

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**MEJORAS EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA LA
DETERMINACIÓN DE *Haemophilus influenzae***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A:
MARISOL LUIS CARRILLO**

MÉXICO, D.F.

2006



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.

EL PRESENTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO CLÍNICO DE LA UMAI "ESTADO DE MÉXICO" FES ZARAGOZA, UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL M. EN C. ANGEL GARCÍA SÁNCHEZ .

MEJORAS EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA LA DETERMINACIÓN *DE*
Haemophilus influenzae

DEDICATORIAS:

A DIOS: Que me ha dado la oportunidad de ser feliz y estar satisfecha con mi vida.

A MI MADRE: Con amor, admiración y respeto. Por su constancia, sacrificios y apoyo para que llegue a éste momento.

A MI PADRE: Por que de los errores, se puede madurar si así se quiere.

A MI ESPOSO: Por su amor, apoyo, comprensión y respeto a mis expectativas personales.

A MI PEQUEÑO IAN: Al que amo y es el centro de mi vida.

A MIS HERMANOS Y SOBRINOS: Por que siempre se levanten y sigan adelante ya que su felicidad depende solo de ustedes. Por que valoren lo que tienen.

A MI TÍA EFIGENIA Y LA FAMILIA HERNANDEZ LUIS: Por su cariño, apoyo y amistad constante.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS: Por la amistad que conocí en ustedes, por que a pesar del tiempo sigue firme nuestro apoyo y cariño.
Claudia, Jesús, Margarita, Enrique, María Elena , Norma y Manuel.

A EL Q.F.B. ANTONINO SAENZ PRIETO : Profesor y amigo que Dios lo tenga en su Gloria. En su memoria y esperando haber cumplido con los principios con los que el propuso el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en especial a la Facultad de Estudios Superiores (FES) "ZARAGOZA". Por haberme acogido en sus aulas y brindarme los conocimientos para mi formación profesional.

A quienes conforman el jurado de tesis, por sus valiosos comentarios durante la revisión del presente trabajo:

Q.F.B. José Oscar González Moreno
M. en C. Angel García Sánchez
Q.F.B. Víctor Hugo Becerra López
Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez
Q.F.B. Gabriel Alejandro Romero Díaz

De una manera especial al M. en C. Angel García Sánchez que estuvo dispuesto a dar continuidad y conclusión al presente, sin cambios que alteraran los principios propuestos en su inicio.

INDICE

I	RESUMEN	8
II	INTRODUCCIÓN	9
III	MARCO TEORICO	
	1. ANTECEDENTES.	11
	2. DESCRIPCIÓN.	12
	3. LOCALIZACIÓN.	13
	4. HISTORIA.	14
	5. PATOGENICIDAD.	15
	6. VIRULENCIA.	16
	7. PATOLOGÍA.	18
	8. IMPORTANCIA CLÍNICA.	21
	9. EPIDEMIOLOGÍA Y PANORAMA EPIDEMIOLOGICO.	22
	9.1. LA EDAD.	23
	9.2. EL SEXO.	24
	9.3. LA ÉPOCA DEL AÑO.	24
	9.4. LA DESNUTRICIÓN.	24
	9.5. VIROSIS RESPIRATORIA PREVIAS	24
	9.6. TRATAMIENTOS CON ANTIBIÓTICOS.	24
	9.7. PREDISPOSICIÓN POR HOSPITALIZACIÓN.	24
	9.8. FACTORES GÉNETICOS Y DE RAZA.	25
	10. DIAGNÓSTICO	29
	10.1. TOMA DE MUESTRA	31
	10.2 TRANSPORTE DEL PRODUCTO.	33
	10.3. EXÁMEN DIRECTO DEL MATERIAL CLÍNICO.	33
	10.4 AISLAMIENTO.	33
	10.4.EL AGAR-CHOCOLATE.	34
	10.4.2. LA GELOSA CHOCOLATE-VANCOMICINA.	34
	10.4.3. LA GELOSA SANGRE DE CABALLO Ó DE CONEJO.	34
	10.4.4. EL AGAR- SANGRE DE CABALLO DE CASMAN.	34
	10.4.5. EL MEDIO DE LEVINTHAL.	34
	10.4.6. EL ENRIQUECIMIENTO DE FILDES.	34
	10.4.7.LA GELOSA HEMINA, BACITRACINA, EXTRACTO DE LEVADURA	35
	10.5. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Haemophilus</i> .	35
	10.5.1. DETERMINACIÓN DE REQUERIMIENTOS DE FACTORES X Y V.	35
	10.5.1.1. SATELITISMO DE COLONIAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> .	36
	10.5.1.2. SATELITISMO A DISCOS O TIRAS DE PAPEL IMPREGNADOS CON FACTORES X Y V	36
	10.5.1.3. PRUEBA DE LA PRODUCCIÓN DE PORFIRINAS.	36
	10.5.2. REACCIONES HEMOLITICAS EN SANGRE DE CABALLO O CONEJO	37

	10.6. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.	37
	10.6.1 PRODUCCIÓN DE INDOL.	37
	10.6.2 DESCARBOXILACIÓN DE AMINOÁCIDOS.	38
	10.6.3. HIDRÓLISIS DE LA UREA.	38
	10.7. PRUEBAS SEROLÓGICAS	39
IV	PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA.	40
V	OBJETIVOS	41
VI	HIPOTESIS DE TRABAJO	42
VII	MATERIAL Y MÉTODOS.	
	MATERIAL	
	PRIMERA PARTE. FORMULACIÓN DEL SOPORTE DE	
	CRECIMIENTO.	43
	SEGUNDA PARTE UTILIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EN	
	CULTIVOS DE EXUDADOS FARÍNGEOS.	43
	MATERIAL	44
	TÉCNICAS	47
VIII	RESULTADOS	50
IX	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
X	CONCLUSIONES	69
XI	BIBLIOGRAFÍA	70
XII	ANEXOS	
	ANEXO I SEROLOGIA, RESPUESTA INMUNITARIA Y POSIBLES	76
	VACUNAS	79
	ANEXO II PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.	
	APENDICE	81

I RESUMEN

Antecedentes: Las infecciones respiratorias en niños y adultos Inmuno - suprimidos son de las más frecuentes y variados padecimientos a nivel mundial. *Haemophilus influenzae* se considera dentro de las principales causas de las infecciones respiratorias agudas (entre otras). En México sólo pocos hospitales de tercer nivel aislan a ésta bacteria ya que los medios comerciales empleados, equipos y reactivos de serotipificación necesarios son de alto costo.

Objetivos del estudio: Se pretende la implementación de una metodología básica con medios, equipo y reactivos de bajo costo que signifiquen una alternativa que permita el desarrollo e identificación de *Haemophilus influenzae* en laboratorios de cualquier nivel.

Métodos: Se realizó un análisis de los medios recomendados para el desarrollo y aislamiento de *Haemophilus influenzae* para diseñar el medio de cultivo además de la selección de las pruebas de identificación de especie y biotipificación como metodología básica para la identificación de ésta bacteria.

Resultados: En el estudio se observó un aislamiento en 12 muestras (7.84%) de *Haemophilus influenzae* de las 153 y en la biotipificación se obtuvieron las siguientes frecuencias: Biotipo I 16.6%, biotipo II 49.8%, biotipo III 0%, biotipo IV 16.2% , biotipo V 8.3% y del biotipo VI 8.3%. En cuanto a sexo, se observó que hay mayor frecuencia en el sexo masculino 66.7% que en el femenino 33.3% .Con respecto a las edades se encontro un 7.12% en población infantil y 0.65% en adulta.

Conclusiones: Se mostró finalmente que el medio presentado permite el desarrollo de *Haemophilus influenzae* y que la metodología propuesta es útil para la identificación y biotipificación, permitiendo su elaboración y utilización en laboratorios de cualquier nivel a bajo costo y sin necesidad de equipos especiales. Además se sugiere el medio para el cultivo de otras especies del género *Haemophilus* u otros organismos nutricionalmente exigentes.

II. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades en las vías respiratorias son de los más frecuentes y causan variados padecimientos humanos a nivel mundial. Actualmente en nuestro país las enfermedades respiratorias son la principal causa de consultas médicas, además de ser una de las causas principales de ingresos hospitalarios y de defunciones hospitalarias. De acuerdo con datos epidemiológicos de la Secretaría de Salud las infecciones respiratorias agudas están dentro de las veinte principales causas de enfermedades a nivel nacional *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* son dos de los microorganismos implicados con mayor frecuencia en las infecciones bacterianas graves en la población infantil, aunque también de cuadros clínicos en adultos.

H. influenzae o bacilo de Pfeiffer es un agente etiológico importante por su frecuencia en diferentes estados patológicos, es un microorganismo que forma parte de la flora bacteriana normal de la nasofaringe y de las vías respiratorias superiores del hombre aunque puede ser también el agente etiológico de infecciones, algunas de ellas graves en el niño y en el adulto inmunodeprimido. Estas infecciones van desde las leves en el aparato respiratorio, como la faringitis, faringoamigdalitis, otitis media, sinusitis, hasta las sistémicas e invasivas como meningitis, neumonía, epiglotitis, empiema, celulitis, artritis séptica, infecciones intestinales, urinarias y la pericarditis entre otras, llega a causar secuelas permanentes y una alta mortalidad en el caso de meningitis bacteriana, neumonía con derrame y la artritis séptica.

En México, una proporción importante de los niños presentan características que los predisponen a adquirir la elevada transmisibilidad de las infecciones por *H. influenzae* entre contactos susceptibles en poblaciones de "alto riesgo", como guarderías y salas pediátricas. Lo anterior es un problema en el niño aparentemente sano, en el desnutrido, en el huésped inmunosuprimido, o en aquel que ha recibido antimicrobianos indiscriminadamente elevando así las tasas de morbilidad y mortalidad. Una alternativa para la detección oportuna es lograr su aislamiento en el laboratorio clínico.

En los últimos años se ha demostrado que las técnicas inmunológicas constituyen técnicas útiles para el diagnóstico rápido de bacterias de difícil crecimiento como *H. influenzae*, que por su sencillez y rapidez obtienen resultados en un tiempo de 30 a 60 segundos. Considerando que en enfermedades como meningitis donde es vital un diagnóstico rápido y efectivo en un tiempo mínimo, estas técnicas se convierten en un procedimiento diagnóstico indispensable, aún cuando su utilización es limitada a pacientes graves internados en hospitales de tercer nivel.

Dichas técnicas son de alto costo lo cual afecta la distribución de reactivos en las unidades médicas, por lo que su implementación en laboratorios de primer y segundo nivel como un estudio de rutina no es algo sencillo.

Una alternativa para la identificación de éste microorganismo exigente nutricionalmente son los medios de cultivos especiales, ya que los convencionales no permiten su crecimiento, el cuál requiere para su desarrollo de la presencia de agentes nutricionales específicos. Los medios que recomienda la literatura requieren de medios, reactivos, equipo y técnicas que no están al alcance de los laboratorios de bajos recursos que es donde se encuentra la mayor parte de la población con problemas de salud.

Por lo anterior, en el presente trabajo se trata de rediseñar la formulación de un medio de cultivo que favorezca el aislamiento de *H. influenzae* empleando los reactivos básicos existentes en los laboratorios de rutina de manera que se pueda implementar como una técnica de trabajo cotidiano dentro de los mismos. Asimismo para que su empleo pueda servir como base en las distintas muestras de cultivo en enfermedades infecciosas asociadas con especies de *Haemophilus*.

III. MARCO TEORICO.

1. ANTECEDENTES.

En nuestro país las enfermedades infecciosas son de gran importancia por su elevada morbiletalidad. Estas no sólo afectan a la población infantil sino también a la adulta. Algunas infecciones pueden conducir a la muerte o bien provocar secuelas invalidantes ¹⁻³.

Dentro de los patógenos epidemiológicamente importantes en muchas infecciones de vías respiratorias altas y bajas adquiridas en la comunidad infantil se encuentra *H. influenzae*, en el Anuario Estadístico del 2002 (se considera ya dentro de las infecciones invasivas epidemiológicamente importantes⁸⁻¹¹).

Las infecciones del aparato respiratorio, y del Sistema Nervioso Central tienen una etiología muy variada dentro de estas *H. influenzae* tiene especial importancia por estar involucrado en una gran variedad de estados patológicos para el humano.⁴⁻¹¹

La taxonomía del bacilo de Pfeiffer se agrupa de la siguiente forma:

Orden: *Eubacteriales*
Familia: *Pasteurellaceae*
Género: *Haemophilus*
Especie: *influenzae*

2. DESCRIPCIÓN.

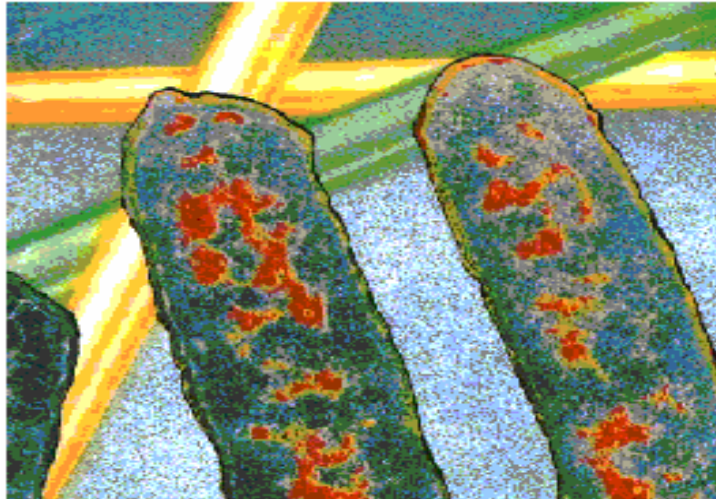


fig.1 Fotografía de *Haemophilus Influenzae*.
TOMADO DE : Conociendo al enemigo: *Haemophilus influenzae*.,ABBOTT (12)

Dentro de la familia *Pasteurellaceae* se ubica el género *Haemophilus* (del griego haemo- sangre y philos-que ama) que está compuesto por bacterias, que como su nombre lo indica, requiere de medios enriquecidos con sangre para su aislamiento³.

Wilson y Miles en 1917 establecieron que el género *Haemophilus* está constituido por bacterias Gram negativas con morfología de bacilos cocoides muy cortos y también se encuentran bacilos largos y formas filamentosas, lo que constituye el llamado *pleomorfismo* característico de esta especie ver fig.1, la mayoría de las cepas son catalasa y oxidasa positivas, poseen actividad de ureasa y fosfatasa alcalina, carecen de la capacidad enzimática de convertir el ácido delta amino levunílico a porfirinas, pero no son hemolíticas, generalmente son menores de 1µm de ancho y de 0.5 µm de longitud; 0.2 a 0.3 µm de diámetro; son inmóviles, no esporulados, no ácido alcohol resistentes, puede reducir nitratos a nitritos, son aerobios y anaerobios facultativos.¹³⁻¹⁹

Se desarrollan a una temperatura óptima de 35 a 37 °C. El contenido de Guanina y Citocina del DNA es de 37 a 40%. Pueden o no ser patógenos, los tipos no patogénicos forman parte de la flora normal de las vías respiratorias superiores de los humanos. Algunas especies tienen reconocido papel patogénico para el hombre, el prototipo de ella es *H. influenzae*¹³

Las cepas de éste microorganismo son de dos tipos, sin cápsula (no tipificables) y con cápsula (tipificables) de polisacáridos. (15-17) Las cepas pueden clasificarse en seis serovariedades relacionadas con su polisacárido capsular nominadas con las letras (a-f) y en ocho biovariedades (I-VIII) en base a su acción sobre el triptófano, urea y la ornitina, ver cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Polisacárido capsular de *H. influenzae*.

TIPO	AZUCAR	FOSFATO	ACETIL
a	Glucosa	+	-
b	Ribosa y ribitol	+	-
c	Galactosa	+	-
d	Hexosa	-	-
e	Hexosamina	-	-
f	Galactosamina	-	+

Tomado de : Sosa Iglesias, *Infectología*,7:9 (1987) 435-489 (9)

Cuadro 2. Biovariedades de *H. influenzae*

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

Tomado de; Kilian, Balows ,Hausler,Hermann, Isenberg 6 h-j. Shadomy (ED) manual of clinical microbiology c.(19)

3. LOCALIZACIÓN

H. influenzae se transmite por contacto directo, de persona enferma o portador asintomático a persona susceptible. La fuente de infección son las pequeñas gotas de saliva infectada expulsada al toser o estornudar. El periodo de incubación es relativamente corto, de horas a cinco días, la vía de entrada es la respiratoria y su diseminación más frecuente es la vía hematogena. Se han reportado diversos porcentajes de portadores que varían entre el 7 y 30%, dependiendo del tipo de población analizada^{13,18-19}. Se sabe que del 10 al 50% de los niños están colonizados con cepas de *H. influenzae* y esto puede favorecer la diseminación del microorganismo a otros individuos, en los cuales la presencia y localización de las infecciones por esta bacteria parecen estar relacionadas directamente con el estado de su inmunocompetencia y con la predisposición genética del hospedero. Sin embargo, hay otros factores predisponentes como lo son las enfermedades siguientes: mieloma múltiple, enfermedad pulmonar crónica obstructiva, cirrosis, diabetes mellitus, etc.⁵⁻⁷

4. HISTORIA.

La relevancia de *H. influenzae* como un problema de salud pública estriba en que es la bacteria causante de gran número de enfermedades respiratorias principalmente en la edad pediátrica y edad avanzada, donde los niveles de anticuerpos son bajos. En Estados Unidos se reportaron alrededor de 20,000 casos al año de enfermedades invasoras por esta bacteria y 1,000 fallecimientos al año. En México existe poca información sobre la epidemiología de dicho microorganismo; no obstante en el Instituto Nacional de Pediatría este agente constituye la primera causa de enfermedades como la meningitis bacteriana fuera del periodo neonatal y el 75% de los casos se presentan durante el primer año de vida ^{3,13,20}.

