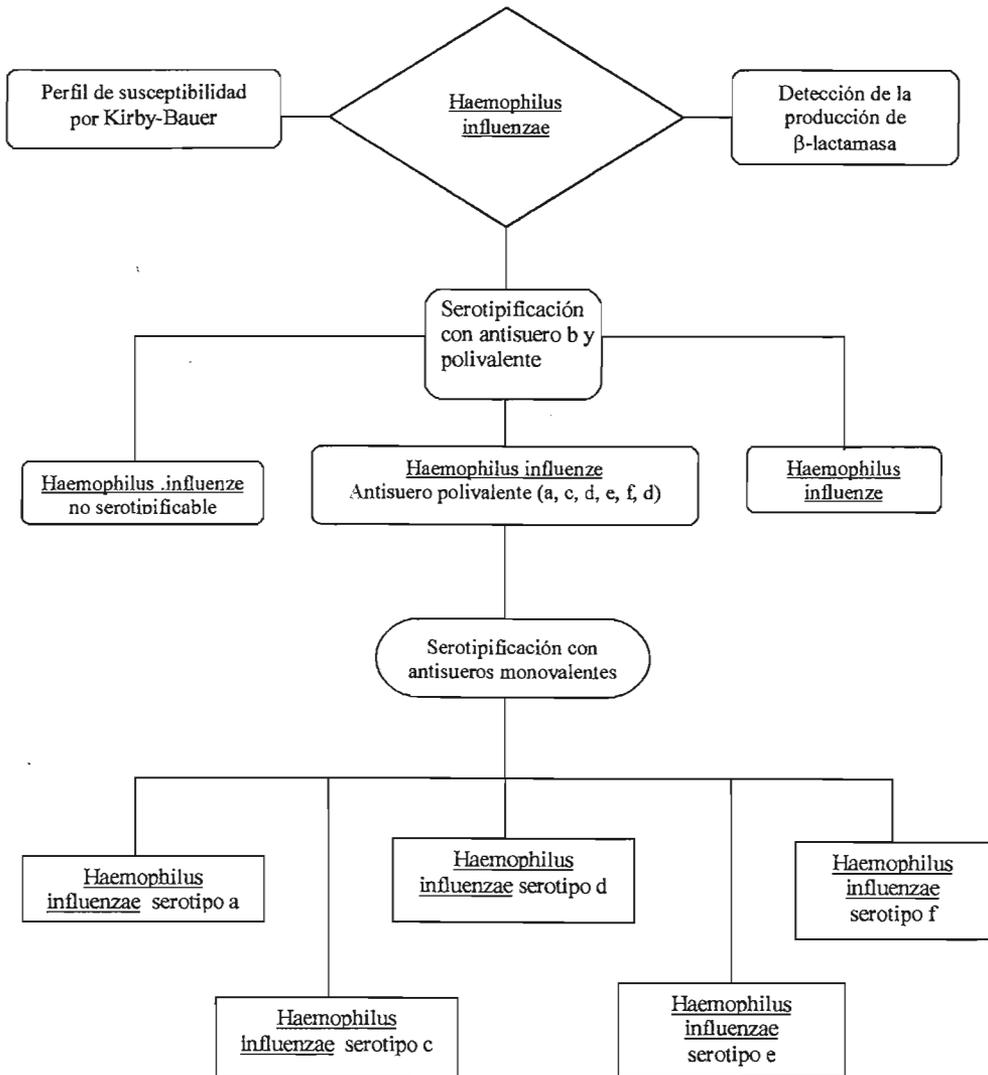
- ◆ Determinar los principales serotipos y biotipos de Haemophilus influenzae presentes en las cepas aisladas .
- ◆ Determinar la producción de  $\beta$ -lactamasa en las cepas aisladas y su influencia en la susceptibilidad en los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de Haemophilus influenzae.
- ◆ Determinar el perfil de susceptibilidad de los agentes antimicrobianos seleccionados para Haemophilus influenzae.

## V. PARTE EXPERIMENTAL.

### a) Diagrama de flujo.



b) Diagrama de flujo



## **5.1 MATERIAL Y METODO.**

### **5.1.1 Medios de cultivo comerciales ( BBL Becton Dickinson).**

Agar gelosa chocolate.

Agar gelosa sangre.

Agar HTM

### **5.1.2 Medios preparados en laboratorio.**

Caldo de Mueller –Hinton. (Becton Dickinson)

### **5.1.3 Reactivos.**

Colorantes para la tinción de Gram. (BBL Becton Dickinson).

Antisueros monovalentes (DIFCO)

Antisueros polivalentes (Phadebact Diagnostic Boule)

Discos de cefinase, para la detección de  $\beta$  - lactamasa (Becton Dickinson BBL)

### **5.1.4 Microsistema. (DADE BEHRING).**

Placas de HNID panel.

Equipo lector.

Reactivos adicionales.