Robert Koch fue el primero en describir microorganismos similares de *Haemophilus* en exudados en el año de 1882; en 1883 lo describió como un cocobacilo pequeño obtenido de la secreción conjuntival de un egipcio; sin embargo, en general se acredita al médico alemán Emil Pfeiffer el descubrimiento del patógeno *H. influenzae* en 1892. Pfeiffer aisló al microorganismo del esputo de tejido pulmonar de varios sujetos que padecían influenza y más tarde se dio a este microorganismo el nombre de “bacilo de Pfeiffer”, fue descrito inicialmente como causante de la influenza durante la pandemia de 1889-1892. En 1893 Pfeiffer fue capaz de cultivar el bacilo en un medio conteniendo sangre. Durante la pandemia de 1918 a 1919, surgieron dudas acerca de la supuesta relación entre la influenza y *H. influenzae* como agente etiológico debido a que también otras bacterias patógenas estaban relacionadas con cuadros de neumonías secundarias. En 1899 Slawyk señaló la participación del mismo microorganismo como causa importante de la meningitis en niños.

Wilson y colaboradores establecieron el género *Haemophilus* en 1917, aún considerándolo como agente etiológico de la influenza, además de dar las características generales de la bacteria, las cuales se reconocen aún actualmente. En 1931, Shope demostró la interacción sinérgica del virus de influenza porcina y *Haemophilus suis*, este hecho aumenta la posibilidad de que también haya sinergia en el sistema de influenza humana. El aislamiento del virus “A” de la influenza en el año 1933 por Smith, Andrews y Laidlaw rompió la relación de este microorganismo como agente causal de esta enfermedad, quedando sólo el nombre para asignar la especie. La importancia de este germen en la bronquitis obstructiva de lactantes y niños fue descubierta por Lemierre en 1936. ^{3,13,21-23}

Los estudios por Margaret Pittman durante la década de los 40's, condujeron al establecimiento de los conocimientos actuales sobre la patogénesis, epidemiología e inmunología de *H. influenzae* ¹²

En 1931 Pittman clasificó a esta bacteria según la composición de su cápsula la cuál es de naturaleza polisacárida en 6 grupos y se pueden diferenciar inmunológicamente., ver cuadro 1.

Estos constituyen los llamados tipos serológicos o serovares; de las cepas con cápsula la del tipo b es la más frecuente en infecciones invasivas. Algunas cepas no son detectables, por lo que no se pueden serotipificar y se les denomina no tipificables (NT) o no capsuladas.^{5, 10, 12, 14-16}

En 1976, Kilian realizó la diferenciación entre las especies de *Haemophilus* y particularmente de las cepas de *H. influenzae*, quedando inicialmente clasificadas en seis biovares en base a tres reacciones bioquímicas: producción de indol, actividad de la urea y la descarboxilación de la ornitina. (cuadro 2)

Posteriormente Gratten descubrió un nuevo biovar denominado biovar (VII) y Sottrek y Albitton descubrieron el biovar (VIII). Esta clasificación en 8 biovares tienen utilidad epidemiológica y ha demostrado que el biovar de una determinada cepa está en relación con la fuente de su aislamiento.^{3, 12}

5. PATOGENICIDAD.

H. influenzae tiene especial importancia por estar involucrado en una gran variedad de los estados patológicos para el humano. Se sabe que la patogenicidad es la capacidad que tienen los microorganismos de producir daño a un hospedero, efecto que puede ocurrir por la interacción de productos extracelulares y/o componentes superficiales microbianas con su hospedero.^{18, 29, 40-41}

En el caso de la infección por *H. influenzae* existen grandes interrogantes respecto a los mecanismos de patogenicidad. La cápsula, de particular interés juega un papel importante en la patogenicidad, especificidad del serovar y producción de la inmunidad. La cápsula es una estructura bacteriana de particular importancia en patógenos, ya que protege a la bacteria de la fagocitosis, desecación y de la acción de algunas enzimas como lisozimas, dando además mayor virulencia a las bacterias que la poseen.

La membrana externa de este microorganismo es similar a las bacterias gram-negativas, se involucra en la capacidad de captación de hierro por las bacterias y se correlaciona con su virulencia, las proteínas de la membrana externa sirven como receptoras de los quelatos de hierro y ayuda a su incorporación en la bacteria¹⁸.

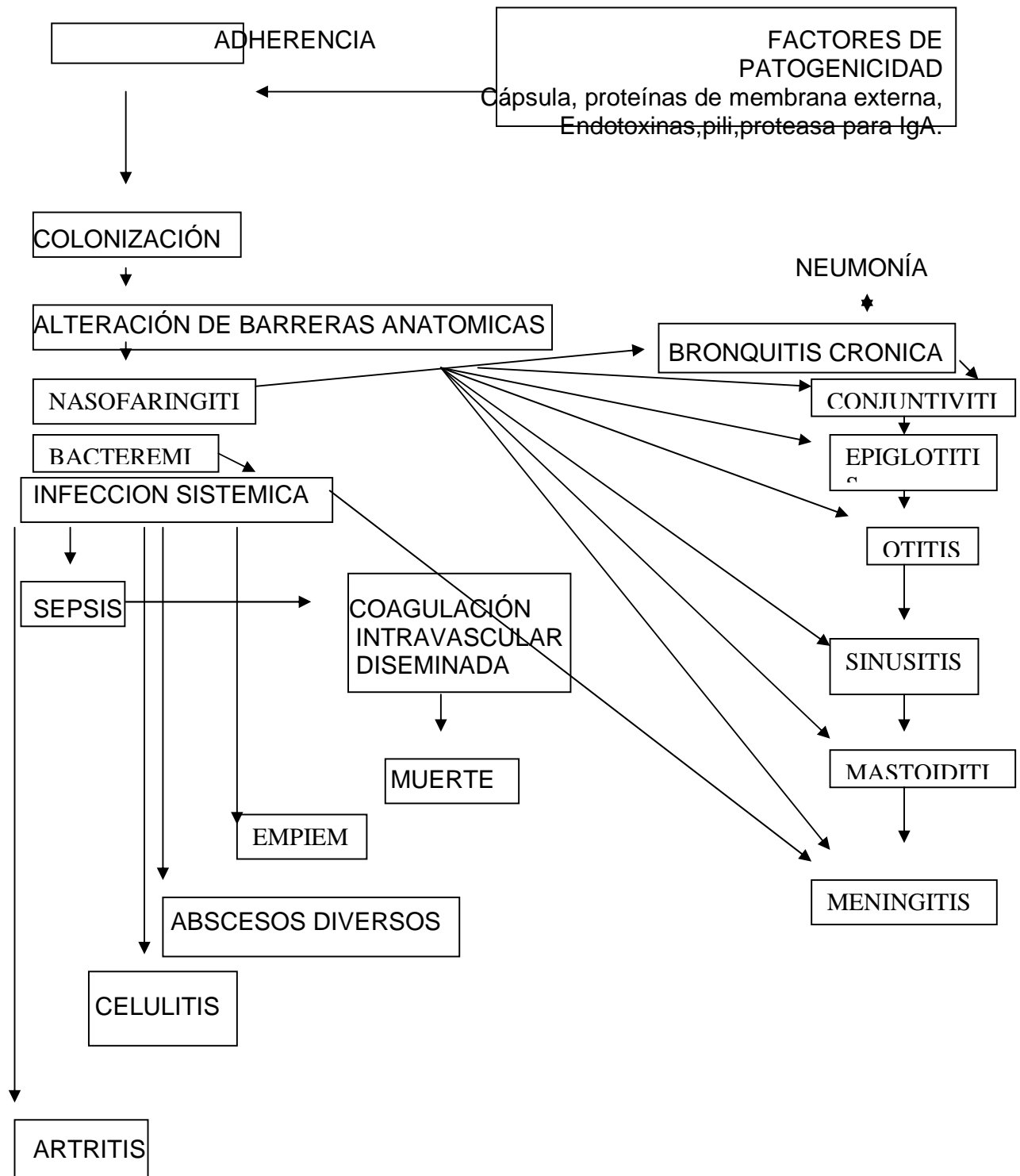
El análisis del lipopolisacárido (LPS) revela la presencia de glucosa, galactosa, glucosamina, heptosa y 2 ceto-3 desoxioctanato (KDO), así como la presencia de proteasa que rompe las IgA. De las fimbrias se desconoce su papel en la patogenicidad.⁹

6. VIRULENCIA.

La virulencia de *Haemophilus influenzae* es multifactorial probablemente involucra propiedades tales como:

- a) Producción de factores antifagocíticos (presencia de cápsula)
- b) Adhesión positiva de bacterias a las células (Pilis y proteínas de membrana externa)
- c) Toxigenicidad (lipopolisacáridos y/o endotoxinas)
- d) Invasibilidad (proteínas de membrana externa)
- e) Predisposición genética del hospedero (presencia de antígenos de histocompatibilidad Dw17 y DW14)
- f) Funcionalidad del sistema inmunitario.^{1,3,13}

Figura 2 Mecanismo de Patogenicidad de *Haemophilus influenzae*



7. PATOLOGÍA.

Los miembros del género *Haemophilus* representan un ejemplo de parasitismo estricto, su importancia biológica se hace evidente tanto en humanos como en otros vertebrados. Los tipos no patógenos forman parte de la llamada "flora normal" de las vías respiratorias superiores. Algunas especies tienen un reconocido papel patogénico para el humano. El prototipo de ellas es el *H. influenzae*, el cuál puede ser aislado de muchos procesos patológicos, en especial la población pediátrica. Aún cuando este microorganismo está muy reconocido como patógeno del tracto respiratorio en adultos con enfermedades crónicas, la incidencia de enfermedades invasivas en la población adulta debido a éste germen no esta bien establecida¹³; pero se sabe que en adultos se presenta en pacientes con condiciones predisponentes, como trauma craneal, sinusitis, otitis media y neumonía.³⁰⁻³²

El cuadro No. 3 muestra las diferentes patologías del ser humano en las que *H. influenzae* esta involucrado. Su análisis ha permitido distinguir dos grandes grupos:

1) *Enfermedades severas, agudas, piógenas*, generalmente invasivas en donde el microorganismo es el principal patógeno primario: Ejemplo:meningitis, epiglottitis y artritis.^{13,34,36} La meningoencefalitis se presenta como un cuadro de infección de vías respiratorias; fiebre, anorexia, ataque al estado en general, signos y síntomas del aparato respiratorio con afecciones al Sistema Nervioso Central (SNC).síndromes: febril, meníngeo, hipertención endocraneal y signos de daño neural.³⁶

En la neumonía con derrame pleural los síntomas son: tos, taquipnea, dolor torácico al toser, datos de dificultad respiratoria como: tiros intercostales, aleteo nasal, retracción xifoídea, dislocación toraco-abdominal, disnea, cianosis y síndrome de derrame pleural³⁴.

Las complicaciones en el caso de meningoencefalitis y neumonía son daño cerebral irreversible, secuelas de parálisis, afección al coeficiente intelectual, insuficiencia respiratoria y/o cardíaca, osteomielitis, arteomielitis y sépsis¹⁻³.

En la artritis séptica las complicaciones son parálisis , deterioro intelectual, alteraciones motrices, artrodesis y artritis recurrente.¹³

2) *Enfermedades crónicas* en las cuales *H.influenzae* es el patógeno secundario. Generalmente participan cepas no capsuladas. Ejemplo : bronquitis, bronquiectasia, sinusitis y otitis media.^{1,3,28}

Cuadro No. 3
ENFERMEDADES INFECCIOSAS ASOCIADAS CON ESPECIES DE *Haemophilus*.

ENFERMEDAD	ESPECIE	MUESTRA PARA CULTIVO	MANIFESTACIONES CLINICAS
MENINGITIS	<i>H. influenzae</i> _ tipo b	LCR, sangre	Signos de irritación, meníngea(dolor de cabeza, rigidez cervical), inicio insidioso; convulsiones; fiebre; más frecuente en niños de 1 mes a 2 años.
LARINGOTRAQUEITIS	<i>H. influenzae</i> _ tipo b	Exudado faríngeo ,secreciones laríngeas	Puntos o manchas inflamadas y enrojecidos, edematosos y con exudado amarillo: dolor de garganta con tos, similar al croup cuando es laríngeo.
EPIGLOTITIS	<i>H. influenzae</i> (b) <i>H.parainfluenzae</i>	Sangre, secreciones laríngeas	<i>Dolor de garganta de inicio y evolución súbitos; disfagia y obstrucción de vías aéreas superiores. Puede requerirse traqueostomía.</i>
BRONQUITIS	<i>H. influenzae</i>	<i>Esputo Aspiraciones translaríngeas Lavados bronquiales</i>	<i>Tos persistente y no productiva, sibilido, disnea y con la típica respiración asmática .La enfermedad</i>

			generalmente es crónica con exacerbaciones purulentas periódicas.
SINUSITIS AGUDA	<i>H. influenzae</i> <i>H. parainfluenza</i>	Exudado sinusal Especímenes quirúrgicos	Dolor de cabeza frontal, dolor facial, edema y eritema del tejido suborbital; puede apreciarse empiema sinusal.

Tomado de : Koneman EW 1988(21).

ENFERMEDADES INFECCIOSAS CON ESPECIES DE *Haemophilus*
(CONTINUACIÓN DEL CUADRO No.3)

OTITIS MEDIA	<i>H. influenzae</i> 95%	Líquido de membrana timpánica rota, Aspirado de oído medio.	Muy común en niños; rara en adultos. Supuración indiferenciable de las causadas por <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. pyogenes</i> . Fuerte dolor de oído, sensación de presión, dolor de cabeza y fiebre. A veces secreción serosa de oído medio que se asocia con enfermedad no bacteriana.
NEUMONÍA	<i>H. influenzae</i> tipo b	Espujo Aspirado transtraqueal Lavado bronquial	Tos, producción de esputo y dolor pleural. Su distribución tiende a ser lobar o segmentada, similar a la neumonía neumocócica.
ENDOCARDITIS	<i>H. aphrophilus</i>	Sangre	Escalofríos, fiebre en

	<i>H. paraphrophilus</i> <i>H. parainfluenza</i> <i>H. influenzae</i>		agujas, leucocitosis y complicaciones secundarias: anemia, pérdida de peso, malestar general y anorexia. Es frecuente que se afecten las válvulas mitral. Hay alta incidencia de embolia arterial asociada.
INFECCIÓN GENITAL, BACTEREMIA POSTPARTO, SEPSIS NEONATAL CON MENINGITIS.	<i>H. influenzae</i> <i>H. parainfluenzae</i>	Especímenes uretrales y endocervicales Sangre Tejidos faciales LCR	Uretritis caracterizada por descarga ligera y mucosa. La bacteria puede recuperarse de cultivo cervical y hemocultivo de mujeres con fiebre puerperal. Puede cultivarse de otros sitios genitales: glándulas de Bartholin, endometrio, placenta, líq. Amniótico y secreciones del neonato.
CONJUNTIVITIS	<i>H. aegyptius</i> (relacionado con <i>H. Influenzae</i> biovar III)	Cultivo de saco conjuntival, Secreciones de fondo de saco.	Exudado conjuntival mucopurulento. Esclerótica intensamente enrojecida, sensación de raspado, visión borrosa por exudado. Lagrimeo excesivo y pesadez del párpado.

Tomado de: Koneman EW, 1988, (21)

8. IMPORTANCIA CLINICA DE *Haemophilus influenzae* .

El *H. influenzae* ocupa del primero al segundo lugar, por frecuencia, en infecciones tales como: 1) la meningitis, 2) meningoencefalitis purulenta, 3) otitis aguda, 4) neumonía, 5) laringotraqueitis, 6) epiglotitis, 7) nasofaringoconjuntivitis, 8) septicemia ^{1,5,6,7,23,25-31}

1) *Meningitis: H. influenzae* es el agente etiológico más frecuente de meningitis bacteriana en la población de menores de dos años (excepto neonato). Se calcula que en los Estados Unidos de Norteamérica, se presentan alrededor de 20,000 casos de meningitis por este microorganismo de los cuales mueren 1000.^{11,27} En Chile se reporta una incidencia de enfermedades invasoras por éste patógeno de 22 casos/ 100,000 en niños menores de cinco años, con una mortalidad de 16%.^{11,23,27} La mortalidad es alta y las secuelas neurológicas que provoca son en su mayoría irreversibles, siendo esta bacteria aislada en 47% de los casos en niños entre 1 mes y 13 años de edad³². El 5% de los niños con meningitis muere y del 10 al 20% sufre secuelas neurológicas ²³.

2) *Meningoencefalitis purulenta*: la meningitis purulenta es un padecimiento de alta letalidad, que varía de 10-15% en los lactantes y hasta 25 a 30% en el recién nacido. La enfermedad da lugar a secuelas neurológicas incapacitantes en la tercera parte de los sobrevivientes. En 80% de los niños menores de dos años es ocasionada por gérmenes gramnegativos, el 73% obedecen a *S.pneumoniae* y a *H. influenzae* . Entre las edades de siete meses a cinco años, el 83% corresponde a *H. influenzae* y a *S. pneumoniae* ^{31,47,50,52}. En estudios realizados (el 70% de las frecuencias etiológicas fue para *H. influenzae* tipo b, 14% para *S. pneumoniae* y el 8% para enterobacterias³¹.

3) *Otitis aguda*: es quizá el proceso infeccioso más frecuente en los primeros dos años de edad, sólo superado por las diarreas. Estudios epidemiológicos han demostrado que es excepcional que un niño llegue a los dos años de edad sin haber tenido más de un cuadro de otitis aguda ^{1,28}. El *H. influenzae* representa el 20-35% en la etiología de la otitis, la mayoría (más del 70%) son no tipificables, el tipo b de éste microorganismo varía de 5 al 20%; en estas condiciones es un antecedente positivo previo en niños que desarrollan meningitis o septicemia.^{1,47,49-50} En México, un estudio de revisión del número de casos reportados de 1995-1998 muestra que una tasa promedio por 100 mil habitantes más elevada ocurrió en lactantes menores de 1 año (1200), disminuyendo en niños de 1 a 4 años de edad (1083) y a 524 en el grupo de 5 a 14 años de edad¹.

4) *Neumonía: H. influenzae* ocupa el tercer o cuarto lugar en la etiología de este proceso. A semejanza de lo que ocurre con la otitis media, el tipo b no es frecuente; sin embargo cuando se encuentra, existe un 50% de posibilidades que sea beta-lactamasa positivo. Esta es una evidencia más de su invasibilidad. En México el grupo más afectado es el de 5 a 14 años, considerándolo como la segunda causa de morbilidad más importante ³. En 1995 se reporta un 5.6% de muertes infantiles por neumonías e influenza⁵⁷. En 1996 ocupa el sexto lugar de

las principales causas de enfermedades en grupos de 65 y más años de edad con 28,376 casos²³.

5) *Laringotraqueobronquitis*: la laringotraqueobronquitis (LTB) es una inflamación aguda de la laringe y tráquea que se inicia en rinofarínge, progresa hacia regiones inferiores del árbol respiratorio y produce diversos grados de obstrucción en las vías aéreas. Es conocida también como seudocrup, crup no diftérico, traqueítis, falso crup, laringitis aguda estornótica, laringitis aguda obstructiva y la laringotraqueobronquitis infecciosas agudas^{23,43} Es una enfermedad frecuente en la Ciudad de México, se puede decir que ocupa el tercer lugar de las enfermedades infantiles. Hasta el momento, el único germen claramente demostrado como causa de LTB es *Haemophilus influenzae* (CMN;IMSS)^{2,12,23}

6) *Epiglotitis*: es la obstrucción de vías aéreas superiores en evolución y puede llegar a requerir el uso de traqueotomía.

7) *Nasofaringoconjuntivitis*: es de las manifestaciones clínicas de evolución espontáneas y trivial más comunes, cada vez con más frecuencia *H. influenzae* tipo b se aísla de estos procesos y algunos de ellos son betalactamasa positivos. Esto tal vez sea el inicio de la colonización que antecede a la adherencia y posible diseminación, cuando los mecanismos de inmunidad local o humoral se encuentran inoperantes o son superados⁴⁴.

8) *Septicemia*. Las características de *H. influenzae* analizado permite establecer alta patogenicidad, virulencia e invasibilidad de este microorganismo. La falta de un procedimiento rutinario para efectuar hemocultivos, dificulta documentar la frecuencia real de la septicemia²³.

9. EPIDEMIOLOGÍA Y PANORAMA EPIDEMIOLOGICO.

En México según datos epidemiológicos de la Secretaría de Salud (8-12) Las enfermedades respiratorias agudas se encuentran entre las 20 principales causas de enfermedades a nivel nacional, asimismo como la otitis media, neumonías y bronconeumonías de los cuales se reportaron en el año 2004: 21,503,094, 272,029, 214,040 casos respectivamente. Los casos de meningitis a nivel nacional fueron 1,108 en el 2004. Recordando que *H. influenzae* es uno de los agentes etiológicos causantes de éstas infecciones.^{40,41,57} En el Anuario del 2002 se incluyeron en incidencia de casos nuevos de enfermedades las infecciones invasivas por *H. influenzae* con un total de 65 casos y Meningitis por *H. influenzae* con 26 casos resalta de esto la importancia actual de dicho patógeno en México. ⁸⁻¹²

H. influenzae es un agente etiológico frecuente de diversas infecciones humanas. Tradicionalmente se ha establecido que las cepas capsuladas, de *H.influenzae*, son las que se ven involucradas en procesos patológicos, y las no capsuladas forman parte de la flora bacteriana normal. Así mismo se ha dado como un hecho que el serotipo "b", sea el responsable de la mayoría de las infecciones graves. En la actualidad se sabe que, efectivamente, más de 80% de los *H.influenzae* recuperados de especímenes clínicos, son de cepas capsuladas y que en su mayoría corresponden al serotipo "b"¹⁻⁶.

El grado diferente de susceptibilidad también puede ser causado por la frecuencia y forma de exposición antigénica o a efectos concomitantes tales como infección viral previa, exposición a drogas y diferencias en el sistema inmunocompetente del hospedero. Por último se ha propuesto que la susceptibilidad a infecciones por *H. influenzae* puede estar genéticamente determinada²³.

Como se ha demostrado el *H. influenzae* es un agente etilógico importante por su frecuencia en muchas infecciones. Sin embargo, existen factores predisponentes a este tipo de infecciones tales como:

9.1. La edad:

Las edades que predisponen a la población a las infecciones por *H. influenzae* son en menores de 5 años principalmente y en ancianos de alrededor de 60 años. En general, se sabe que del 10 al 50% de los niños menores de 5 años están colonizados con cepas de este microorganismo y que la dispersión en la población tiene su expresión más elevada en la población pediátrica; alrededor de 80% de las infecciones se presentan en niños de tres meses a dos años de edad, 3 a 7 % pueden observarse en menores de tres meses de edad y de 10 al 15% o más puede presentarse por arriba de los dos años de edad. Se menciona que esto se debe a que en los primeros años de vida hay un cierto grado de inmadurez del sistema inmunitario, muy pronunciado en el neonato y durante el primer trimestre, lo cuál sólo alcanza niveles aceptables entre los 6 y 12 meses de vida. En niños mexicanos, del 66 al 75% de todas las infecciones sistémicas causadas por *H. influenzae* ocurren en menores de 18 meses. El pico de mayor incidencia de meningitis y de otras enfermedades invasivas se da en los niños de 5 a 8 meses de edad; en general los menores de 18 meses son más susceptibles de tener meningitis que otras infecciones, mientras que la epiglotitis es más probable en niños mayores y la máxima incidencia se encuentra a los 3 años.^{8-13, 23}

Los ataques secundarios en la población expuesta son más frecuentes en los niños menores de un año de edad. Además existe una alta transmisibilidad de infecciones por este microorganismo entre contactos susceptibles en poblaciones de alto riesgo como *guarderías y salas pediátricas*.

En general, la dispersión en la población tiene su mayor expresión en la población pediátrica, aproximadamente el 80% de las infecciones se presentan en niños de 3 meses a dos años de edad, 3-7 % pueden observarse en menores de 3 meses de edad, reportándose además un 11% de colonización por *H. influenzae* no tipificable en niños menores a 2 años de vida y 10-15% o incluso más si se presenta por arriba de los dos años de edad.^{8-12,39,40}

La infección por esta bacteria en la población adulta son raras, pero pueden provocar hasta un 30% de infecciones respiratorias graves en los ancianos si ocurre infección por *H. influenzae* en mayores de 60 años, se caracteriza por procesos que tienen incidencia a prolongarse o que son francamente crónicos, sobre todo en vías respiratorias inferiores puede ser mortal hasta un 85%.^{1,3,6-8,13,31,44,49}

9.2. El sexo:

Takala y col. en 1989 reportaron que las tasas de incidencia de infecciones invasivas por *H. influenzae* parece ser mayor en pacientes masculinos que en femeninos. Sin que se hayan determinado las causas la predisposición de infecciones **por sexo**, predominan en varones.^{3,8-12,53}

9.3. La época del año:

Se menciona que las infecciones respiratorias por gram-negativos se presentan durante todo el año, señalando las estaciones otoño-invierno como las que presentan frecuencias más altas, debido a que son las estaciones más frías del año. En estudios realizados se determinó que la mortalidad mas alta se da en invierno, y los valores más bajos en los meses de verano y en los comienzos del otoño. En nuestro país, se ha aislado hasta un 21% de *H. influenzae* con una distribución estacional en invierno; en neumonías que tienen una defunción de hasta el 50%.^{3,13,39}

9.4. La desnutrición:

Otro factor predisponente es la desnutrición de 2do y 3er grado, relacionada por las condiciones socioeconómicas del país ya que favorece las infecciones respiratorias por gram negativos (*H. influenzae*) afectando los mecanismos de defensa orgánicos y en especial, al deprimir la fagocitosis y la inmunidad celular³.

9.5. Virosis respiratorias previas:

Facilitan la sobreinfección pulmonar al interferir con el sistema inmunitario, en particular con el sistema de arrastre mucociliar, al determinar discrinia y paresia ciliar, con un déficit consecuente en la depuración broncopulmonar de bacterias¹⁴⁻²².

9.6. Tratamientos con antibióticos:

En general, si son prolongados y por vía bucal determinan con frecuencia la ruptura del equilibrio biológico de la microflora faríngea e intestinal, facilitando la emergencia en la flora fecal de gérmenes patógenos y la colonización posterior, desencadenando bajo condiciones favorecidas la infección^{13,33,42}.

9.7. Predisposición por hospitalización:

Se debe a que el hospital aporta factores predisponentes para la colonización e infección del aparato broncopulmonar, al poner en contacto al paciente con reservorios y vectores de gérmenes, al abrir brechas orgánicas para la penetración de los mismos y al afectar los mecanismos de defensa del huésped. Tras varios días de hospitalización la flora faríngea gram-positiva aerobia normal, es reemplazada parcialmente por las bacterias gram-negativas (entre ellos *H. influenzae*)³.

9.8. Factores genéticos y de raza que se consideran como un riesgo potencial para adquirir la enfermedad por *H. influenzae*. Estudios realizados en Alaska, demostraron que la incidencia de las infecciones por este microorganismo en niños esquimales menores de 5 años era de 282/100,000 habitantes, mientras que en niños no esquimales era de 50-70/100,000 habitantes. Se ha encontrado una mayor frecuencia en indios navajos y apaches en comparación a la población en general, que aparentemente está relacionada con factores genéticos que aún no están bien definidos. Otros estudios han demostrado un "mayor riesgo" para las poblaciones de origen hispano, aunque en estos casos parece deberse más a problemas sociales y económicos relacionados con la desnutrición y hacinamiento que con factores genéticos.^{3,24-27}

Además, se consideran factores predisponentes a las infecciones por *H. influenzae*^{27,29}:

- a) Anemia drepanocítica.
- b) Diabetes mellitus.
- c) Cirrosis.
- d) Alcoholismo.
- e) Premadurez en neonatos.
- f) Ruptura prolongada en membranas durante el parto.
- g) Disfunción fisiológica de la trompa de Eustaquio.
- h) Factores raciales.
- i) Enfermedad obstructiva pulmonar crónica.
- j) Uso indiscriminado de antibióticos.
- k) Daño de la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares (Nicotina del tabaco).
- l) Mieloma múltiple.
- m) Disturbios en la circulación sanguínea.
- n) Enfermedades debilitantes crónicas.
- o) Agammaglobulinemia.
- p) Defectos de función de fagocitos.

La prevalencia de *H. influenzae* en población sana es variable, con cifras que van de 15 hasta más de 50%^{1,3}. En estudios recientes se ha determinado en población sana en 21% de portadores^{2,13,30}.

La utilidad epidemiológica de la tipificación bioquímica^{3,8,13,38}, implica considerar a cualquier *H. influenzae* perteneciente al biotipo I como una cepa que independientemente de la presencia de cápsula, es capaz de ser el responsable de un proceso patológico grave.

En investigaciones realizadas en nuestro país^{22,27,40,42} uno de cada cuatro o cinco individuos son portadores de *H. influenzae*. La mayoría de las cepas de este microorganismo que colonizan las vías respiratorias están desprovistas de cápsula y por lo mismo no tipificables, asimismo, la mayor prevalencia (60%) de las cepas del tipo b, se recuperan de procesos severos, mientras que los demás serotipos son patógenos ocasionales de procesos graves. Sin embargo la impresión general es que la frecuencia de las infecciones graves va en aumento y que ahora se recuperan otros serotipos, que en años pasados eran prioritarios del tipo b, ver cuadro 4.

CUADRO 4 FRECUENCIA DE LAS INFECCIONES POR *H.influenzae*

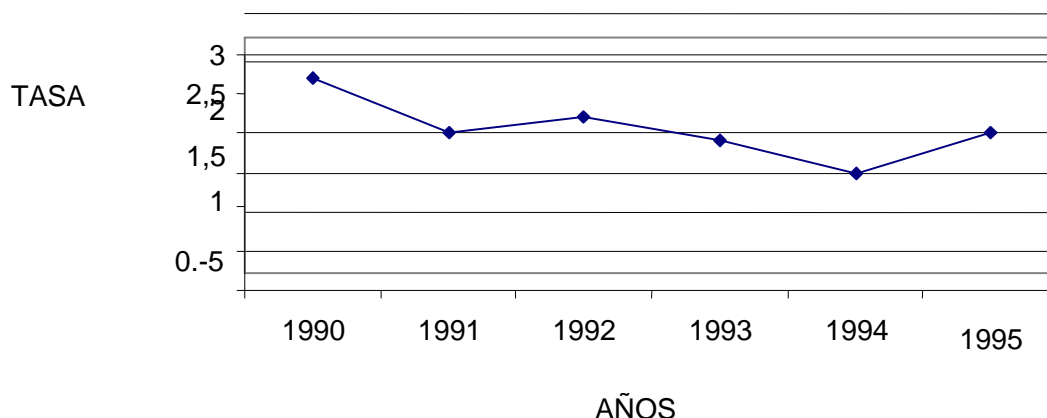
SEROTIPO	PREVALENCIA
A	11.5%
B	60%
C	3%
D	2%
F	11.5%

*NOTA: NO SE REGISTRO FRECUENCIA DEL SEROTIPO e.

TOMADO DE : HAEMOPHILUS FRONTERA DE INVESTIGACIÓN UAM XOCHIMILCO.(58)

La tendencia de la morbilidad por meningitis en México, durante el período 1990-1995, es descendente, sin embargo se debe tomar en cuenta que para 1990-1993, la morbilidad es por todas las meningitis (CIE 320-322) y a partir de 1994 sólo se tomaron las meningitis por *H. influenzae* b²³, ver gráfica 1.

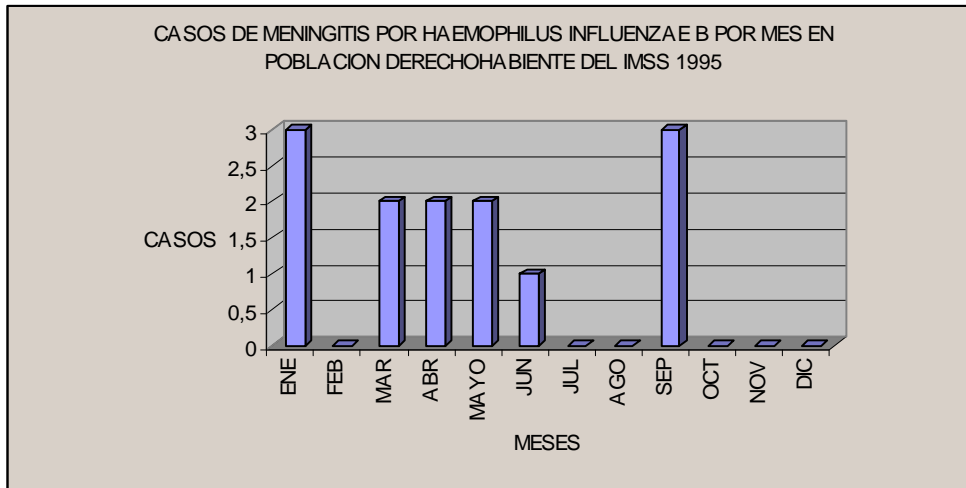
GRAFICA 1 TENDENCIAS DE MORBILIDAD POR MENINGITIS EN LA POBLACIÓN DERECHOHABIENTE DEL IMSS



POR 100 000 DERECHOHABIENTES

La mayor proporción de los casos se registró durante los meses de enero y septiembre²³, ver gráfica 2.

GRAFICA 2

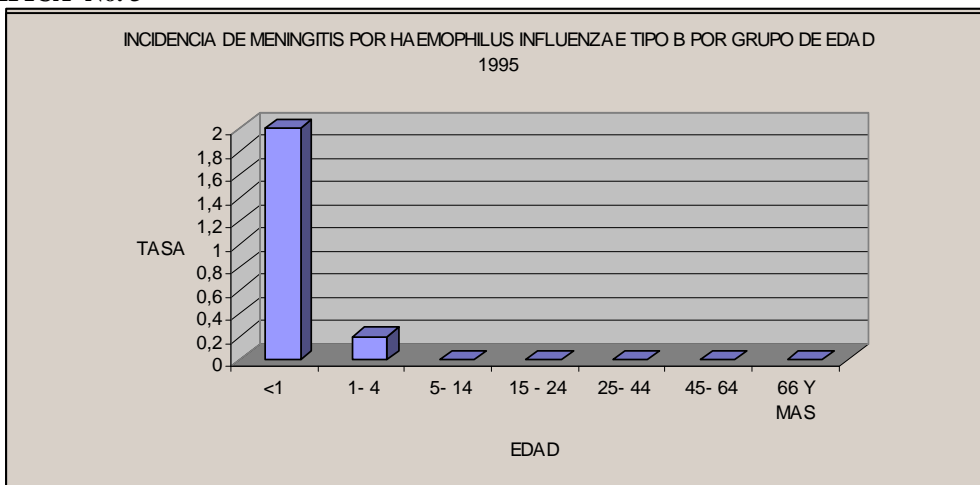


Tomado de Guía Técnica y Procedimientos para la aplicación de productos biológicos (23)

Para 1995, sólo la delegación de Baja California reportó la tasa de incidencia más alta (tasa: 0.6630-0.8844 por 100,000 Derecho Habientes).

Como puede observarse en la gráfica 3, el grupo de edad más afectado fue el de los menores de un año, seguido del de 1 a 4 años datos que son congruentes con lo reportado por la literatura nacional e internacional.

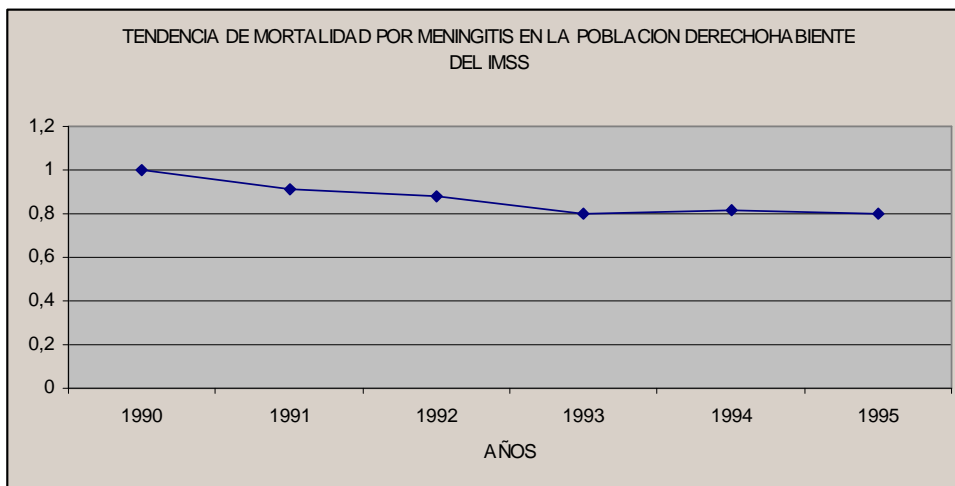
GRAFICA No. 3



Tomado de Guía Técnica y Procedimientos para la aplicación de productos biológicos (23)

Durante el período 1990-1995, la tendencia de mortalidad por meningitis presenta una línea descendente, cabe señalar que durante el período 1990-1993, se utilizaron los registros por todas las meningitis (CIE 320-322) y para 1994-95 sólo defunciones por *H.influenzae* tipo b , ver gráfica 4.