### **5.1.5 Sensidiscos (Becton Dickinson BBL)**

Amoxi/clavulanato (AMC 30  $\mu$ g)

Ampicilina (AMP 10  $\mu$ g)

Cefuroxime (CXM 30  $\mu$ g)

Ceftriaxona (CRO 30  $\mu$ g)

Claritromicina (CLR 15  $\mu$ g)

Levofloxacin (LVX 5  $\mu$ g)

### 5.1.6 Material biológico.

- ◆ 250 cepas de Haemophilus influenzae, aisladas durante el período comprendido entre los meses de diciembre 1997 y diciembre del 2000; de pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, cuyas edades variaron de 1 mes de nacido hasta 94 años. Estos pacientes presentaron infecciones en vías respiratorias bajas.
- ◆ Cepas ATCC ( American Type Culture Collection):
  1. 10211 Haemophilus influenzae, como control de crecimiento.
  2. 49766 Haemophilus influenzae, como control de calidad en prueba de susceptibilidad (cefalor y cefuroxima).
  3. 49247 Haemophilus influenzae, como control de calidad en prueba de susceptibilidad a antibioticos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ceftriaxona, claritromicina, trimetropim/sulfametoxazol).
  4. 10211 Haemophilus influenzae, para control de β-lactamasa negativa. Control de crecimiento del medio HTM.
  5. 43163 Haemophilus influenzae para control de β-lactamasa positiva; control de crecimiento del medio HTM.
  6. 29213 Staphylococcus aureus para prueba de satelitismo.

## **VI. METODOLOGIA**

### **6.1 Recuperación de cepas.**

1. Se descongelaron las cepas de estudio a temperatura ambiente y se sembró en agar chocolate.
2. Se resembraron 2 y 3 veces, con el fin de que cada una de las cepas estuviera viables y para expresar su metabolismo bioquímico y su patrón de susceptibilidad antimicrobiana que tenían antes de ser conservadas en congelación.

#### **6.1.1 IDENTIFICACION**

##### **6.1.1.1 Presuntiva.**

Las cepas se identificaron como Haemophilus en base a sus características morfológicas en las placas de agar chocolate.

- ◆ Se realizaron tinción de Gram y se observaron Cocobacilos pleomórficos Gram negativos.
- ◆ Prueba de satelitismo: Se sembró por aislamiento cada una de las cepas en estudio de Haemophilus en una placa de agar sangre, usando un asa de inoculación se hizo una sola estría con la cepa de Staphylococcus aureus ATCC 29213.

La prueba se considera positiva si hay crecimiento en la región cercana al crecimiento de Staphylococcus aureus.

##### **6.1.1.2 Prueba confirmativa.**

- ◆ Microsistema (MicroScan). Biotipificación.

Se realizó conforme especificaciones de la marca comercial.

### **6.1.1.3 Pruebas de susceptibilidad.**

Prueba de determinación de la  $\beta$ -lactamasa.

◆ Microscan. Se realizó conforme a las especificaciones de la casa comercial.

◆ Disco de cefinase:

1. Se colocó un disco de cefinase en un portaobjeto.
2. Se humedeció el disco con una gota de agua estéril.
3. Con un aplicador estéril se tomo una colonia y se extendió en la superficie del disco.

Se observa sobre la superficie del disco una coloración roja; la cual indica la presencia de la enzima  $\beta$ -lactamasa.

### **6.1.1.4 Serotipificación.**

1. Se identificó el portaobjetos con el número de la cepa.
2. Se colocó una gota (aprox. 200 $\mu$ L) de cada antisuero (polivalente y monovalente a-f) y una gota de solución salina al 0.45 % de modo que sirvió como control negativo.
3. Se agregó una gota de una suspensión de la cepa hecha en solución salina a cada gota de antisuero.
4. Con la ayuda de un aplicador de madera se homogenizó la muestra.
5. Se mezcló e interpretó resultados después de 1 minuto.

La prueba se considera positiva si hay aglutinación en uno de los antisueros.

**6.1.1.5 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en agar (Kirby Bauer, de acuerdo especificación de Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)).**

1. Se tomaron de 4 a 5 colonias de una placa de agar chocolate con un cultivo puro de 18 a 24 hrs. Se transfirieron a un tubo con caldo de Mueller-Hinton, y se ajustó la turbidez a 0.5 de la escala de MacFarland. Se agito el tubo para resuspender totalmente las colonias.
2. Se sumergió un hisopo de algodón estéril, en la suspensión de inóculo y se rotó varias veces, ejerciendo una presión firme sobre las paredes internas del tubo para quitar el exceso del líquido.
3. Se inóculó en tres direcciones la superficie seca de la placa de agar HTM, a temperatura ambiente. Se esperaron de 3 a 5 minutos, para que la superficie del agar se secase, antes de colocar los discos de antimicrobianos.
4. Se colocaron los discos impregnados con el antimicrobiano adecuado sobre la superficie del agar mediante una pinza o dispensador multidisco. Se presionaron con suavidad los discos sobre el agar para permitir un contacto uniforme, por que parte del antimicrobiano difunde casi inmediatamente.
5. Se invirtieron e incubaron las placas a una temperatura de 35 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> por un tiempo de 16 a 18 hrs.
6. Se leyó el diámetro de inhibición para cada antimicrobiano y se interpretó de acuerdo a las tablas CLSI.

## VII. RESULTADOS.

De las 250 cepas aisladas de Haemophilus influenzae: el 24.0 % (60 cepas) correspondió al grupo de menores de 2 años, seguido de un 21.2 % de los pacientes mayores de 61 años, 17.2 % (43) para el grupo de 46 a 60 años, 12 % para las edades de 31 a 45 años, 7.2 % (17) para las edades de 17 a 30 años, 9.6 % (24) para el grupo de 6 a 12 años, 6.8 % (17) grupo de 3 a 5 años y sólo el 2 % (5) para el grupo de 13 a 16 años (ver gráfica 1). El 16 % (40) de las cepas estudiadas correspondió a cepas colonizantes y el 84 % (210) fueron cepas infectantes.