GRAFICA No. 4



Tomado de Guía Técnica y Procedimientos para la aplicación de productos biológicos (23)

A nivel internacional estudios realizados muestran las siguientes tendencias, ver cuadro 5:

CUADRO No. 5
FRECUECIA DE PORTADORES DE *H. influenzae* EN POBLACION INFANTIL

AUTOR	AÑO	No.DE MUESTRAS	PAIS	EDAD	<u>H. influenzae</u> (%)
Murphy TV y col.	1981	66	EE UU	menores de 4	10
Guiscafre y col.	1981	800	MEXICO	menores de 5	14.6
Calderòn y Carmolinga	1982	218	MEXICO	--	20
Sosa-Iglesias	1987	232	MEXICO	menores de 6	31.7
Moreno, Giono y col.	1990	402	MEXICO	menores de 13	6.7

TOMADO De la publicación técnica del Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos (13)

10. DIAGNÓSTICO.

H. influenzae es responsable de gran variedad de infecciones, las cuales pueden tener un curso a menudo dramático y extremadamente grave, de tal manera que es muy importante diagnosticar la infección oportunamente, a fin de iniciar el tratamiento apropiado y evitar las secuelas como también las complicaciones que pueden llevar al paciente a la muerte¹⁻³.

Las cepas de *H. influenzae* capsuladas se puede identificar por técnicas rápidas, a diferencia de las cepas no capsuladas (no tipificables). Las cepas se clasifican en base con la composición química de su polisacárido capsular. Las ventajas de estas técnicas es que pueden realizarse en el producto clínico mismo (pruebas rápidas de identificación) o con las bacterias aisladas en el primoaislamiento.

Los métodos para llevarlas a cabo utilizan antisueros tipificadores bien definidos y pueden hacerse directamente sobre la bacteria aislada (coaglutinación y aglutinación en látex), o bien con el polisacárido puro (contrainmunolectroforesis y precipitación en capilar)¹³⁻¹⁴.

Es un microorganismo nutricionalmente exigente por lo cual deben seguirse con mucho cuidado los procedimientos y las indicaciones para su aislamiento, ya que esto es determinante para lograr un diagnóstico oportuno. Para esto, básicamente se requiere de medios de cultivo selectivos que promuevan su crecimiento, en detrimento del resto de la flora habitual del sitio de donde se intenta su recuperación. Desde luego es imprescindible contar con programas de control de calidad en los laboratorios, de modo que se tenga la seguridad de disponer de medios efectivos y uniformes¹³.

La recuperación óptima de especies de *Haemophilus* de muestras clínicas depende del uso de técnicas de recolección y transporte, de medios de cultivo e incubación apropiados.

Dado que las especies de *Haemophilus* son susceptibles a la desecación y las temperaturas bajas, su recuperación de hisopados desecados o de muestras que se han refrigerado puede resultar severamente comprometida; por lo que deben inmediatamente procesarse. Más allá del medio bacteriológico empleado, la recuperación óptima de especies de *Haemophilus* requiere incubación en un medio húmedo de dióxido de carbono aumentado (3-5%). Esto se logra con las modernas incubadoras con dióxido de carbono o jarras con vela.^{3,13}

Sólo el cultivo permite establecer el diagnóstico etiológico definitivo^{3,13}. Los miembros del género *Haemophilus* requieren factores de crecimiento que están presentes en la sangre. Algunas especies de *Haemophilus* requieren **factor X**, que probablemente no sea solo una sustancia sino más bien un grupo de compuestos tetrapirrólicos termoestables que son proporcionados por diversos pigmentos que contienen hierro (por ejemplo., hemina y hematina).

Los compuestos del factor X se usan en la síntesis de catalasa, peroxidasa y el sistema de transporte de electrones de citocromos. Los microorganismos que

dependen del factor X exógeno para su crecimiento, son incapaces de sintetizar protoporfirina a partir de ácido gamma-aminolevulínico(ALA), una reacción bioquímica que sirve como base de la prueba de ALA-porfirinas. Algunas especies de *Haemophilus* también pueden requerir **factor v** (dinucleótido de nicotinamida y adenina NAD, coenzima 1) o NAD fosfato (coenzima II). El factor V es biosintetizado en gran cantidad por diferentes microorganismos, entre ellos bacterias (*Staphylococcus aureus*), levaduras, tejidos animales y vegetales.

Los factores X y V se hallan en células sanguíneas, incluyendo eritrocitos de carnero en fórmulas de agar sangre, usadas de rutina en laboratorios clínicos. La sangre de carnero y de otros animales también contienen enzimas que hidrolizan lentamente e inactivan el factor V. Como consecuencia, las especies de *Haemophilus* dependientes del factor V en general no crecen en agar sangre de rutina en el cuál los eritrocitos están intactos. El calentamiento suave durante el agregado de la sangre a una base de agar fundido da como resultado la lisis de los eritrocitos, la liberación de factores X y V y la inactivación de enzimas que pueden destruir al factor V. Otros requerimientos nutricionales para el crecimiento de *Haemophilus* son: ácido pantotémico, tiamina, uracilo, purina y cistina.^{1,3,14-22}

Si bien muchas especies de *Haemophilus* no son capaces de crecer en agar sangre de carnero, en este medio pueden verse diminutas colonias como un crecimiento puntiforme alrededor de colonias de otros microorganismos en cultivos mixtos. Por otra parte, la sangre de conejo o caballo no contienen las enzimas inhibitorias de la sangre de carnero, y medios con estas sangres pueden avalar el crecimiento de muchas especies de *Haemophilus*.^{3,14,24-26}

Las sangres de conejo y caballo no se usan habitualmente en los laboratorios para la evaluación de rutina de muestras de esputo y material faríngeo; por ende, pueden emplearse otros medios o técnicas para la recuperación de *H. influenzae* de estos especímenes.

H. influenzae es un microorganismo nutricionalmente exigente, por lo cual deben seguirse con mucho cuidado los procedimientos y las indicaciones para su aislamiento, ya que esto es determinante para lograr un diagnóstico oportuno. Para esto, básicamente se requiere de medios de cultivo selectivos que promuevan su crecimiento rápido, en detrimento del resto de la flora habitual del sitio donde se intenta su recuperación. Desde luego es necesario contar con programas de control de calidad en los laboratorios, de modo que se tenga siempre la seguridad de disponer de medios efectivos y uniformes¹³. La recuperación óptima de especies de *Haemophilus* de muestras clínicas depende del uso de técnicas de recolección y transporte, medios de cultivo e incubación apropiados.

10.1. TOMA DE MUESTRA.

La recolección correcta de una muestra para el cultivo es posiblemente la etapa más importante del aislamiento del agente responsable de la enfermedad infecciosa.

El caso de *H. influenzae* no es la excepción y así, una muestra deficientemente colectada puede ser el motivo del fracaso del aislamiento del microorganismo causal y la recuperación de contaminantes que dan un diagnóstico erróneo¹⁴⁻¹⁷.

Las muestras clínicas a partir de las cuales puede aislarse *Haemophilus* son:

- **Cultivo de farínge.**

El procedimiento correcto para obtener exudado de farínge consiste en colocar al paciente sentado, inclinar su cabeza hacia atrás y pedirle que abra la boca. Se observa su garganta utilizando una buena iluminación, se empuja la lengua hacia abajo de modo que pueda observarse la parte posterior de la garganta. Se frota el hisopo de arriba hacia abajo contra la parte posterior de la garganta y contra cualquier mancha blanca que se encuentre en las amígdalas. Debe evitarse que el hisopo toque la lengua y los carrillos.

- **Cultivo de Nasofaringe.**

Se coloca al paciente sentado, se inclina ligeramente la cabeza hacia atrás, se introduce un hisopo por cada una de las fosas nasales perpendicularmente a la nariz hasta llegar a nasofarínge (generalmente cuando hay lagrimeo).

- **Cultivo de Espudo.**

Se coloca la muestra en un recipiente de boca ancha estéril. Para esto, de las porciones sanguinolentas y purulentas se hace un frotis y se observa en fresco a seco fuerte para contar el número de leucocitos y células epiteliales presentes y clasificarla de acuerdo con el criterio de Welch y Kelly, que se muestra en el cuadro 6. Se tiñe por la técnica de Gram para determinar morfotipos bacterianos predominantes y solamente se procesan las muestras que pertenezcan a las clases II y III^{13,21-22}.

CLASE	GRUPO	CELULAS EPITELIALES	LEUCOCITOS
I	0	menos de 25	menos de 25
	1	más de 25	menos de 10
	2	más de 25	10-25
II	3	más de 25	más de 25
III	4	10-25	más de 25
	5	menos de 10	más de 25
	6	menos de 25	más de 25

Cuadro 6 CLASIFICACIÓN DEL ESPUTO SEGUN WELCH Y KELLY

TOMADO DE :SOSA-IGLESIAS, GIONO CS, ESCOBAR GA, INDRE No. 19(13).

Antes de sembrar las muestras muy espesas, se recomienda digerirlas mediante el tratamiento con un volumen igual de N-acetil cisteína al 0.5% durante 30 minutos o con un volumen igual de pancreatina al 0.2% con agitación por una hora a 37°C.

- **Aspiración Transcricotiroidea.**

La aspiración transcricotiroidea sólo se recomienda: 1) en pacientes debilitados que no pueden expectorar espontáneamente una muestra de esputo; 2) si la muestra de esputo no ha servido para aislar un organismo causal en una neumonía bacteriana clínica; 3) si se sospecha de una infección pulmonar anaerobia. Se toma el aspirado y antes de sembrarlo se clasifica según los criterios de Welch y Kelly.

- **Broncoscopio.**

Es otra técnica que se puede usar para obtener muestras en abscesos y/o granulomas infectados en partes profundas del pulmón, sin embargo los resultados pueden ser difíciles de interpretar debido a la contaminación del instrumento durante el paso transoral.

- **Toracocentesis.**

En algunas de las infecciones del sistema respiratorio se presenta derrame pleural, en este caso el líquido pleural para estudio bacteriológico es tomado por toracentesis.

- **Cultivo del conducto auditivo.**

Los cultivos del conducto auditivo externo generalmente no reflejan la causa bacteriana de otitis media, a menos que haya habido rotura reciente de la membrana timpánica y se observe secreción. Cuando la membrana está intacta, se recomienda que la muestra sea tomada por un otorrinolaringólogo por medio de timpanocentesis. De cualquier modo, deberán de tomarse precauciones extremas de esterilidad y limpieza previa del conducto auditivo externo.

- **Hemocultivo.**

El sitio de venipunción debe desinfectarse convenientemente. Una preparación óptima de la piel para evitar contaminación comprende:

- a) Lavar el área con abundante agua y jabón
- b) Aplicar tintura de yodo y dejar secar
- c) Realizar un lavado con alcohol para eliminar el yodo.

- **Cultivo de Líquido Cefalorraquídeo**

El líquido cefalorraquídeo (LCR) debe ser obtenido por punción lumbar, que tiene que ser llevada a cabo por personal específicamente entrenado. Luego de desinfectar la zona lumbar, se tiene que colocar al paciente en posición fetal y se hace la punción y el líquido se recoge en un recipiente estéril. En caso de una demora en procesar la muestra, el LCR se mantiene a 37°C. **La refrigeración está contraindicada** debido al efecto letal del frío sobre las especies bacterianas que con mayor frecuencia causan meningitis: *N. meningitidis* y *H. influenzae*^{13,20-25}.

10.2 .TRANSPORTE DEL PRODUCTO.

Para el transporte de muestras que se sospecha contienen *H. influenzae* puede utilizarse el medio de transporte **Stuart** en el cuál el hisopo puede permanecer no más de 2 horas a temperatura ambiente (precaución: **nunca congelarla o refrigerarla**). Este medio está diseñado para preservar la viabilidad de bacterias durante su transporte, sin multiplicación significativa de los microorganismos¹³⁻¹⁶.

10.3. EXAMEN DIRECTO DEL MATERIAL CLÍNICO.

TINCIÓN DE GRAM Y CON AZUL DE METILENO

Puede hacerse un diagnóstico presuntivo rápido de infección por *H. influenzae* por medio del exámen directo del material clínico apropiado usando tinción de Gram. Se fija al calor y se efectúa la tinción de Gram. Los microorganismos de *Haemophilus* se ven como pequeños cocobacilos gramnegativos, pálidamente teñidos. En ocasiones es posible observar como delgados filamentos teñidos de forma variable. Debido a su pleomorfismo y mala captación de la contratinción con safranina, un frotis simultáneo con azul de metileno ayuda detectar a los microorganismos. Con esta tinción los microorganismos se ven como cocobacilos azul-negros contra fondo azul-gris claro^{21,22,38}.

10.4. AISLAMIENTO .

El aislamiento primario de especies de *Haemophilus* en cultivos de muestras clínicas por lo común se logran mediante el empleo de medios que contengan los factores X y V tales como los siguientes ^{8,13,14,40,61}:

- Agar-chocolate
- Gelosa chocolate enriquecida
- Gelosa-chocolate vancomicina
- Gelosa sangre de caballo
- Gelosa sangre de conejo
- Gelosa Levinthal
- Agar para aislamiento de *H. influenzae* (Casman)
- Agar de enriquecimiento de Fildes
- Gelosa-hemina-bacitracina-extracto de levadura(GHBL)

10.4.1 El Agar-chocolate puede prepararse calentando una base de agar-sangre estéril a una temperatura (alrededor de 80°C) suficientemente alta como para lisar los eritrocitos de carnero y liberar los factores X y V. Debe evitarse un calentamiento prolongado ya que el factor V es termolábil.⁸

El Agar-chocolate obtenido por proveedores comerciales habitualmente es una mezcla sintética de hemoglobina (factor X) y un cocktail de factores de crecimiento químicamente definidos agregados a una base de agar GC (gonococos). También es conocido como **Gelosa Chocolate enriquecida** y los aditivos químicos definidos pueden conseguirse en el mercado con los nombres de Iso Vitalex (BBL Microbiology Systems, Cockeysville MD), Supplement B (Difco Laboratories, Detroit MI) y enriquecimiento CVA (Gibco Diagnostics, Madison, WI)^{3,13,21}. Una vez desarrolladas, las colonias son grises, semiopacas, lisas y convexas, usualmente de borde entero.

10.4.2 La Gelosa chocolate-vancomicina se prepara a partir de gelosa chocolate enriquecida (a 56°C) 100 ml, más 1.6 mg de vancomicina. Esto para eliminar el crecimiento de la flora normal de las vías respiratorias, haciendo más selectivo el medio¹³.

10.4.3 La Gelosa sangre de caballo o de conejo contiene base de gelosa sangre (100ml), sangre desfibrinada de caballo o de conejo (5ml), enriquecimiento de Fildes (2ml), Isovitalex o Bacto-suplemento (1ml) además de Bacitracina (500UI) y base de gelosa Columbia. En este medio las colonias son brillantes, color gris claro, secas, poco convexas; pero no totalmente planas, de 1 a 1.5 mm de diámetro. Tienen la característica de que al tocarlas con el asa, se desprende toda la colonia.

10.4.4 El agar- sangre de caballo de Casman, con la aplicación de un disco de 10 microgramos de bacitracina en el área de inoculación más abundante, es considerado un medio alternativo para el aislamiento selectivo de especies de *Haemophilus*, principalmente cuando hay un crecimiento mixto de bacterias, en este medio pueden detectarse las propiedades hemolíticas. El medio de Casman contiene peptonas, extracto de carne, glucosa, cloruro de sodio y 1.35% de agar. Se agrega nicotinamida y almidón de maíz para incrementar el crecimiento de *Haemophilus* y se agrega sangre de caballo o de conejo para proporcionar el factor X y detectar hemolisis^{1,13,21}.

10.4.5 El medio de Levinthal es un extracto de sangre desfibrinada de caballo preparado por ebullición. Contiene Agar proteosa No. 3, infusión cerebro corazón (BHI) y sangre desfibrinada de conejo, es un medio enriquecido para facilitar el crecimiento de bacterias de difícil desarrollo como *Haemophilus* y Neisserias¹⁴.

10.4.6 El enriquecimiento de Fildes es un digerido péptidico de sangre de carnero con cloruro de sodio, pepsina granular y ácido clorhídrico. Se puede

añadir al agar para el aislamiento de especies de *Haemophilus* como la infusión cerebro corazón y al agar soya tripticaseína a una concentración final del 5 al 10% obteniendo un medio traslúcido. El enriquecimiento de Fildes contiene factores X y V, lo que evita la necesidad de agregar sangre entera al medio, por lo que no pueden determinarse las propiedades hemolíticas^{3,13,21,27}.

A los medios de Levintal y Fildes puede adicionárseles antibióticos como la bacitracina (300 microg/ml) para hacerlos más selectivos en el aislamiento de *Haemophilus*.

10.4.7 La gelosa hemina bacitracina extracto de levadura es un medio de cultivo que favorece el aislamiento de *Haemophilus*. La hemina equina que contiene, suministra factor X y se le colocan discos de papel filtro impregnados con extracto de levadura como fuente del factor V, el cual se difunde en el medio y favorece el desarrollo en "satélite" de las colonias características además la bacitracina inhibe la flora autóctona Gram-positiva y esto le da un carácter selectivo al medio, lo que se acentúa si se incuba en anaerobiosis para inhibir microorganismos aerobios estrictos y facultativos (*H. influenzae*)^{13,26}.

10.5. IDENTIFICACION DE ESPECIES DE *Haemophilus*.

Una vez demostrado que se trata de bacterias Gram-negativas sospechosas, para confirmarlo y diferenciar las especies de importancia clínica se utilizan varios tipos de pruebas, seguidas de otras más especializadas pero que muchas veces son muy necesarias.

Las primeras características que se determinan son:

1. Requerimientos de factores X y V
2. Reacciones hemolíticas en sangre de caballo o conejo
3. Requerimientos de tensión de dióxido de carbono

10.5.1. DETERMINACION DE REQUERIMIENTOS DE FACTORES X Y V.

La característica más distintiva de *H. influenzae* es el requerimiento de los factores X y V para su desarrollo y para determinarlo se utiliza cualquiera de los tres procedimientos siguientes:

- Crecimiento satélite (satelitismo) a colonias de *Staphylococcus aureus*
- Crecimiento satélite a discos o tiras impregnadas con factores X y V
- Prueba de la producción de porfirina

10.5.1.1. SATELITISMO A COLONIAS DE *Staphylococcus aureus*.

El fenómeno de satelitismo se basa en que numerosos microorganismos entre ellos las especies de *Staphylococcus*, *Neisserias* y algunas levaduras sintetizan y secretan NAD (factor V) durante su crecimiento en medios bacteriológicos, mientras que el agar suministra el factor X.

Procedimiento e interpretación ver apéndice.

10.5.1.2. SATELITISMO A DISCOS O TIRAS DE PAPEL IMPREGNADOS CON FACTORES X Y V.

En el comercio hay tiras o discos de papel filtro impregnados con los factores X o V hidrosolubles que se difunden fácilmente en el agar del medio de cultivo. Los discos o tiras se colocan en la superficie de un medio deficiente en dichos factores, inoculados previamente con el organismo en estudio.

La dependencia de los factores X y V de la bacteria se determina observando el patrón de desarrollo de las colonias alrededor del papel.

Procedimiento:

A partir del aislamiento puro de la especie por identificar, se prepara una suspensión de células bacterianas en caldo infusión de cerebro-corazón; con lo que se inocula por estría la superficie de una placa de agar de Mueller Hinton. Se colocan las tiras o discos X y V sobre la superficie del agar en el área de inoculación, a una distancia de 1 cm entre sí. Se incuba la placa a 35°C con tensión de CO₂ durante 24 hrs posteriormente se examina visualmente para comprobar el desarrollo visible alrededor de uno o ambos discos o tiras.

Se requieren como controles los factor X: *H. aphrophilus*, factor V: *H. parainfluenzae* y de ambos factores : *H. influenzae*. Procedimiento e interpretación ver apéndice.

10.5.1.3. PRUEBA DE LA PRODUCCIÓN DE PORFIRINAS.

Kilian ha descrito una prueba simple para diferenciar cepas de *Haemophilus* dependientes del factor X, basada en el principio de que dichas cepas carecen de la enzima porfobilinógeno sintetasa, que transforma el ácido δ -aminolevulínico en porfobilinógeno, una reacción inicial en la síntesis del grupo hemo. Por lo tanto, la detección de porfobilinógeno o porfirinas indican que la bacteria es capaz de efectuar la síntesis endógena del grupo hemo y no requiere una fuente exógena de factor X.

El ácido γ -aminolevulínico es la molécula precursora a partir de la cual se sintetizan el porfobilinógeno, las porfirinas y el hemo. Los microorganismos que poseen porfobilinógeno sintetasa pueden transformar el ácido- γ -aminolevulínico en porfobilinógeno el cual se puede determinar en el medio con el reactivo de Kovac Ehrlich modificado o se puede demostrar la presencia de porfirinas por la fluorescencia que emiten al ser excitadas por la luz ultravioleta.

Procedimiento:

Suspender una asada del microorganismo en estudio en 0.5 ml del substrato enzimático, incubar la mezcla a 35 ° C durante 4 hrs (suspensión concentrada) o 18 a 24 hrs (suspensión diluída). Finalizando el período de incubación añadir igual volumen de reactivo de Kovac y agitar la mezcla enérgicamente.

La aparición de un color rojo indica la presencia de porfobilinógeno y por lo tanto un resultado positivo, es decir, el organismo no requiere del factor X. Alternativamente, una fluorescencia roja al examinar el tubo con una lámpara de Wood, señala la presencia de porfirinas y también se le considera una prueba positiva.

10.5.2. REACCIONES HEMOLÍTICAS EN SANGRE DE CABALLO O CONEJO.

Algunas bacterias producen enzimas extracelulares que se unen a receptores de la superficie del eritrocito lisándolo completamente (beta hemólisis) o pueden producir una coloración verdosa alrededor de la colonia (alfa hemólisis o hemólisis incompleta) mientras que otras no producen efecto (gamma hemólisis o no hemolíticas). La producción de hemolisinas puede determinarse en placas de gelosa sangre y 5% de sangre total desfibrinada. La producción de hemolisinas es dependiente de la atmósfera de incubación ya que en su mayoría son oxígeno-lábiles y se requiere de condiciones anaérobicas para poner en evidencia su acción.

10.6. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA (IDENTIFICACIÓN DE BIOVARES).

Con base en los recursos con que se cuentan, las cepas que no logran identificarse por serología, se procesan bioquímicamente de acuerdo con los criterios de Kilian⁴⁰. Las cepas de *H. influenzae* fermentan los carbohidratos a pH final 5.3 a 5.9. Todas las cepas fermentan la glucosa con producción del ácido, pero no de gas; la mayoría de las cepas fermentan la xilosa, pero no fermentan la sacarosa, lactosa o manitol y son ácido sulfhídrico negativas. Recientemente se pretenden introducir como instrumento de caracterización de *H. influenzae* algunas de sus propiedades bioquímicas que son de utilidad práctica-diagnóstica para la subdivisión (cuadro 2) .

- Descarboxilación de la ornitina
- Producción de indol
- Producción de ureasa

10.6.1.PRODUCCION DE INDOL.

La producción de indol es importante para la identificación de muchas especies de microorganismos, siendo especialmente útil para diferenciar *E. coli* (positiva) de los miembros del grupo de *Klebsiella-Enterobacter* (la mayoría negativos). El indol es un bencilpirrol, producto de la degradación del triptófano y las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco.

La prueba del indol está basada en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído, contenido en los reactivos de Kovac y de Ehrlich. Se utiliza como sustrato un medio rico en triptófano. En la práctica se emplean medios como SIM, MIO o indol nitrato. ^{3,13,21,22,27}

Procedimiento e interpretación ver apéndice.

10.6.2. DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS.

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas sustrato específicas, que actúan sobre el carboxilo de los aminoácidos con la producción de bióxido de carbono como producto secundario. Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la lisina, ornitina y arginina son los que habitualmente se usan en la identificación de enterobacterias y vibrios. Las aminas específicas que producen, cadaverina a partir de lisina, putrescina cuando el sustrato es ornitina y citrulina en el caso de la arginina. En la conversión de arginina a citrulina interviene una dihidrolasa más una descarboxilasa, ya que primero se elimina un grupo amino de la arginina. La citrulina es transformada en ornitina que luego sufre descarboxilación para formar putrescina. ^{13,21}

10.6.3. HIDROLISIS DE LA UREA.

La urea es una diamina del ácido carbónico que puede ser hidrolizada por la enzima ureasa, existente en algunos grupos bacterianos, con liberación de amoníaco y dióxido de carbono.

El amoníaco en solución pasa a formar carbonato de amonio produciéndose una alcalinización del medio. El caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen, son los dos medios más comúnmente utilizados en los laboratorios clínicos para la determinación de la actividad de la ureasa. ^{13,21}

Procedimiento e interpretación ver apéndice.

La utilidad de este sistema de caracterización es que la cepa aislada de septicemia, meningitis, otitis media aguda y grave además de neumonía, pertenecen aproximadamente en 80% al biotipo I, 15-18% al II y 2-5% al III.

Las cepas aisladas de procesos infecciosos no graves como: faringitis, celulitis, sinusitis, otitis aguda no grave, epiglotitis y otras infecciones de tejidos superficiales, pertenecen 1-5% al biotipo I, 10-15% al II, 70-75% al III y el resto a los biotipos IV, V o VI. Las cepas aisladas de portadores sanos corresponden ocasionalmente a alguno de los biotipos del I al III, la mayoría son agrupados en los del IV al VI²⁹.

10. 7. PRUEBAS SEROLOGICAS.

El uso de métodos serológicos, para la identificación de cepas de *Haemophilus*, aún no se ha evaluado adecuadamente. Sin embargo, la identificación serológica tiene importancia sólo para cepas capsuladas. Existen diferentes métodos para identificar a los antígenos capsulares: inmunoprecipitación (doble difusión),

inmunolectroforesis, contrainmunolectroforesis, reacción de Quellung, inmunofluorescencia y aglutinación en placa⁴⁰.

Una vez que se ha aislado el microorganismo, el método más práctico para la serotipificación de cepas capsulares, es la aglutinación en placa. La suspensión celular usada para la prueba, se debe obtener a partir de un cultivo joven (6 a 18h), porque la estructura de la cápsula se pierde en cultivos viejos. Se utilizan sueros comerciales para la identificación y en caso de estudios de población abierta, se ha discriminado únicamente *H. influenzae* b o no b. Cuando se trate de cepas causantes de infección correspondiente a otros serotipos, siempre será de interés hacer la determinación correspondiente.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El aislamiento y caracterización de microorganismos patógenos en el laboratorio de microbiología clínica, requiere un alto grado de confiabilidad para el diagnóstico, siendo necesario la ampliación y el perfeccionamiento de los métodos a seguir en tales determinaciones para proporcionar la identidad del agente patógeno, y así elegir el tratamiento que inhiba el curso del microorganismo en cuestión.

Así pues *H. influenzae* (bacilo anaerobio facultativo y gram negativo) es uno de los microorganismos patógenos frecuentes en la población abierta. El bacilo es responsable de frecuentes infecciones de las vías aéreas altas y bajas en personas de cualquier edad principalmente en niños y adultos de edad avanzada, en los que puede provocar gran variedad de infecciones, daños permanentes e incluso la muerte, por lo que es importante su estudio y caracterización.

Este microorganismo necesita de complejos requerimientos nutricionales, por lo que para su identificación se necesita de medios de cultivo con nutrientes específicos, los cuales tienen un alto costo.

En los últimos años se han implementado medios de cultivo selectivos y técnicas de diagnóstico específicas para éste microorganismo pero la utilización de estos en laboratorios de bajos recursos queda limitado por razones económicas. Tal vez la aparente baja frecuencia de *H. influenzae* se debe a la baja proporción de unidades de salud que realizan el diagnóstico y no a una baja incidencia de infecciones por dicho microorganismo.

Por lo anterior se propone una metodología alternativa empleando un medio de cultivo eficiente para el aislamiento e identificación de *H. influenzae* a partir de reactivos y equipo básico que permitan su elaboración y utilización como medios de rutina en los laboratorios clínicos.

V. OBJETIVOS.

- Rediseñar la formulación de un medio de cultivo para favorecer el aislamiento de *Haemophilus influenzae* empleando los reactivos básicos del laboratorio clínico.
- Caracterizar a *Haemophilus influenzae* en biotipos mediante reacciones bioquímicas, como parte de la rutina de trabajo en el laboratorio.

VI. HIPOTESIS DE TRABAJO.

Tomando en cuenta las características necesarias que presenta el medio de cultivo rediseñado para el aislamiento de *Haemophilus influenzae*, supone que el medio alternativo a emplear será adecuado para la recuperación de dicho microorganismo debido a la similitud que presenta en relación con los comercialmente disponibles, pero que será de fácil elaboración y de bajo costo respecto a los medios comerciales.

VII. MATERIAL Y METODOS.

PRIMERA PARTE. FORMULACIÓN DEL SOPORTE DE CRECIMIENTO.

Se realizó un análisis comparativo de los medios comerciales recomendados para el crecimiento y aislamiento de *H. influenzae* en cuanto a medios, reactivos y equipos necesarios para su elaboración y factibilidad de elaboración en la UMAI "Estado de México", FES Zaragoza, UNAM.

Además se modificaron algunos de los requerimientos señalados en la bibliografía por otros más comunes de uso en la rutina de trabajo de los laboratorios de 1er nivel por costos y factibilidad de adquisición, variando las concentraciones de sangre y enriquecimiento e implementando antibióticos

SEGUNDA PARTE UTILIZACIÓN DEL MEDIO EN CULTIVOS DE EXUDADOS FARÍNGEOS.

1. Diseño de la Investigación

Se llevó a cabo un estudio de tipo transversal y descriptivo en 115 niños adscritos al Centro Educativo "Francisco Gabilondo Soler", kinder-guardería además de 38 adultos familiares y personal de la institución en Cd. Nezahualcoyotl, Estado de México. Se realizaron cultivos de exudados faríngeos con los siguientes criterios: 6 horas de ayuno mínimo, sin ingesta de antibióticos en la semana previa al estudio y sin aseo bucal .

Criterios de inclusión:

- 1) Niños de ambos sexos con consentimiento por parte de sus padres.
- 2) Individuos mayores de edad en contacto directo con uno o varios de los niños adscritos al CEIE y que además aceptaron participar en el estudio.

Criterios de exclusión:

Fueron excluidos:

- 1) Niños cuyos padres no autorizaron su participación en el estudio.
- 2) Individuos mayores de edad sin contacto directo con uno o varios de los niños adscritos al CEIE.
- 3) Todos aquellos que no cumplieran con las condiciones para el estudio:
 - Asistieron sin ayuno.
 - En tratamiento con antibióticos o haberlo abandonado en un plazo inferior a 7 días.
 - Con aseo bucal previo a la toma de los cultivos.

MATERIAL

1.- Material

a) De vidrio

- Cajas de Pétri
- Termómetro de vidrio de $-15-150^{\circ}\text{C}$
- Frascos goteros
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm (Pyrex)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipetas graduadas
- Pipetas volumétricas

b) Diverso

- Abatelenguas
- Aplicadores de madera
- Asas bacteriológicas
- Gradilla de acero inoxidable
- Mechero Fisher
- Tiras reactivas para medición de pH, escala 0-14 (/Merck)

c) Equipo

- Olla Presto 21 L.
- Balanza granataria Sartorius-Werke GMBH mod. 2842
- Incubadora Mapsa mod. EC-334
- Jarras de anaerobiosis
- Microscopio óptico científico One-Ten American Optical, Micro Star.
- Refrigerador General Electric GESAMEX
- Baño María Mapsa Mod. BMT-8

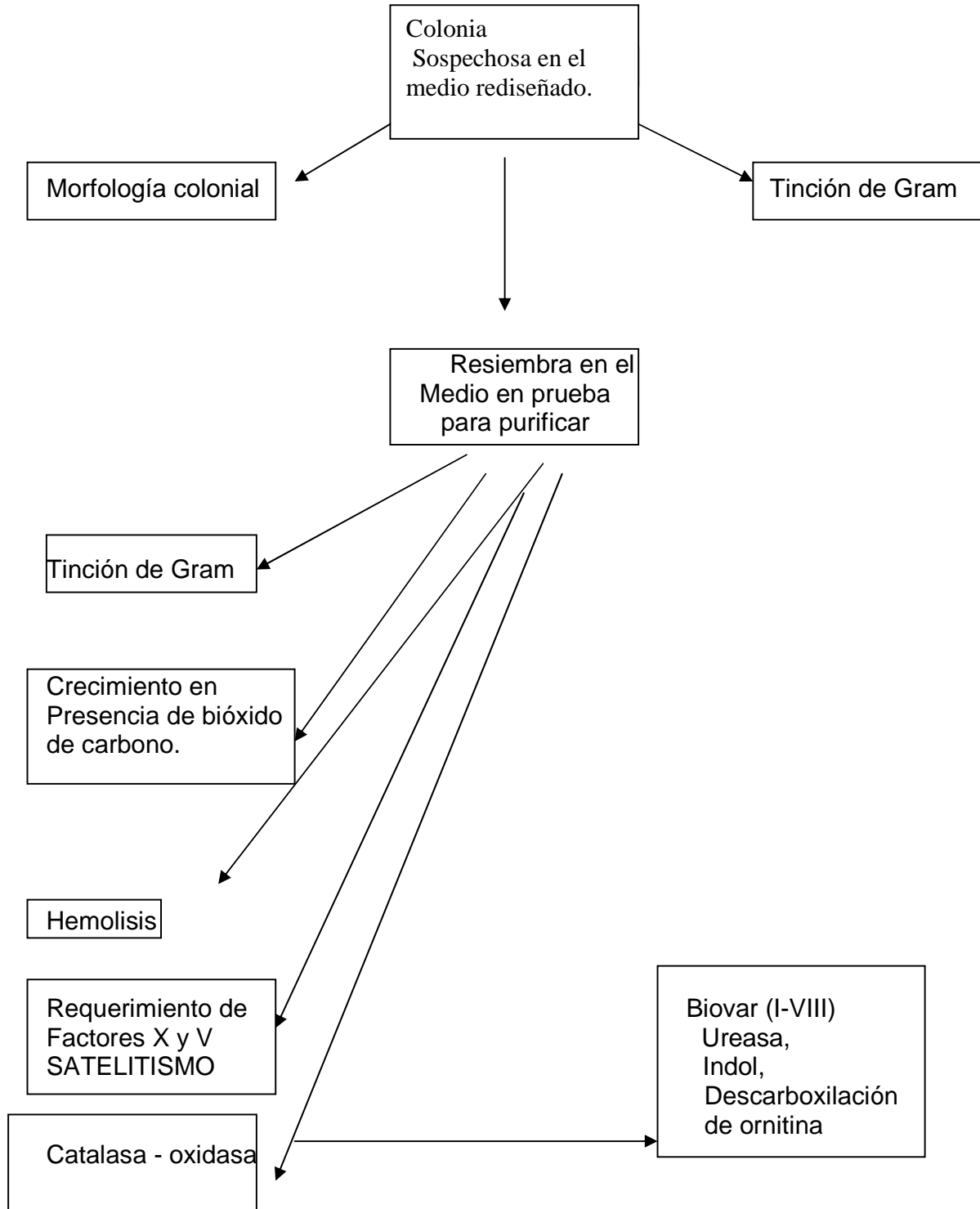
d) Reactivos

- Medio de transporte de Stuart BIOXON
- Base de agar Sangre BIOXON
- Agar Infusión cerebro corazón BIOXON
- Base de agar GC BIOXON
- Base de agar soya tripticaseína BIOXON
- Caldo urea BIOXON
- Medio MIO BIOXON
- Hemoglobina BIOXON
- Reactivos para coloración de Gram. SIGMA
- Hidróxido de sodio 20% BAKER ANALYZED
- Peróxido de hidrógeno BAKER ANALYZED
- Solución de NaCl (0.85%) BAKER ANALYZED
- Pepsina granular
- Aceite de Inmersión

a) Material biológico

- Cepa control de *Haemophilus influenzae* ATCC 10211
- Cepa de *Staphylococcus aureus*
- Sangre de carnero desfibrinada.