La distribución de los biotipos y serotipos se presenta en la tabla 1. Como se puede observar se encontró una mayor frecuencia de cepas no tipificables (78.8 %) con respecto a las tipificables (21.2%). En el caso de los biotipos se obtuvo un mayor porcentaje en el biotipo II (33.2 %), seguido por el biotipo III ( 30.8 %), un 23.2 % biotipo I, para los biotipos IV y VII un 3.6 %, biotipos V y VI un 2.8 %. También se observó en este estudio la ausencia de cepas con los serotipos a, c, d y e.

El 19.6 % (49) del total de las muestras aisladas fueron cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa y el 80.4 % correspondió a las no productoras de  $\beta$ -lactamasa (Tablas 2 y 3). El biotipo que resultó con mayor producción de  $\beta$ -lactamasa fue el biotipo II con un 7.6 % (19), mientras que el productor más bajo fue el biotipo V con el 0.4 % (1). No se encontró ninguna cepa productora de  $\beta$ -lactamasa del biotipo VI. Para las cepas no productoras de  $\beta$ -lactamasa el biotipo III presentó un 26 % y los biotipos VI y VII un 2.4 % (Tabla 2).

Así mismo, se realizó la asociación de los serotipos con la producción de  $\beta$ -lactamasa (tabla 3) observándose una mayor incidencia fue el no serotipificable (13.6 %) seguido por el serotipo b con 4.8 % (12) y solo el 12 % para el serotipo f, con respecto a las no productoras de  $\beta$ -lactamasa también las no serotipificables son las que presentaron un porcentaje mayor ( 64.8 %),

seguido por el 13.6 % que correspondió al serotipo b y el 2 % serotipo f. No se obtuvo serotipos a, c, d y e, con la producción o no de la  $\beta$ -lactamasa.

En la gráfica 2 se muestra la sensibilidad antimicrobiana presentada para los siete agentes utilizados en este estudio y se observó que la levofloxacina es la que presentó el 100 % de sensibilidad, seguida por ceftriaxona con 98 %, cefuroxime con 93.2 % y claritromicina con 90.4 %, los que presentaron una menor sensibilidad fueron la ampicilina y el trimetropim/sulfametoxazol con 86 y 56 % respectivamente. En la tabla 4 se muestra la relación entre la actividad antimicrobiana y los biotipos. Los porcentajes de mayor sensibilidad encontrada con respecto a los biotipos fueron: para el biotipo I: levofloxacina (23.2 %), amoxi/clavulanato (23.2 %) y ceftriaxona (23.2 %), biotipo II: 33.2 % (83) levofloxacina, 30.4 % (76) cefuroxime, 29.6 % (74) claritromicina, biotipo III 30.8 % (77) levofloxacina, biotipo IV: 3.6 % (9) levofloxacina, trimetropim/sulfametoxazol (3.6 %), cefuroxime (3.6 %), ceftriaxona (3.6 %) y amoxi/clavulanato (3.6 %), biotipo V: 3.2 % (8) claritromicina, levofloxacina, ampicilina, cefuroxime, ceftriaxona, amoxi/clavulanato, biotipo VI 2.4 % (6) para cada uno de los siguientes antimicrobianos: claritromicina, levofloxacina, ampicilina, cefuroxime, ceftriaxona, amoxi/clavulanato, biotipo VII 3.6 % (9) levofloxacina, cefuroxime, ceftriaxona.

La tabla 5 muestra la relación entre antimicrobianos y el serotipo; se observó que para la cepas no serotificables los agentes antimicrobianos que presentaron mayor sensibilidad antimicrobiana fueron: la levofloxacina (100 %), seguida por ampicilina (78 %) y ceftriaxona (76.8 %), para el serotipo b: levofloxacina y ceftriaxona (18.4 %), cefuroxima y amoxi/clavulanato (17.2 %) y claritromicina (16.8 %) y para el biotipo f: levofloxacina(2.8 %), cefuroxime(2.8 %), ceftriaxona (2.8 %), amoxi/clavulanato(2.8 %) y claritromicina (2.4 %).

En la tabla 6 se muestra la relación de la producción y no producción de la  $\beta$ -lactamasa y la sensibilidad de las cepas frente a los agentes antimicrobianos, cabe señalar que el agente antimicrobiano que presentó una mayor sensibilidad fue la levofloxacin con un 19.6 % con producción de  $\beta$ -lactamasa y 100% sin la producción de dicha enzima. Los dos agentes antimicrobianos que en general presentaron una mayor resistencia fueron: ampicilina (14 %) con la producción de la  $\beta$ -lactamasa y trimetropim/sulfametoxazol (31.6 %) sin la producción de la  $\beta$ -lactamasa.

Gráfica 1. Distribución de edades de pacientes con aislamiento de cepas de H. influenzae.

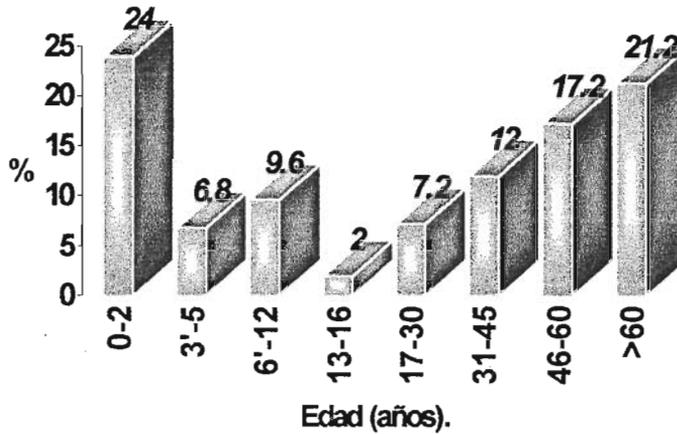


Tabla 1. Distribución de biotipos por serotipos.