FIG 3 Diagrama de Identificación para *Haemophilus influenzae*



Tomado de Sosa Iglesias-Giono Cerezo y Escobar Gutierrez, Manual de Procedimientos para el aislamiento e identificación de *Haemophilus*, INDRE, 1992(14)

2. Técnicas.

1.-Se realizó un análisis diferencial así como de ventajas y desventajas de los medios comerciales recomendados en la bibliografía para el desarrollo de *H. influenzae* con el fin de determinar los medios, reactivos, materiales y equipos necesarios para su elaboración y así seleccionar los más convenientes para su proceso exacto y/o modificado en la UMAI "Estado de México", FES ZARAGOZA, UNAM. Ver tabla 1 y 2

*2.-Se elaboraron los medios seleccionados, algunos de los cuales se modificaron con medios y reactivos de uso más frecuente en la rutina de trabajo de los laboratorios de 1er nivel. Ver tabla 3

*3.-Se hace un análisis de crecimiento y costos de las bases de agar propuestos para los medios seleccionados. Ver tabla 4.

*4.- Se varía la concentración de enriquecimiento de Fildes y sangre de carnero para utilizar las concentraciones mínimas óptimas para el crecimiento de *H. influenzae*. Ver tablas 5 y 6.

5.- Se realizó la adición de Vancomicina como antibiótico selectivo a diferentes concentraciones Ver tabla 7. Ya que tiene acción bactericida contra *Staphylococcus incluso aureus y epiderminis*, *Streptococcus pyogenes*, *pneumoniae*, *viridans*, *bovis* y *Enterococcus faecales*, *Clostridium difficile*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Clostridium* y *Bacillus*. No es eficaz in vitro con bacilos Gram negativos.

*Estos procesos se desarrollaron con base al crecimiento de la cepa de *H. influenzae* y los controles de esterilidad.

Reformulación del medio de cultivo para el aislamiento de *H. influenzae*.

El requerimiento nutricional de los factores X y V distingue a *H. influenzae* de otras especies del género *Haemophilus*. En la sangre se encuentran estos factores, pero su obtención se hace por separado, debido a las características que presentan frente al calor. El factor X es termoestable por lo que se obtiene en el medio de agar sangre, en cambio el factor V no es termoestable y requiere de la ruptura de las células rojas para su liberación. Habitualmente esto se logra añadiendo sangre al medio aún caliente (sin rebasar los 65°C).

Principios

El medio de Levinthal es un extracto de sangre desfibrinada, preparada por ebullición. El enriquecimiento de Fildes es un digerido peptídico de sangre que contiene los factores V y X. Las técnicas de elaboración y la composición de estos medios se seleccionaron para fundamentar la reformulación del medio de cultivo para el crecimiento de *H. influenzae*

Preparación del enriquecimiento de Fildes:

a) Se mezclan en un frasco estéril 150 mL de NaCl 0.85% , 1 gramo de pepsina, 6 mL de HCl concentrado y 50 mL de sangre de carnero desfibrinada, se tapa y se calientan por 12 hrs. a 36°C en un baño María.

b) Después de ese tiempo se toma una alícuota y se mide el pH , ajustando a pH 7 con NaOH al 20%. Continuar ajustando a pH 7.2 con NaOH. Agregar 0,25 mL de cloroformo, mezclar y cerrar herméticamente, conservar en refrigeración a 4°C.

Preparación del Medio de Cultivo Levinthal modificado.

- a) Suspender 7.2 g del medio deshidratado (Base de Agar GC) en 100 mL de agua destilada para obtener una concentración doble. Mezclar y dejarla en reposo 10 a 15 minutos.
 - b) Calentar agitando con frecuencia y hervir aproximadamente durante un minuto.
 - c) Al mismo tiempo y en otro matraz pesar 5.2g del agar de infusión cerebro corazón en 100 mL de agua destilada.
 - d) En otro matraz, suspender y disolver 2.0 gramos de hemoglobina en 100 mL de agua destilada agitar utilizando en la solución perlas de vidrio hasta disolver los grumos de hemoglobina.
 - e) Esterilizar los preparados (a base , la infusión y la suspensión uniforme de hemoglobina) por separado en el autoclave a 121°C , 15 lbs de presión durante 15 minutos.
 - f) Enfriar las soluciones a 50°C. Vaciar la hemoglobina al agar GC poco a poco mediante filtrados en condiciones estériles.
 - g) Se mezclan la base de agar GC- hemoglobina y el extracto infusión cerebro corazón.
 - h) Agregar al producto achocolatado enriquecimiento de Fildes al 5%.
 - i) Finalmente se coloca en cajas de Petri estériles.
 - j) Teniendo la placas de agar, se le realiza la prueba de esterilidad
- Una vez demostrado que se trata de bacterias Gram-negativas y que se sospecha de *Haemophilus*, para confirmarlo y diferenciar las especies se utilizan las pruebas siguientes:

Características que se determinan son:

1. Requerimientos de factores X y V por medio de la prueba del satelitismo.

Procedimiento:

- a) Se inocula una placa de gelosa sangre y otra de agar soya tripticaseína con la cepa sospechosa de *H.influenzae* y se extiende sobre la superficie en estrías muy cerradas.
- b) Con una suspensión de *Staphylococcus aureus* no hemolítica, se siembra una estría única a la mitad de cada placa.
- c) Se incuban a 35°C con tensión de CO₂ durante 12 hrs y se busca el crecimiento de colonias típicas (punteiformes color crema, semiopacas, lisas, convexas) de *H.influenzae* en la cercanía de las estrías de *Staphylococcus aureus* que les provee el factor V y el agar sangre del factor X.

2. Reacciones hemolíticas en sangre.

La cepa bacteriana en estudio se siembra por estrías en gelosa sangre y se incuba 24-48 hrs a 37°C en baja tensión de CO₂. En estas condiciones *H.influenzae* no tiene acción hemolítica y eso lo diferencia de otras especies, especialmente de *H. haemolyticus* y de *H. paraahaemolyticus*.

3. Requerimiento de tensión de CO₂ sólo se verifica el desarrollo de crecimiento en presencia de bióxido de carbono. *H.influenzae* crece en óptimas condiciones bajo tensión de CO₂.

4. Prueba de la catalasa. Debido a la actividad de catalasa .

Se toma una asada y se deposita sobre un portaobjetos limpio y seco, inmediatamente se agrega una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la colonia depositada. Observar la formación de gas en la prueba positiva. *H.influenzae* es catalasa positiva.

5. Prueba de oxidasa. En el interior de una caja de petri, depositar una tira de papel filtro e impregnarlo con varias gotas de reactivo de oxidasa, tomar con un asa una pequeña porción de la colonia y frotarla sobre el papel impregnado. Observar en la prueba positiva el desarrollo de un color azul o púrpura en los primeros 10 segundos. *H.influenzae* es oxidasa positiva

Ya identificado el género y la especie Ver tablaa tipificación bioquímica para lo que se utilizaron tres pruebas que son de utilidad diagnóstica para la subdivisión en biotipos: descarboxilación de la ornitina, producción de indol y ureasa. Ver apéndice.

VIII. RESULTADOS.

PRIMERA PARTE. FORMULACIÓN DEL SOPORTE DE CRECIMIENTO.

A partir de la información obtenida en la bibliografía consultada se procede a analizar los procesos y requerimientos para la elaboración de los medios de cultivo para el crecimiento y aislamiento de *H.influenzae*.

Tabla 1

MEDIO	CONTENIDOS g/L	REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS ESPECIALES NECESARIOS PARA SU PREPARACIÓN.
AGAR CHOCOLATE ENRIQUECIDO CON VANCOMICINA	Base de agar sangre: Infusión de músculo cardiaco.....375 Peptona de carne.....10 Cloruro de sodio.....5 Agar.....15 Sangre desfibrinada estéril preferentemente de borrego o de conejo.	Polienuqueamiento Vancomicina Sangre de borrego o conejo.
GELOSA SANGRE DE CABALLO O DE CONEJO	Base de agar sangre: Infusión de músculo cardiaco.....375 Peptona de carne.....10 Cloruro de sodio.....5 Agar.....15 Sangre desfibrinada al 5%	Enriquecimiento de Fildes, Isovitalax o Bactro-suplemento. Bacitracina Base de gelosa Columbia Sangre de caballo o conejo.
AGAR SANGRE DE CABALLO DE CASMAN	Base de agar de Casman: Nicotinamida.....0.05 Polipeptona10 Peptona biotriptasa.....10 Extracto de carne.....3 Acido P-amino benzoico.....0.05 Glucosa.....0.5 Almidón de arroz.....1.0 Cloruro de sodio.....5.0 Agar purificado.....13.5 Sangre de caballo o de conejo.	Base de agar de Casman. Sangre de caballo o conejo
MEDIO DE LEVINTHAL	Sangre desfibrinada de caballo Base de agar Proteosa No. 3: Mezcla de peptonas.....20 Dextrosa.....0.5 Cloruro de sodio.....5 Fosfato de sodio.....5 Agar.....15 Base de agar GC: Mezcla de peptonas.....15 Almidón de maíz.....1 Fosfato dipotásico.....4 Fosfato monopotásico.....1 Cloruro de sodio.....5 Agar.....10	Base de gelosa Proteosa No. 3 , Agar Columbia o GC Sangre de Caballo.

<p>ENRIQUECIMIENTO DE FILDES</p>	<p>Enriquecimiento de Fildes: Cloruro de sodio(0.85%).....1.275 Pepsina granular.....1 Sangre de carnero.....50mL Acido clorhídrico conc.....6mL Base de agar Infusión cerebro corazón: Infusión cerebro de ternera.....200 Infusión corazón de res250 Mezcla de peptonas.....10 Fosfato dipotásico.....2.5 Cloruro de sodio.....5 Dextrosa.....2 Agar.....15 Base de agar Soya tripticaseína: Peptona de caseína.....15 Peptona de soya..... 5 Cloruro de sodio..... 5 Agar.....15 Base de agar GC: Mezla de peptonas.....15 Almidón de maíz.....1 Fosfato dipotásico.....4 Fosfato monopotásico.....1 Cloruro de sodio.....5 Agar.....10</p>	<p>Pepsina granular Papel pH Base de agar: Infusión Cerebro corazón, GC ó Agar soya tripticaseína. Sangre de carnero. Hemoglobina 2%</p>
<p>LA GELOSA HEMINA BACITRACINA, EXTRACTO DE LEVADURA</p>	<p>Medio hemina bacitracina: Base de gelosa sangre.....40g Solución de hemina equina (3mg/mL) Bacitracina 300mg/15 mL agua...15mL Agua destilada1L Extracto de levadura fresca de Fleischmann</p>	<p>Hemina equina (sangre de caballo) Levadura fresca de Fleischmann Filtro con membrana Millipore 0.45µm Bacitracina</p>

Tabla 2. Ventajas y desventajas para la elaboración de los medios recomendados.

MEDIO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
GELOSA CHOCOLATE-VANCOMICINA. POLIENRIQUECIMIENTO AGAR BASE GC VANCOMICINA	Es de uso comercial y de fácil adquisición en nuestros laboratorios.	Por costos no se adquirió Se sustituyó con soluciones farmacéuticas vitamínicas que no cumplieron con los requerimientos nutricionales para el crecimiento de la bacteria en cuestión. Costos y adquisición
GELOSA SANGRE DE CABALLO O DE CONEJO SANGRE DE CABALLO O CONEJO ENRIQUECIMIENTO DE FILDES ISOVITALEX BACITRACINA GELOSA COLUMBIA	Elaboración factible.	Difícil de conseguir Costos y adquisición Costos y adquisición Costos y adquisición
AGAR SANGRE DE CABALLO DE CASMAN AGAR CASMAN		Costos y adquisición
MEDIO LEVINTHAL AGAR PROTEOSA NO. 3 Ó GC SANGRE DE CONEJO	El medio GC se encuentra en nuestro almacén	Costos y adquisición Difícil adquisición

<p>ENRIQUECIMIENTO DE FILDES</p> <p>SANGRE DE CARNERO</p> <p>PEPSINA</p> <p>AGAR INFUSIÓN CEREBRO, CORAZÓN, GC Ó AGAR SOYA TRIPTICASEÍNA.</p> <p>HEMOGLOBINA</p>	<p>Fácil de conseguir y bajo costos En existencia en nuestro almacén.</p> <p>Bajo costo y fácil de adquirir, además de la ventaja de optar por el agar que se tenga disponible.</p> <p>Disponible</p>	
<p>GHBEL</p> <p>HEMINA</p> <p>EXTRACTO DE LEVADURA</p> <p>BACITRACINA</p>		<p>Costos y adquisición</p> <p>Se requiere de levadura de Fleischmann y una membrana millipore 0.44Mm</p> <p>No se dispuso del antibiótico por el costo.</p>

Nota: el término adquisición depende de que se tenga en los almacenes de la FES ZARAGOZA o que fuera de bajo costos y fácil de adquirir.

Tabla 3

Medios seleccionados para su elaboración exacta o modificada.

MEDIO SELECCIONADO	COMPONENTES	MODIFICACIONES O ESPECIFICACIONES
MEDIO DE LEVINTHAL	Sangre desfibrinada de caballo Base de agar Proteosa No. 3 ó Base de agar GC	Sangre desfibrinada de carnero. Base de agar GC
ENRIQUECIMIENTO DE FILDES	Pepsina granular Base de agar: Infusión Carebro corazón, GC ó Agar soya tripticaseína. Sangre de carnero. Hemoglobina 2%	Pepsina granular A seleccionar la base de agar.* Sangre de carnero Hemoglobina 2%

Tabla 4 Bases de agar a prueba para su implementación en el medio de crecimiento para *Haemophilus influenzae* sustituyendo la sangre de conejo por sangre de carnero y siguiendo el procedimiento para la gelosa de LEVINTHAL al 10% adicionado con enriquecimiento de FILDES al 10%

Agar	Crecimiento	*Costos c/ 450g
Sangre	+	\$ 920.00
GC	+++	\$ 935.00
Infusión cerebro corazón	++	\$1,000.00
Nutritivo	++	\$1,050.00
Soya tripticaseína	+++	\$ 800.00
Muller-Hinton	++	\$ 935.00

* Lista de precios 2004, BECTON DICKNSON DE MÉX.,S.A. DE C.V.

De los medios analizados para la implementación de la base de agar para la gelosa de Levinthal los que cumplieron en cuestión de crecimiento óptimo para *H. influenzae* fueron: la base de agar soya tripticaseína y GC.

En la tabla 5 se muestran los resultados de crecimiento de *H influenzae* en diferentes concentraciones de enriquecimiento de Fildes.

Concentración	Crecimiento
3%	+
5%	+++
10%	+++
15%	+++

Tabla 6 resultados de crecimiento de *H influenzae* en diferentes concentraciones de sangre de carnero.

concentración	Crecimiento
3%	+
5%	++
10%	+++
15%	+++

Tabla 7 Variación en la concentración de vancomicina como inhibidor de bacterias gram positivas diluciones 1:10

mg/mL de Vancomicina	463.5	46.35	4.635	0.4635	0.04635	0.004635
Crecimiento de <i>H. influenzae</i>	-	-	-	+	+	+
Crecimiento de Gram positivos	-	-	-	+	+	+

*Las bacterias gram positivas (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*) empleadas fueron colonias aisladas e identificadas en el laboratorio UMAI "Estado de México", FES. Zaragoza, UNAM.

Tabla 8 Variación en la concentración de vancomicina como inhibidor de bacterias gram positivas diluciones 1: 5

mg/mL de Vancomicina	92.7	18.54	3.708	0.7416	.1483	0.0296
Crecimiento de <i>H. influenzae</i>	-	-	+	+	+	+
Crecimiento de Gram positivos	-	-	+	+	+	+

SEGUNDA PARTE. UTILIZACIÓN DEL MEDIO EN CULTIVOS DE EXUDADOS FARÍNGEOS.

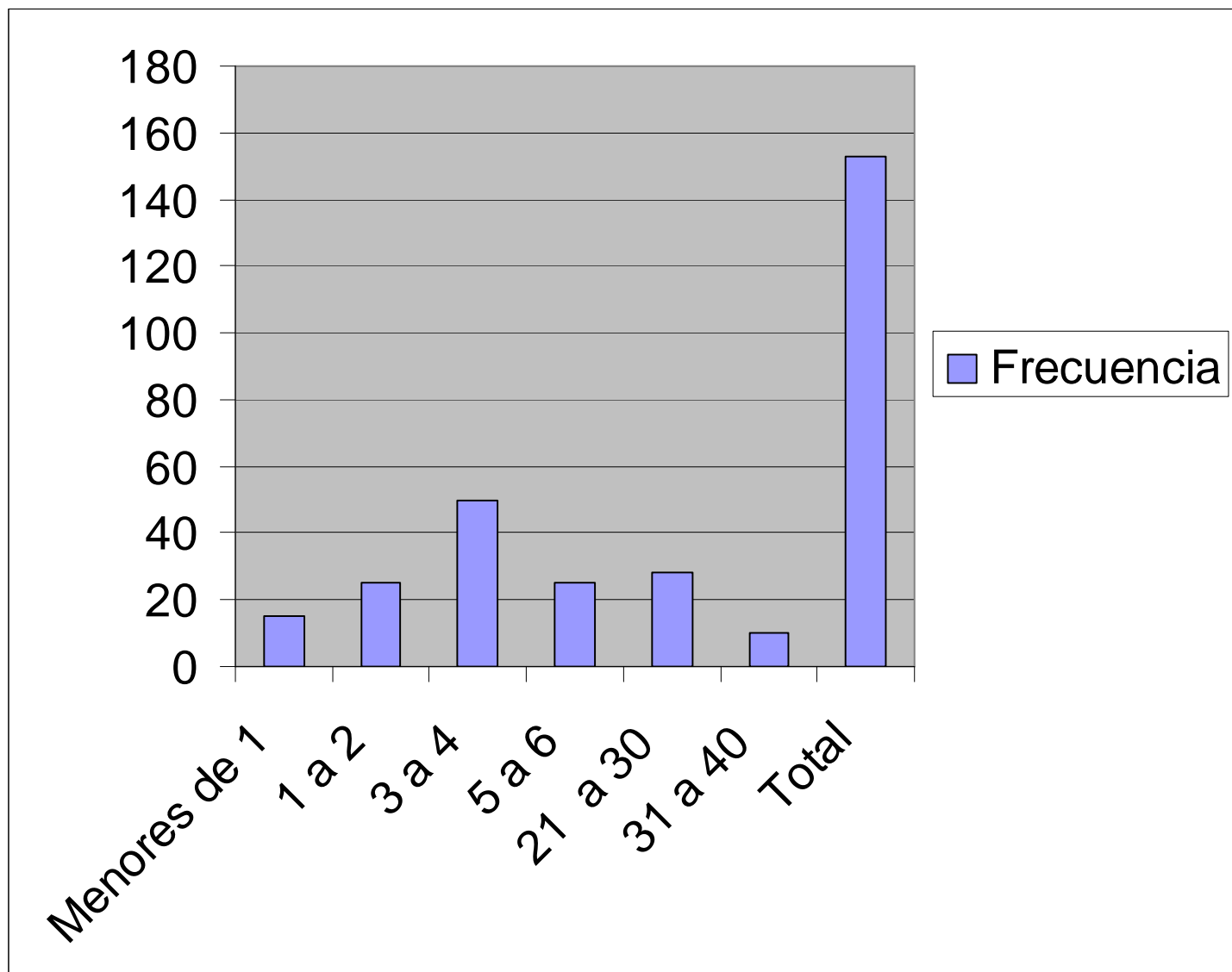
Se efectuaron 153 cultivos de exudados faríngeos en niños que asisten a un Centro Educativo Infantil (Kinder-Guardería), de Cd. Nezahualcóyotl, Edo. de Méx. 40 muestras (29.41%) pertenecen a niños menores de 3 años (maternal) , 75 (49.01%) pertenecen a niños entre los 3 y 6 años, los restantes 38 (24.83%) pertenecen a personal y familiares mayores de 21 años en contacto directo diario con los niños. La distribución de pacientes por edades se muestra en la tabla 5 y su frecuencia en la gráfica 1.