Serotipo	Biotipo n(%)							TOTAL n(%)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
a, c-e	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0(0)
b	18(7.2)	13(5.2)	12(4.8)	1(0.4)	0(0)	1(0.4)	1(0.4)	46(18.4)
f	5(2)	2(0.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7(2.8)
No tipificable	35(14)	68(27.2)	65(26)	8(3.2)	7(2.8)	6(2.4)	8(3)	197(78.8)
<b>TOTAL</b>	<b>58(23.2)</b>	<b>83(33.2)</b>	<b>77(30.8)</b>	<b>9(3.6)</b>	<b>7(2.8)</b>	<b>7(2.8)</b>	<b>9(3.6)</b>	<b>250(100)</b>

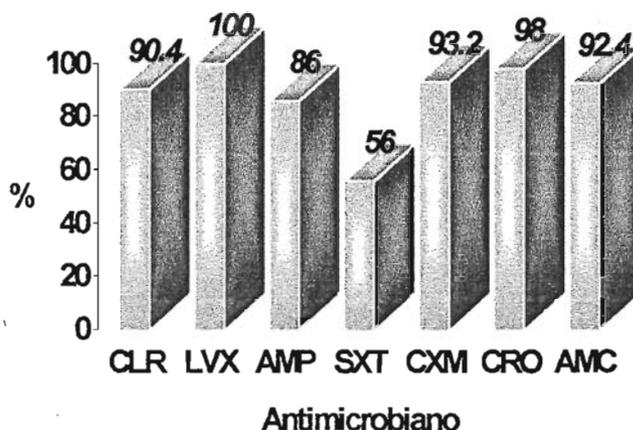
**Tabla 2. Asociación de los biotipos con la producción de  $\beta$ -lactamasa**

$\beta$ -lactamasa	Biotipo n(%)							TOTAL n(%)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Positiva	13(5.2)	19(7.6)	12(4.8)	1(0.4)	1(0.4)	0(0)	3(1.2)	49(19.6)
Negativa	45(18)	64(25.6)	65(26)	9(4)	7(2.8)	6(2.4)	6(2.4)	202(80.4)
<b>TOTAL</b>	<b>58(23.2)</b>	<b>83(33.2)</b>	<b>77(30.8)</b>	<b>10(4)</b>	<b>8(3.2)</b>	<b>6(2.4)</b>	<b>9(3.6)</b>	<b>250(100)</b>

**Tabla 3. Relación de los serotipos con la producción de  $\beta$ -lactamasa.**

Serotipo	$\beta$ -lactamasa n (%)		TOTAL n (%)
	Positiva	Negativa	
a, c-e	0 (0)	0 (0)	0 (0)
b	12 (4.8)	34 (13.6)	46 (18.4)
f	3(1.2)	5 (2)	8 (3.2)
No serotipificable	34 (13.6)	162 (64.8)	196 (78.4)
<b>TOTAL</b> n (%)	<b>49 (19.6)</b>	<b>202 (80.4)</b>	<b>250 (100)</b>

**Gráfica 2. Sensibilidad antimicrobiana para 250 cepas de *Haemophilus influenzae*.**



**Tabla 4. Relación de la actividad del agente antimicrobiano y el biotipo.**

Antimicrobiano	Biotipo n (%)													
	I		II		III		IV		V		VI		VII	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
CLR	53 (21.5)	5 (2)	74 (29.6)	9 (3.6)	76 (30.4)	1 (0.4)	8 (3.2)	1 (0.4)	8 (3.2)	0 (0)	6 (2.4)	0 (0)	8 (3.2)	1 (0.4)
LVX	58 (23.2)	0 (0)	83 (33.2)	0 (0)	77 (30.8)	0 (0)	9 (3.6)	0 (0)	8 (3.2)	0 (0)	6 (2.4)	0 (0)	9 (3.6)	0 (0)
AMP	54 (21.6)	4 (1.6)	68 (27.2)	15 (6)	67 (26.8)	10 (4)	7 (2.8)	2 (0.8)	8 (3.2)	0 (0)	6 (2.4)	0 (0)	8 (3.2)	1 (0.4)
SXT	32 (12.8)	26 (10.4)	49 (19.6)	34 (13.6)	46 (18.4)	31 (12.4)	9 (3.6)	0 (0)	5 (2)	3 (1.2)	5 (2)	1 (0.4)	4 (1.6)	5 (2)
CXM	55 (22)	3 (1.2)	76 (30.4)	7 (2.8)	71 (28.4)	6 (2.4)	9 (3.6)	0 (0)	8 (3.2)	0 (0)	6 (2.4)	0 (0)	9 (3.6)	0 (0)
CRO	58 (23.2)	0 (0)	57 (22.8)	1 (0.4)	71 (28.4)	6 (2.4)	9 (3.6)	0 (0)	8 (3.2)	0 (0)	6 (2.4)	0 (0)	9 (0)	0 (0)
AMC	58 (23.2)	0 (0)	51 (20.4)	6 (2.4)	75 (30)	2 (0.8)	9 (3.6)	0 (0)	8 (3.2)	0 (0)	6 (2.4)	0 (0)	8 (3.2)	1 (0.4)

**Tabla 5. Relación de la actividad del agente antimicrobiano y el serotipo.**

Serotipo (n)	Antimicrobiano n (%)													
	CLR		LVX		AMP		SXT		CXM		CRO		AMC	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
a, c-e (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
b(46)	42 (16.8)	4 (1.6)	46 (18.4)	0 (0)	13 (5.2)	33 (13.2)	25 (10)	21 (8.4)	43 (17.2)	3 (1.2)	46 (18.4)	0 (0)	43 (17.2)	3 (1.2)
f(7)	6 (2.4)	1 (0.4)	7 (2.8)	0 (0)	7 (2.8)	0 (0)	2 (0.8)	5 (2)	7 (2.8)	0 (0)	7 (2.8)	0 (0)	7 (2.8)	0 (0)
No tipificable (197)	178 (71.2)	19 (7.6)	197 (100)	0 (0)	195 (78)	2 (0.8)	113 (45.2)	84 (33.2)	183 (72.8)	14 (5.6)	192 (76.8)	5 (2)	181 (72.4)	16 (6.4)

**Tabla 6. Relación de la producción de  $\beta$ -lactamasa y la actividad de los siete agentes antimicrobianos.**

Antimicrobiano	$\beta$ -lactamasa n (%)			
	Positiva		Negativa	
	S	R	S	R
CLR	45(18)	4(1.6)	181(72.4)	20(8)
LVX	49(19.6)	0(0)	201(100)	0(0)
AMP	14(5.6)	35(14)	201(100)	0(0)
SXT	17(6.8)	31(12.4)	122(48.8)	79(31.6)
CXM	42(16.8)	7(2.8)	191(76.4)	10(4)
CRO	48(19.2)	1(0.4)	197(78.8)	4(1.6)
AMC	47(18.8)	2(0.8)	184(73.6)	17(6.8)

## VIII. DISCUSIÓN.

La incidencia de Haemophilus influenzae presenta una marcada relación con la edad, hecho que juega un papel importante, debido a que los hallazgos encontrados en el presente trabajo confirma más la elevada frecuencia de Haemophilus influenzae en adulto; sin embargo, en la literatura se reportan un mayor número de casos en niños que en adultos.

La serotipificación de Haemophilus influenzae es considerada relevante para determinar la patogenicidad de este microorganismo, el serotipo b es considerado el más virulento debido a que esta asociado a enfermedades invasivas como la meningitis. En países desarrollados tales como EUA, este serotipo ha sido erradicado por medio de la vacunación; por lo que, ahora las cepas de Haemophilus influenzae no serotificable son más importantes. La situación en México es diferente porque la vacunación contra Haemophilus influenzae serotipo b tiene 4 años de introducida al esquema de vacunación.

En los estudios realizados por Trollfors (1984), encontraron cepas no serotificables en pacientes adultos (>30 años de edad). Deulofeu (1994), en un estudio realizado en España, reportaron un 67 % de cepas no serotificables en pacientes adultos (24 a 88 años). Doer y colaboradores, describieron en 1997, 60.7 % de cepas aisladas de Haemophilus influenzae en adultos donde el 37.3 % fueron mayores de 50 años, en 1998 cerca del 42 % de su población fueron adultos, siendo un 24.3 % mayores de 50 años. Jacobs (1999) reportó un 55.4 % de aislamientos de Haemophilus influenzae en adultos de ellos 16.6 % fueron mayores de 60. En los países de Latinoamérica se observa un aumento de cepas no serotificables de Haemophilus influenzae, en muestras aisladas de infecciones de vías respiratorias bajas. De acuerdo, con diversos estudios reportados, los aislamientos de Haemophilus influenzae no serotificable han sido predominantes y con una menor frecuencia el serotipo b. La epidemiología mundial de Haemophilus influenzae no serotificable muestra que este se aísla en más del 72 % de muestras

respiratorias, dato que se correlaciona con lo obtenido en el presente trabajo ( 78.8 % ) de cepas no serotificables. La identificación de cepas no serotificables es relevante, porque se ha establecido que este microorganismo coloniza la nasofaringe hasta en un 80 % en los individuos aparentemente sanos (Sosa Iglesias et al, 1998).

La biotipificación de Haemophilus influenzae ha proporcionado una información epidemiológica valiosa, y los biotipos específicos se han asociado a diferentes infecciones, fuentes de aislamiento, propiedades antigénicas y patrones de resistencia antimicrobiana; a diferencia de la serotipificación que nos sirve para valorar la patogenia de Haemophilus influenzae. En México, Sosa Iglesia (1998), reportaron Haemophilus influenzae biotipo II en pacientes infantiles con infección en vías respiratorias; por otra parte, Foweraker (1993), también reportan biotipo II asociado a infecciones de vías respiratorias. Los biotipos reportados a nivel mundial de aislamientos de infecciones en el aparato respiratorio más frecuentes fueron los biotipos II y III, lo que se correlaciona con lo obtenido en este estudio 33.2 % y 30.8 % respectivamente. (Granato et al, 1982). En un estudio realizado en niños y adultos, reportaron 90% de los aislamientos biotipo I, serotipo b y un 50% cepas no tipificables biotipo V. En el presente trabajo también se realizó una relación de la distribución de los biotipos y los serotipos, y se encontró que las cepas no tipificables en su mayoría pertenecen al biotipo II, mientras que las cepas serotipo b pertenecen al biotipo I, estos resultados correlacionan con lo reportado por Albritton (1978) que reportó aislamientos serotipo b asociados al biotipo I y los no tipificables con el biotipo II.