TABLA 8

Distribución de pacientes por edades.

Edades (años)	Porcentaje %
Menores de 1	9.80
1 a 2	16.33
3 a 4	32.66
5 a 6	16.33
21 a 30	18.30
31 a 40	6.54
Total	100

Gráfica I Frecuencia de muestras por edades



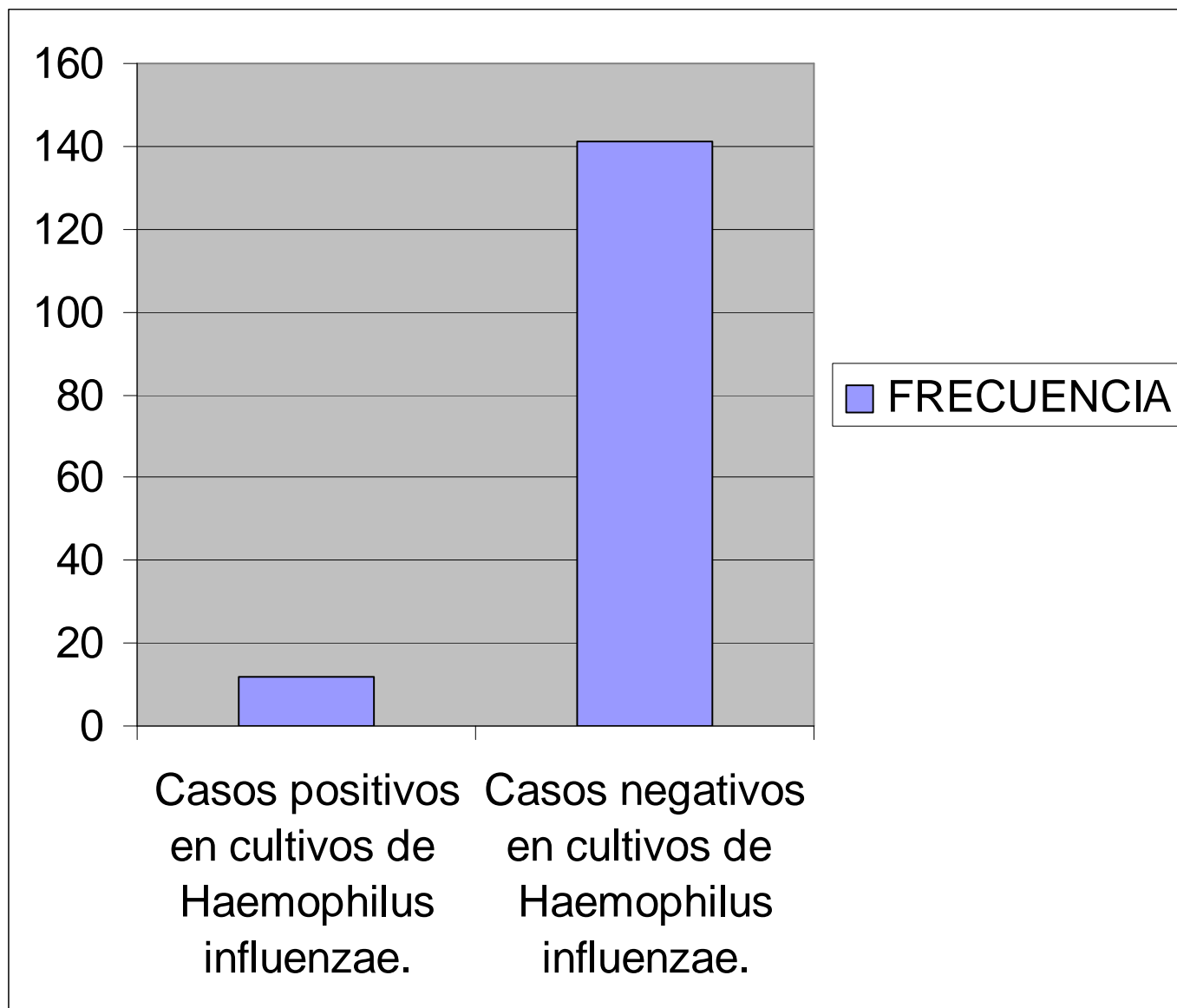
En ninguno de los casos el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y su siembra sobrepasó las 4 horas, las muestras fueron procesadas en el laboratorio de análisis de la Unidad Multiprofesional de Atención Integral (UMAI), "Estado de México" UNAM (FES ZARAGOZA).

Tabla 9

Distribución de cultivos positivos y negativos a *H. influenzae* en exudados faríngeos.

DESCRIPCIÓN	PORCENTAJE %
Casos positivos en cultivos de <i>Haemophilus influenzae</i> .	7.84
Casos negativos en cultivos de <i>Haemophilus influenzae</i> .	92.16
Total	100

Gráfica II Frecuencia de casos positivos y negativos de *H. influenzae*.



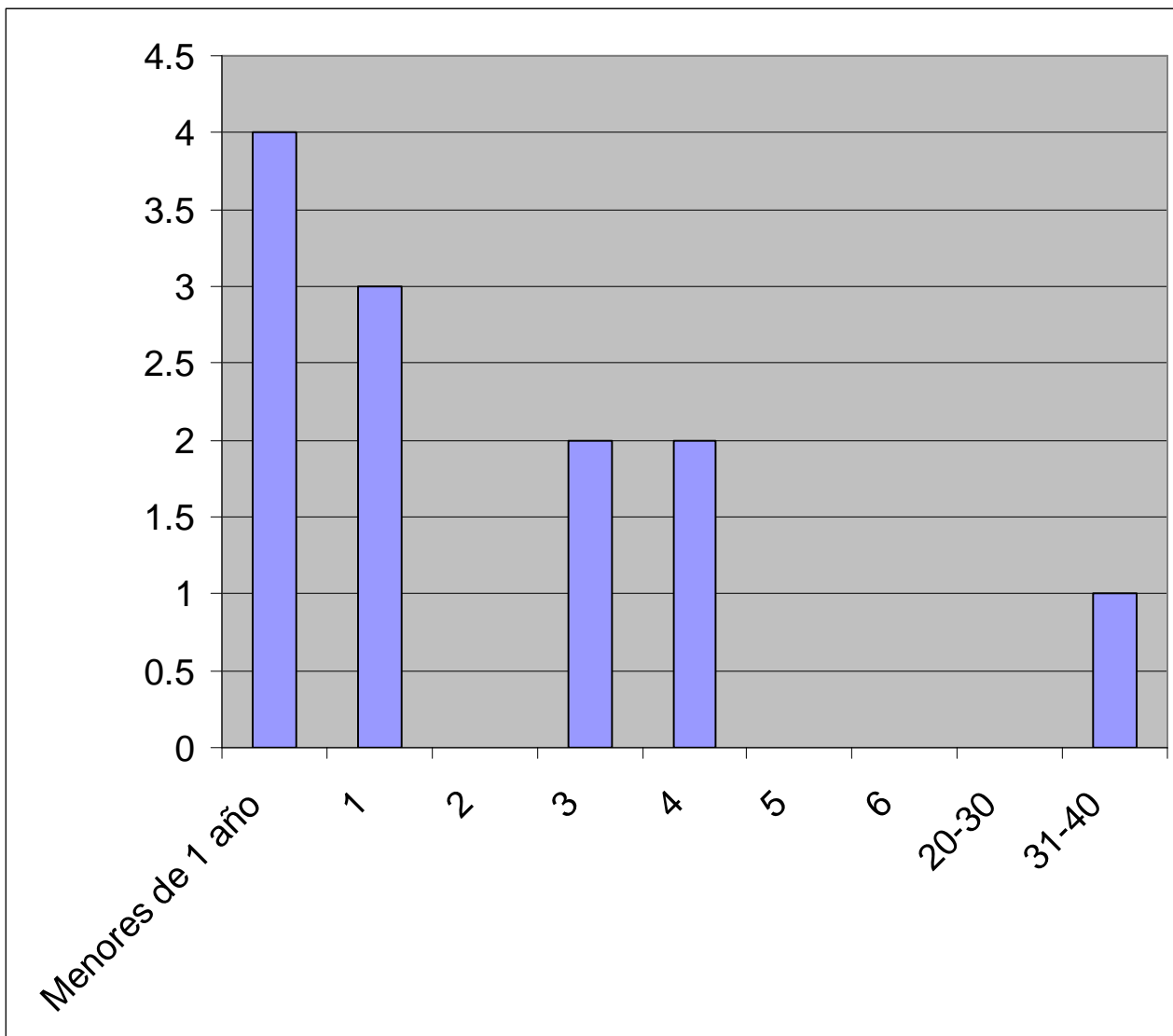
Los 12 casos positivos de *H. influenzae* corresponden al 7.84% mientras que los restantes 141 (negativos) corresponden al 92.16%. Cabe hacer mención a la amplia diferencia en los casos positivos y negativos.

TABLA 10

Distribución de cultivos positivos a *H. influenzae* respecto a la edad de los pacientes.

Edad en años	% del total
Menores de 1 año	33.2
1	24.9
2	0
3	16.6
4	16.6
5	0
6	0
20-30	0
31-40	8.3
Total	100

Gráfica III Frecuencia de los cultivos positivos por edades.



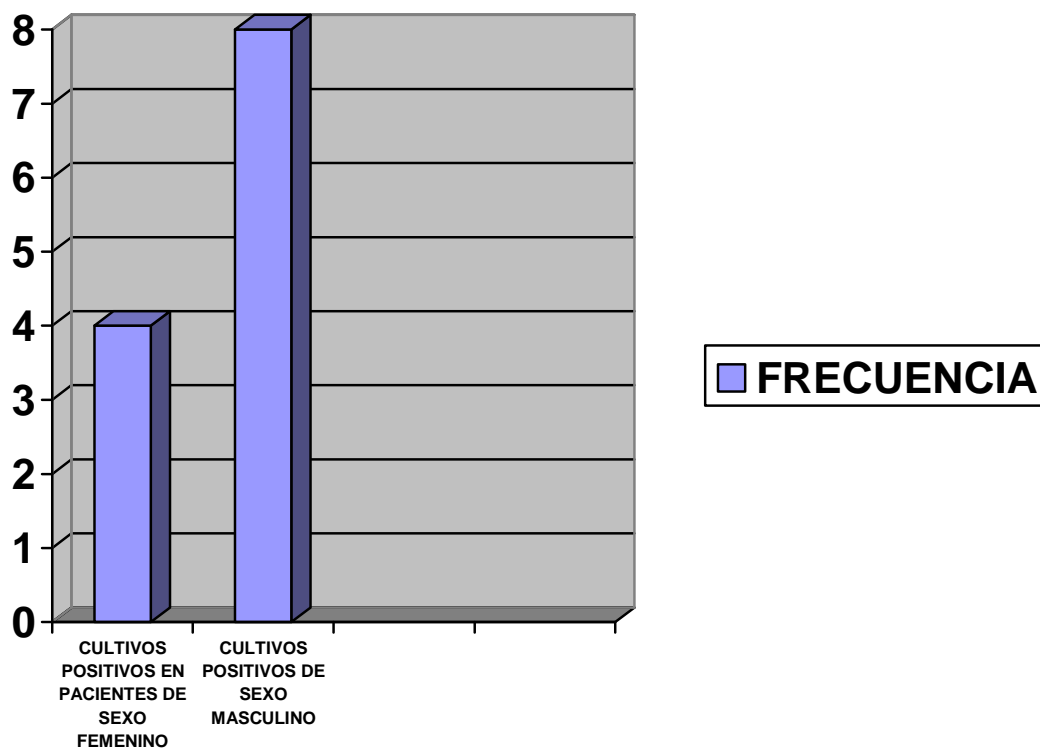
Del total de aislamientos se observa que existe un mayor porcentaje de casos positivos en niños de menores de 1 año (33.2%), seguido por 24.9% que corresponde a niños de 1 año a 1 año 11 meses ,16.6% que corresponde a niños de 3 y 4 años respectivamente , observando por lo tanto una mayor prevalencia en niños menores de 5 años y un caso (8.3%) en una persona adulta entre los 31-40 años de edad.

TABLA 11

Distribución de cultivos positivos a *H. influenzae* con respecto al sexo del paciente.

DISTRIBUCIÓN	PORCENTAJE
Cultivos positivos en pacientes de sexo femenino.	33.3
Cultivos positivos en pacientes de sexo masculino.	66.7
Total	100

Gráfica IV Frecuencia del sexo de los pacientes en los cultivos positivos.



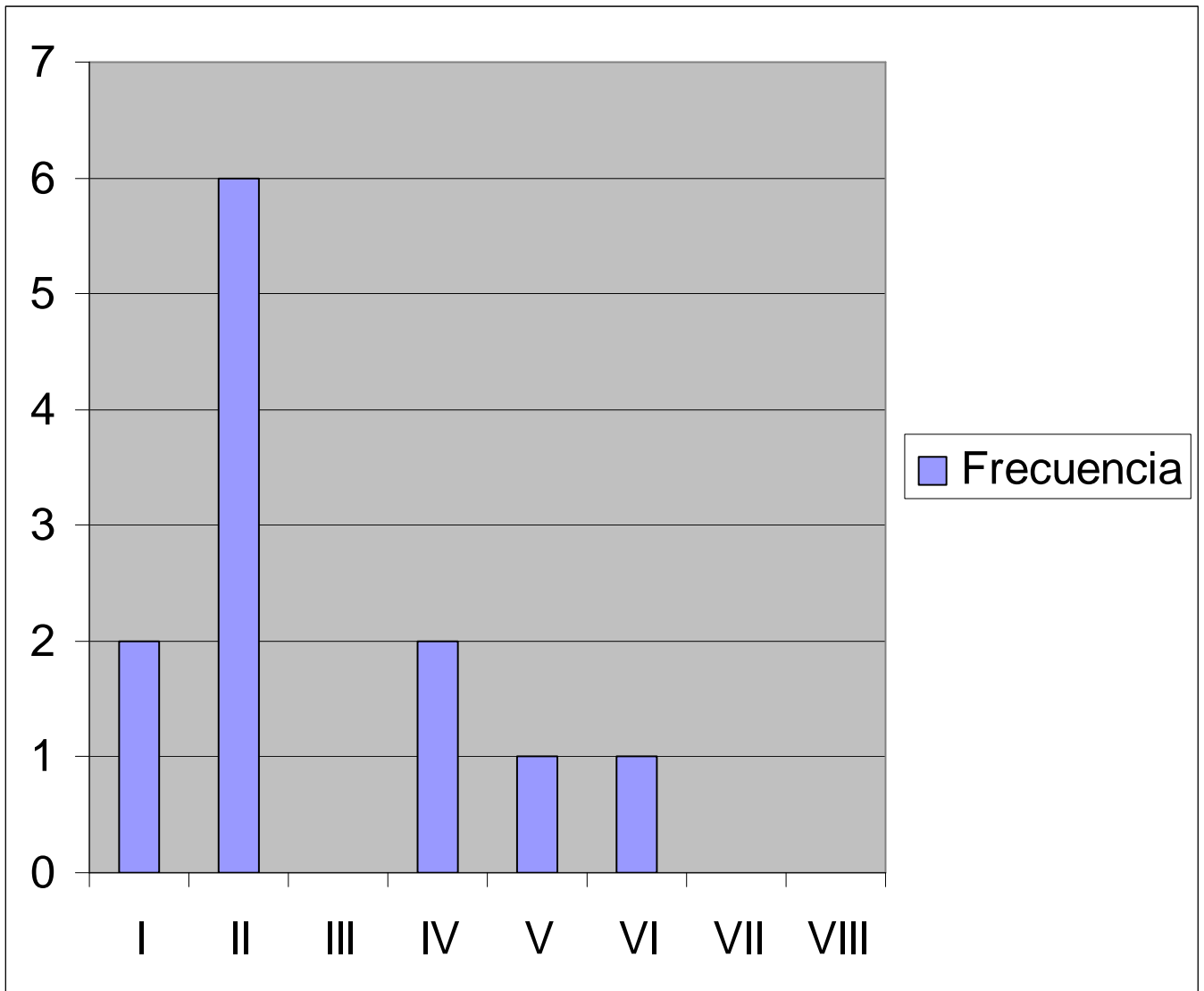
En la presente gráfica se observa que las infecciones por *H.influenzae* en la población estudiada se manifiesta una mayor frecuencia en individuos del sexo masculino 66.7% en relación al sexo femenino (33.3%) .