En este estudio se presentó un 4.8 % de las cepas serotipo b y 13.6 % de cepas no serotificables son productoras de  $\beta$ -lactamasa, mientras que de las cepas biotipo II (7.6 %) y biotipo I (5.2 %) son productoras de dicha enzima, por lo que se puede asumir que la producción

de la  $\beta$ -lactamasa no esta asociada al serotipo o al biotipo. Al igual que no hay relación entre los agentes antimicrobianos utilizados en este estudio con los biotipos y los serotipos.

Galicia Velasco (2002) en el INER obtuvo una sensibilidad antimicrobiana del 100 % con cefuroxime y ceftriaxona, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que con cefuroxime se obtuvo 93.2 % y con ceftriaxona 98 % de sensibilidad.

La resistencia antimicrobiana entre aislamientos clínicos de Haemophilus influenzae es un problema de incremento constante, de grandes implicaciones clínicas y es un tema de importancia en salud pública, pues obliga al desarrollo y utilización de nuevos agentes antimicrobianos, siempre más costosos y muchas veces más tóxicos que los empleados habitualmente en el tratamiento de las infecciones. La frecuencia de aparición de resistencia a los antimicrobianos es grande y tan rápida que aparentemente está ganando a la velocidad con que se obtienen nuevos antimicrobianos. Por otro lado, la resistencia no ocurre para un solo antimicrobiano sino que en la mayor parte de los casos tiene un carácter múltiple, por lo que en un futuro muy cercano, la mayor parte de las infecciones podrían ser causadas por microorganismos con múltiple resistencia. Por ello, el conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana debe orientar a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces y además, la información proporcionada debe servir de insumo para la elaboración de un programa de uso racional de antibióticos. Desde 1993 se han reportado la resistencia de cepas de Haemophilus influenzae resistentes a la ampicilina y al trimetoprim/sulfametoxazol ( Hortal et al, 2001; Sgambatti et al, 2001). En un estudio realizado en Latino América y Jorgense ( 1992) reportó que la resistencia de Haemophilus influenzae al trimetoprim/sulfametoxazol puede detectarse en menos del 1% de las cepas y es debido a un exceso en la producción de dihidrofolato reductasa. En el presente trabajo la resistencia obtenida al trimetoprim/sulfametoxazol fue más alta (44 %) que la

reportada por Jorgensen (1992), sin embargo, concuerda con lo reportado por Galicia Velasco (2002) quien obtuvo un 49 % de resistencia a este antimicrobiano.

Es fundamental asegurar la calidad de los resultados de laboratorio, siendo indispensable por tanto, estandarizar los procedimientos, ello involucra normas técnicas, capacitar al personal de los laboratorios, supervisar y participar en un programa de control de calidad externo. La lectura interpretativa de los patrones de susceptibilidad permite un enfoque más científico al problema de resistencia y se convierte en una guía fundamental para el manejo de problemas específicos. Debido a la complejidad de los mecanismos de resistencia, es fundamental para este enfoque que el laboratorio pueda identificar los microorganismos a nivel de especie y que lleve a cabo susceptibilidades de un número razonable de antimicrobianos. Además, se debe optimizar la información de las cepas de Haemophilus influenzae para su estudio epidemiológico; siendo necesario tomar en consideración los siguientes puntos: 1) el serotipo y el biotipo de las cepas tipificables o no serotipificables, 2) información del tipo de muestra estudiada, así como la edad de los individuos, 3) la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos y 4) el total de los aislamientos de Haemophilus influenzae, para que exista una concordancia en los reportes (Deulofeu et al, 1994).

## IX. CONCLUSIONES.

- ◆ Se observa una mayor incidencia de enfermedades respiratorias causadas por Haemophilus influenzae en niños menores de 2 años y en adultos mayores de 60 años.
- ◆ Las cepas aisladas que se obtuvieron con mayor frecuencia fueron las no serotificables, seguido del serotipo b.
- ◆ Los biotipos encontrados más frecuentemente fueron II (33.2%) y III (30.8 %).
- ◆ La mayoría de las cepas estudiadas fueron no productoras de  $\beta$ -lactamasa (80.4 %)
- ◆ Los antibióticos que presentaron una mayor resistencia fueron la ampicilina (14 %) y el trimetoprim/sulfametoxazol (44 %).
- ◆ El agente antimicrobiano que presento el 100 % de sensibilidad para cepas de Haemophilus influenzae fue la levofloxacina, seguido por ceftriaxona (98 %), cefuroxime (93.2 %), amoxi/clavulanato (92.4 %) y claritomicina (90.4 %).
- ◆ No existe relación entre la actividad antimicrobiana de los siete agentes antimicrobianos ensayados con los biotipos y los serotipos.

## X. BIBLIOGRAFIA

**Barry AL, Fuchs PC, Brown SD**, Identification of beta-lactamase-negative, ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* with four methods and eight media, *Antimicrob Agents Chemother*, 2001 May; 45(5):1585-8.

**Bessu W.W.**, Pathogenesis and Sequelal of Respiratory Infections, *Rev. Infection Dis.* 1991;13 (suppl 6): S477-85.

**Bradshaw M., Scheneerson R., Parker JC., Robbins JB**, Bacterial Anigens Cross Reactive With the Capsular Polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b, *Lancet* 1971, 1:1095.

**Deulofeu F., Nava J., Bella F., Martí C., Morera M., Font B., Fontanals, Lite J., Garau J., Calderón A., Coll M., Uriz S., Pineda V.** Prospective Epidemiological Study of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in Adults. *Eur.J.Clin.Microbiol. Infec. Dis.* 1994; 13(8): 633-638.

**Doer Gary V, Jones Ronald N, Pfaller Michel A, Kugler Kari and the Sentry Participants Group.** *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from patirnts with community-acquired respiratory trac infections: antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997) *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, vol 43, 385-389.

**Falla T., Dobson S., Crook D., Kraak W., Nichols W., Anderson G., Jordens J., Slack M., Nayon-Whited, Moxon E.**, Population-based study of non-typable *Haemophilus influenzae* invasive disease in children and neonates. *Lancet*; 1993, 341: 851-54.

**Finegeld** , *Diagnóstico Microbiológico*, 3ª Edición, 1970, pp. 90,169-173.

**Foweraker JE, Cooke NJ and Hawkey PM.** Ecology of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in sputum and saliva and effects of antibiotics on their distribution in patients with lower respiratory tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 04 1993, Vol. 37, No. 4, 804-809.

**Galicia V.** Aislamientos de *Haemophilus influenzae* en el INER, Biotipificación, serotipificación y susceptibilidad, Tesis para obtener el titulo de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química, UNAM, 2002.

**García E., Viveros M., González ., Escamilla V., Gracia J.**, Caracterización y resistencia de las cepas de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* aisladas de la nasofaringe de portadores. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*, Enero-Marzo 1998; 11(1): 17-24.

**Granato P., Jurek E., and Weiner L.**, Biotypes of *Haemophilus influenzae*: Relation Ship to Clinical Source of Isalation, Serotype and Antibiotic Susceptibility. *American Society of Clinical Pathologists*, 1982.

**Grasso R., West L., Holbrook N., Halkias D., Paradise L., and Friedman H.** Increased Sensitivity of New Coagglutination Test for Rapid Identification of *Haemophilus influenzae* Type b. J.Clin. Microbiol, June 1981,p.1122-1124.

**Haban D, Felmingham D,** The PROTEKT study: antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community respiratory tract infections, Antimicrob Chemother, 2002 Sep;50 Suppl S1:49-59.

**Hasegawa K., Yamamoto K., Chiba N., Kobayashi R., Nagai K., Jacobs MR, Appelbaum PC., Sunakawa K., Ubukata K.,** Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States, Microb Drug Resist. 2003 Sprin; 9(1): 39-46.

**Heelan J., Chesney D., and Guadagno G.,** Investigation of Ampicilin-Intermediate Strains of *Haemophilus influenzae* by Using the Disk Diffusion Procedure and Current National Committee for Clinical Laboratory Standards Guidelines. J. Clin Microbiol; 1992, 30(7): 1674-1677.

**Hoiseth, Connelly and Moxon.** Genetics of spontaneous, high-frequency loss of b capsule expression in *Haemophilus influenzae*. Infect Immun, 1985, p.389-395.

**Hunter K.W. Jr., Hemming V.G., et al,** Antibacterial Activity of a Human Monoclonal Antibody to *Haemophilus influenzae* type b, Lancet 1982, 2 : 798.

**Jacobs M., Felmingham D., Appelbaum P., Grünerberg R.,** and the Alexander Project Group, The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents, J. antimicrobial Chemother 2003; 52, 229-246.

**Jorgensen J.,** Update on Mechanisms and Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Infec Diseases; 1992, 14:1119-23.

**Koneman E., Allen S., Schreckenberger, Winn W.,** Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color, 5ª Edición, Médica Panamericana, 2003, Cap 7: 357-386.

**Latorre C., Sanfeliu I., Grupo de Trabajo de Hospitales Comarcales de Cataluna,** *Haemophilus influenzae*: phenotype characteristics of strains isolated in 12 Catalan Hospitals over on year. Enferm Infec Microbiol Clin. 2003 Mar; 21(3):136-30.

**MacFaddin Jean,** Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica, Editorial Médica Panamericana, 3ª Edición 20002, 43-246, 422.

**Mendelman P., Chaffin D., Stull T., Clausen C., Needham C., Williams J., and Smith A.** Failure to Detect Ampicilin-Resistant, Non  $\beta$ -Lactamase-Producing *Haemophilus influenzae* by Standard Disk Susceptibility Testing. Antimicrob. Agents Chemother, 1986; 30(2): 274-280.

**Mendelman P., Chaffin D., Stull T., Rubens C., Mack K., and Smith A.** Characterization on Non  $\beta$ -Lactamase Mediated Ampicillin Resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob. Agents Chemother; 1984, 26(21): 235-244.

**Misawa S, Nakamura A, Oguri T, Igari J,** Detection methods for drug-resistant in routine examination –BLNAR, Rinsho Byori. 2000 Jan; Suppl 111:75-83.

**Notake S., Nakamura Y., Yanagisawa H., Haketa M., Ide K., Nagai K., Kakegawa J., Shiozawa J., Kobayashi S., Shimazaki Y., Naitoh M., Toda K., Fujiki K., Okimura Y., Okabe T.,** Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase productivity of recent clinical isolates during the period between December 1999 and February 2000. Jpn J Antibiot. 2002 Sep; 55 Suppl A: 111-8

**National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Normantiva para la Puesta en Práctica del estudio de Susceptibilidad Antimicrobiana; Enero, 1998. M100-S8, vol. 18, No. 1

**Oberhofer T., and Back A.,** Biotypes of *Haemophilus* Encountered in Clinical Laboratories, J. Clin. Microbiol; 1979, 10(2): 168-174.

**Oguri T., Igari J., Hiramatsu K., Watanabe A., Inoue M., Abe M., Yamane N., Aihara M., Hoshimoto H.,** Japan beta-lactamase Research Group, Beta-lactamase-producing activity and antimicrobial susceptibility of major pathogenic bacteria isolated from clinical samples. Japan beta-lactamase Research Group, Jpn J Antibiot. 2002 Sep; 55 Suppl A:1-28.

**Sarah S, Long, Mary J. Teter and Peter H. Gilligan,** Biotype of *Haemophilus influenzae*: correlation with virulence and ampicillin resistance. J. Infect. Dis, 1983 May; 147(5): 800-806.

**Seki H, Kasahara Y, Ohta K, Saikawa Y, Sumita R, Yachie A, Fujita S, Koizumi S,** Increasing prevalence of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strains of *Haemophilus influenzae* in children in Japan, Chemotherapy, 1999 Jan-Feb; 45(1):15-21.

**Seki H., Kasahara Y., Ohta K., Saikawa Y., Sumita R., Yachie A., Fujita S., Koizumi S.,** Increasing prevalence of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strains of *Haemophilus influenzae* in children in Japan, Chemotherapy 1999 Jan-Feb; 45(1):15-21.

**Sirakova T, Kolattukudy PE, Murwin D, Billy J, Leake EL, De María T, Bakaletz Lo.** Role of fibrin expressed by non-typable *Haemophilus influenzae* in pathogenesis of and protection against otitis media and relatedness of the fimbria subunit to outer membrane protein A. Infect Immun 1994;62:2002-20.

**St Geme III J, Cutter D.** Influence of pili, fibrils and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. Molecular Microbiol 1996;21(1):21-31.

**Sgambatti de Andrade A., Di Fabio J.L., Brandileone MAC, Oliveira RM, Silva SA, Baiocchi SA, Martelli C,** *Haemophilus influenzae* Resistance in Latino América: Systematic Review of Surveillance Data, Microbi. Drug Resist, 2001; 7(4) 403-11.

**Soja Elodia, Portillo Leopoldo**, Adherencia de *Haemophilus influenzae*, Enf. Infec. y Microbiol, 1998; 18(2); 63-9.

**Sosa-Iglesias E., Anaya-Medina A., Portillo-Gómez L., Bermudez-García G., Gutierrez Cazares Z., Juarez-Ahuactzin E., and Mancilla -González S.**, Biotypes and Serotypes of *Haemophilus influenzae* of clinical isolates from mexican children . Archives of Medical Research ; 1998, 29 (2): 133-136.

**Soto Hernández J., Escobido C., Ponce de León S., Rangel F.:** Neumonía adquirida en la comunidad en adultos. Elementos de Diagnostico, Evaluación de la Gravedad. Guía de Manejo y Prevención, Enf. Infec. y Microbiol, 1999, 19(6):301-16.

**Takahashi T., Tsujihara Y., Harada M., Shimura H., Takahashi S., Hachiya K., Matsumoto F.**, Antimicrobial activities of beta-lactam antibiotics against clinically isolated *Haemophilus influenzae*. Jpn J Antibiot. 1999 Apr; 52(4): 292-301.

**Trollfors B, Claesson BA, Lagergard T, Sandberg T**, Incidence, predisposing factors and manifestation of invasive *Haemophilus influenzae* infections in adults. European Journal of Clinical Microbiology 1984, 3: 180-184.

**Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, Sunakawa K, Inonue M, Konno M**, Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*, Antimicrob Agents Chemother, 2001 Jun;45(6):1693-9.

**Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T**, Possible high rate of transmission of nontypeable *Haemophilus influenzae*, including beta-lactamase-negative ampicillin resistant strains, between children and their parents, J Clin Microbiol, 2004 Jan;42(1): 362-5.

**Wilson R.** , Patogenésis y Control de las Infecciones Bronquiales : Círculo Vicioso de la Limitación Respiratoria, Rev. Contemp. Pharmacother 1992 , 3; 103-112.

**Yamamoto K, Ubukata K**, Beta-lactamase negative ampicillin -resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR), Nippon Rinsho, 2001 Apr;59(4):688-93.

**Yamanoto K., Ubukata K.**, Beta-lactamase negative ampicillin-resisten *Haemophilus influenzae* (BLNAR), Nippon Rinsho 2001 Apr; 59(4):688-93.

**Zinsser**, Microbiología, Editorial Panamericana 20ª Edición 1996, 636-647

[http://www.abcmedicus.com/articulo/id/medicos/id/185/pagina/1/uso\\_racional\\_antibioticos](http://www.abcmedicus.com/articulo/id/medicos/id/185/pagina/1/uso_racional_antibioticos).  
Bacteriología.

[http://cubahora.cip.cu/salud/consultas/consult\\_h/haemophilus%20influenzae.htm/](http://cubahora.cip.cu/salud/consultas/consult_h/haemophilus%20influenzae.htm/)

[http://1658.158.110/spanish/huphup\\_hib\\_epideprev.htm](http://1658.158.110/spanish/huphup_hib_epideprev.htm).

**[http://www.cspt.es/webcstcastella/CMRA/medicin/Inf\\_prom\\_cout/sensibilitate.doc](http://www.cspt.es/webcstcastella/CMRA/medicin/Inf_prom_cout/sensibilitate.doc)**

**<http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologis.php?mostrar=negativos..>**

**[http:// www.librosmedicos.com/trabajos/cefepime.doc](http://www.librosmedicos.com/trabajos/cefepime.doc)**