TABLA 12

Distribución de los cultivos positivos en biotipos de *H. influenzae*

Biotipo	Porcentaje
I	16.6
II	49.8
III	0
IV	16.6
V	8.33
VI	8.33
VII	0
VIII	0

Gráfica V Frecuencia de biotipos de *H. influenzae*



El biotipo más común fue el II con el 49.8% , seguidos por los biotipos I y IV con el 16.6% en cada caso y los biotipos V y VI con el 8.3 % respectivamente, mientras que de los biotipos III, VII y VIII no se presentó ningún caso.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

H. influenzae continúa siendo en México un patógeno importante en gran variedad de procesos infecciosos. Uno de los aspectos que ha obstaculizado en los últimos años el aislamiento de *H. influenzae*, es el uso de medios, reactivos y equipos especiales. Por los requerimientos nutricionales específicos necesarios para su desarrollo siendo de alto costo económico para los laboratorios que deseen aislarlo y mucho más para implementarlo en las rutinas de trabajo microbiológico.

En cuanto a los medios comercialmente recomendados para el aislamiento de *H. influenzae*, se eligieron a la gelosa de Levinthal y el enriquecimiento de Fildes (Tabla 3) ya que su elaboración y reactivos son básicos. En cuanto a las modificaciones realizadas a la base de agar que sustituiría a la Proteosa No. 3 y al agar Columbia que son los establecidos en la bibliografía para la Gelosa Levinthal por factibilidad y costos, donde los medios empleados de prueba estuvieron adicionados con sangre de carnero al 10% y enriquecimiento de Fildes al 5% Ver tabla 4. En los medios empleados hubo buen desarrollo de las cepas control (*H. influenzae*). Por cuestión de costos se eligió el agar soya tripticaseína pero por cantidad de medios subsistentes en el laboratorio se seleccionó el medio GC. Cabe mencionar que el medio Soya tripticaseína da tan buenos resultados de crecimiento como el medio seleccionado para el desarrollo de todo el proceso.

En la Tabla 5 se determina la concentración mínima de enriquecimiento de Fildes para el crecimiento de *H. influenzae*, que fue al 5%, aún cuando concentraciones del 10 y 15% daban iguales resultados que contrastando con la literatura es menor al 10% del que hace referencia. Para la gelosa de Levinthal se sustituyó la sangre de conejo por la de carnero variando las concentraciones Tabla 6 obteniendo un crecimiento óptimo a la misma concentración recomendada al 10%. Cabe mencionar que en la adición de Vancomicina como antibiótico variando las concentraciones Tablas 7 y 8, cabe mencionarse que no se logró selección de la concentración óptima, ya que las diluciones empleadas inhibieron a los gram positivos y negativos en la misma concentración o permitían el crecimiento bacteriano de las cepas. De ahí que se descarta su empleo ya que no se logran obtener resultados reproducibles y recomendados. Por lo anterior el medio empleado es solamente de crecimiento y no selectivo.

En el presente estudio, el medio de cultivo empleado fue una combinación del medio de Levinthal y el enriquecimiento de Fildes los cuáles fueron los primeros medios empleados para el crecimiento de *H. influenzae*, solo que ha sido necesario suplir la base de agar originalmente empleada por otra más común en los laboratorios de primer nivel y el tipo de sangre recomendada por la de carnero, además de variar las concentraciones de sangre y de enriquecimiento para optimizar el crecimiento y costos.

La frecuencia de *H. influenzae* en la población infantil del estudio realizado fue del 7.17% y en adultos 0.65%, en cuanto a la población infantil se refiere cae dentro de los rangos señalados por Moreno Camilli⁶⁰, 6-60% de portadores en el mismo tipo de población. En contraste algunos estudios mantienen incidencias mayores como en el caso de Guiscafre⁴⁸ donde se reporta un 10%, así como la de Calderón y Carmolinga³¹ del 20%, Sosa –Iglesias³ del 31.7%, Gatica Marquina⁶ da intervalos del 20-70% y Villaseñor⁵⁰ quién en su estudio aisló el 21%. A nivel internacional Montano¹³ en Uruguay menciona que en menores de 5 años el 90% de las enfermedades respiratorias se deben a *H. influenzae*, mientras que en Cuba Nordarse Hernández¹³ menciona el 75 % , quedando éstas muy por debajo a los resultados obtenidos, señalando además que a nivel nacional se mantienen valores más bajos que a nivel internacional, siendo posibles causas la baja investigación que se realiza en nuestro país sobre la incidencia real de este microorganismo por los costos que generaría

En el presente estudio se determinó un 0,6% en esta población, dato similar a lo referido por diversos autores en la literatura especializada que señalan la baja incidencia de estas actualmente^{1-10,12-16,28}. En contraste Koneman²¹ menciona la importancia de su aislamiento en esta edad ya que hasta un 85% de adultos lo alojan, quedando los resultados obtenidos en el estudio muy por debajo de lo antes mencionado.

Las diferencias de aislamiento encontradas pueden deberse a que la cantidad de población adulta fue muy baja en comparación a la infantil, además de que el tipo de muestras en cada caso son diferentes, exudados o lavados faríngeos, nasofaríngeos, óticos, LCR, etc., aunado a que el procedimiento de aislamiento y tipificación varían.

En cuanto a la frecuencia por sexo, se observa un claro predominio en el sexo masculino (66.7%) que en el femenino (33.3%) en similitud con varios autores como Gómez de León¹⁴, Takala y Montano¹³ donde también hacen referencia al predominio del sexo masculino, aunque Zurita³⁶ señala que la influencia del sexo no es significativa, la mayoría de los autores coinciden en señalar que se desconocen las razones de este predominio.

La caracterización bioquímica permitió la subdivisión de las especies de *H. influenzae* encontrando que el biotipo más común fue el II en muestras que corresponden a niños menores de 4 años, Kilian¹⁹ demostró que este biotipo pertenece a cepas no capsuladas y no patógenas determinando por lo anterior que está presente como parte de la flora normal de los niños entre dichas edades en estado de portador, en contraste Salas³⁸ menciona que el biotipo II es el responsable del 15-18% de las infecciones graves y del 10-15% de infecciones no graves. Por su parte los biotipos I y IV mostraron una frecuencia del 16 % cada uno, en poblaciones menores de dos años, El biotipo I corresponde a cepas consideradas como patógenas, cabe mencionarse que las cepas del tipo b en el 90% de los casos pertenecen al biotipo I (Kilian) ,según el anuario estadístico 2002 las infecciones invasivas por *H. influenzae* serotipo b que son las más patógenas se dan principalmente en menores de 4 años, lo cual es similar a lo

encontrado en el presente estudio con respecto a la edad. El biotipo IV es señalado por Salas³⁸, como el biotipo correspondiente en la mayoría de los casos a portadores sanos en un 5-14%. Mientras que los biotipos con menor frecuencia fueron V y VI. Kilian¹⁹ y Salas¹³ señalan al respecto, estas cepas son involucradas en una baja proporción según en infecciones no graves o como portadores. De los resultados obtenidos se considera que 8 de 12 cepas positivas pueden considerarse no patógenas, mientras que en los 4 restantes se sugiere una patología clínica según los criterios de ayuda diagnóstica de Kilian¹⁹.

Cabe mencionar la utilidad de las pruebas bioquímicas empleadas ya que además de ser básicas en el laboratorio se implementó el enriquecimiento de Fieldes al 5% para el desarrollo de la bacteria en cuestión. Fue como se llegó a la biotipificación de *H. influenzae*, prescindiendo así de la serotipificación u otras pruebas más costosas.

Los resultados obtenidos hacen necesario incrementar el número de muestras así como igualarlas con relación al sexo y edades para ampliar la información y hacerla más comparativa y confiable.

X. CONCLUSIONES.

- El medio de cultivo propuesto para el aislamiento de *Haemophilus influenzae* es adecuado para la recuperación de dicho microorganismo.
- Debido a que la elaboración del medio de cultivo propuesto requiere sólo de reactivos básicos permite su implementación en laboratorios de cualquier nivel.
- Es necesario seguir trabajando sobre la selectividad del medio realizando mayor número de diluciones con rangos menores para llegar a la concentración mínima inhibitoria y la utilización de cepas CCT de las bacterias empleadas para dicho propósito. Ya que el medio diseñado sólo es de crecimiento y no selectivo.
- El presente medio de cultivo se propone para su empleo en otros tipos de muestras como secreciones laríngeas, esputo, aspiraciones translaríngeas, lavados bronquiales, exudados sinusal, líquido de membrana timpánica rota, aspirado de oído medio, sangre, especímenes uretrales y endocervicales entre otros y para la recuperación de otras especies patógenas de *Haemophilus*.
- Se recomienda trabajar con una población más uniforme respecto a la edad y sexo de los pacientes, además de sugerir que en estudios de este tipo se complemente la información de todos los microorganismos encontrados.

XIII.REFERENCIAS.

1. IMSS,Actualidades en el diagnóstico, tratamiento y prevención de la otitis media aguda, Hospital Infantil de México "FEDERICO GOMEZ". Rev. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología 2004;24,3.
2. N.Villó Sirerol, JE Blanco González, P.Sevilla Ramos, E. Vegas Muñoz,M^ªA. García Herrero, J Alvarez Coca, J Romanyc. Enfermedades Invasivas por Streptococcus pneumoniae y haemophilus influenzae serotipo b. Estudio retrospectivo de 12 años. An Pediatric (Barc) 2004;61:150-155.
3. Manual Para La Vigilancia Epidemiologica De Las Infecciones Invasivas Por H.Influenzae. Publicacion Tecnica De Epidemiología No. 20 SSA: Méx. 1997.
4. Gómez de León-Cruces P,Cabrera-Contreras R. Vacunas contra Haemophilus influenzae b: presente, pasado , futuro.Salud Pública Méx 1992;34:274-286.
5. Pineda Celis Alberto, Juárez Aragón G, Games Eternod Juan, Valle Farías J.L., Pantoja Casimiro. Laringeobronquitis infecciosa aguda. Rev.mex. de pediatria. 1982;4:177-188.
6. Gatica Me, Echaniz Ag,Rangel Fh, Velazquez Mm.Colonización Bacteriana Nasofaringea En Niños Que Asisten A Guarderías Y Niños Cuidados En Casa. Rev. Inst.Nal.Enf.Resp.Mex. 1993; 6(4):191-195.
7. Conde González carlos J. Enfermedades infecciosas en guarderías. Infectología 1987;7(6):251-252.
8. Anuario Estadístico 2002,Secretaria de Salud y Servicio de Salud en los Estados. Méx.
9. Boletín de Epidemiología México 2004;21(48)
- 10.Boletín de Epidemiología México 20034;21(49)
- 11.Boletín de Epidemiología México 2003;20(53)
- 12.Conociendo al enemigo Haemophilus influenzae, ABBOTT LABORATORIES DE México;S:A: DE C:V: i.med.hej21369/94.
- 13.Sosa-Iglesias Ge, Giono Cs, Escobar Ga. Manual de Procedimientos para el Aislamiento e Identificacion de *Haemophilus*. Publicación Técnica del INDRE No. 19.SSA. México 1992.
- 14.Kumate Jg, Gutierrez G, Muñoz O,Santos Pj.Manual De Infectologia Clinica.14 Ed. Trillas, México 1994:249-258
- 15.González Sn, Palacios Sg. El Paciente Pediátrico Infechado, Guia Para Su Diagnóstico Y Tratamiento.2ed. Trillas, México 1990:137-143.
- 16.González Sn, Torales Ta, Hernández Pm. Infectología Clínica Pediátrica.6 Ed. Trillas, México 1996:326-350.
- 17.Quentin Nm. Bacteriología Y Micología Medica. Interamericana, México 1974: 309-315.
- 18.Peter Mp, Neal Ah, Georges P, Hollsey Na, Marcose Ke. Red Book, Enfermedades Infecciosas En Pediatría.23 Ed. Médica Panamericana. España 1996:243-255.

19. Kilian M. A Taxonomic Study Of The Genus *Haemophilus* With The Proposal Of A New Species. J. Gen. Microbiol. 1976;93:9-61.
20. Duerden Bi. Microbiología De Enfermedades Infecciosas, Limusa Noriega. España 1993:127-129,290-291.
21. Koneman Ew, Allen Ds, Dowell Vr, Fondo Nm, Sommers Hm, Winn Wc. Diagnostic Microbiology 3 Ed. Lippincott Co. 1988:228-290.
22. Baile-Scott Diagnostico Microbiológico. Médica Panamericana. Argentina. 1983:286-289,592,597.
23. Guía Técnica Y Procedimientos Para La Aplicación De Productos Biológicos. IMSS, México 1997
24. Conociendo al enemigo *Haemophilus influenzae*, ABBOTT LABORATORIES DE México; S:A: DE C:V: i.med.hej21369/94.
25. Divo A. Microbiología Médica, Bacteriología, Inmunología, Virología Y Micología. 2ed. Interamericana. España. 1971:139-141.
26. Henry Jb, Sanford D. Diagnostico Y Tratamiento Clínicos Por El Laboratorio, Tomo II. 7 Ed. Salvat. España. 1984:1546-1547.
27. Enfermedades Respiratorias. Indre, Mexico 1997:473-484.
28. Branefors P. Serological Studies Of H. Influenzae With Special Reference To Otitis Media Infections. Tesis Instituto Of Microbiology. Dept. Of Otorhinolaryngology. Gotenborg, Sweden.
29. Calderon Je, De La Cruz Gr. Mecanismo De Adherencia Bacteriana. Infectologia 1982;6:411-421
30. Zinsser, Joklik Wk, Lett HP, Amos (Edits) Microbiology. 17 Ed. Appleton-Crofts. N.Y. 1980:605-613.
31. Calderon, Carmolingo, Salas Y Conde. Epidemiología De Las Infecciones Por H. Influenzae. Infectologia 1982;2:37-45.
32. Toala P. Neumonías Bacterianas En Niños. Infectologia 1982;5:323-329.
33. Duern Gv, Jones Rn, Gerlach Eh, Hindler J, Amand Rs. Revised Disk Diffusion Interpretive Criteria For Cefaclor, Loracarbef, Cefprozil And Cefixime When Testing H. Influenzae On *Haemophilus* Test Medium. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1994;13(6):481-489
34. Cedraton Ae, Martinez Ca, Ferrero Am. Conocimientos Y Problemas De Las Neumonías Por Gramnegativas. Infectologia 1982;6:399-409.
35. Todar's Online Textbook of bacteriology *Haemophilus influenzae* 2004 Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of bacteriology.
36. Zurita J, Naranjo A, Otaneda S, Quiñones E. Meningitis Bacteriana En La Infancia, Una Revisión De 357 Casos En Un Período De 6 Años En Quito. Rev. Enf. Inf. Y Microbiol. 1995; 15(3):121-125.
37. Muñoz O, Cantu Mj, Trejo Dj, Fresno H. Meningoencefalitis Purulenta. Gac. Med. Mex. 1979;115(2):89-93.
38. Salas Rp, Carmolingo Pm, Conde Gc. Caracterización Serológica Y Bioquímica De H. Influenzae. Infectologia; 1982 (4): 275-280.

39. Ballester Df, Corella Pd, Perez Hs, Hervas Ha, Merino Ec. Variación Estacional De La Mortalidad En La Ciudad De Valencia, España. *Salud Pública De Mex.* 1997;39(2):95-101.
40. Sosa-Iglesias Eg. Superficies Microbianas De H. Influenzae En Relación Con La Patogenicidad, (Primera Parte). *Infectología* .1987;7(9):435-445.
41. Sosa-Iglesias Eg. Superficies Microbianas De H. Influenzae En Relación Con La Patogenicidad, (Segunda Parte). *Infectología*. 1987; 7(10):481-489.
42. Villaseñor Sa, Nava Fm, Sanchez Rb, Vazquez Sp, Santos Ji. Susceptibilidad De Cepas De H. Influenzae No Tipificable A Loracarbef (Ly163892) Y Antimicrobianos De Uso Comun. *Enf. Inf Y Microb.* 1995;15(3):126-128.
43. Arredondo Gj. Perspectivas De Una Nueva Vacuna. *Infectología* 1985;5(3):58.
44. Platt Af. Faringitis Bacteriana En Adultos. *Infectología* .1985;12:332-337.
45. Davis J, Smith Di. Plasmid-Determined Resistance To Antimicrobial Agents. *Annu. Rev. Microb.* 1978;32:469-471.
46. Arredondo JI, Aguilar Rm. Respuesta Inmunitaria A Infecciones Por H. Influenzae .*Infectología* .1985;2:39-45.
47. Avances en la prevención y tratamiento de la meningococcal meningitis purulenta por *Haemophilus influenzae* tipo b. *Gac. Méd. De Méx.* 1993;129 Supl 1
48. Guiscafre-G, García MM, Jaime-CM, García M, Hernández VR, Muñoz O, Frecuencia de *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina y de *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina en portadores sanos. *Arch. Invest. Méd. Méx.* 1981;12:141
49. Onofre M, Cantú MJ, Trejo PJ, Fierro H, meningococcal meningitis purulenta. *Gac. Méd. De Méx.* 1979 ; 115:2:89-93.
50. Villaseñor Sierra, Herrera Basto, Vázquez Salazar, Arrollo Moreno y Santos Preciado, Prevalencia de estado de portador de *Haemophilus influenzae* en niños de Ciudad Nezahualcóyotl, Estado de México, México, *Salud Pública de Méx.* 199;38:2, 87-93.
51. Hernández V. Rosa Ma. Proteínas de la membrana externa de las bacterias gramnegativas. *Inf.* 1983; 8, 371-378.
52. Trujillo SH, Bustos GA, Calderón JE. Meningitis bacteriana aguda .*Infec.* 1982; 2,145-152
53. Mustafa Akkoyunlu and Arne Forsgren. Local and systemic antibody levels against protein D of *Haemophilus influenzae* following immunization and infection in rats. *APMIS* 1996;104; 709-717.
54. Barry AL, Fuchs PC. In vitro Activities of a Streptogramin (RP59500), Three Macrolide and an Azalide against Four Respiratory Tract Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:6,238-240
55. Goldwater PN, Effect to Cefotaxime or Ceftriaxone treatment on nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* Type b colonization in children. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39:9,2150-2152.
56. Booy R, Hodgson S, Carpenter L, Mayon-White, Slack E, Macfarlane JA, Haworth EA, Kiddle M, Shribman S, Clair Roberts, Moxon ER. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine PRP-T *The Lancet* 1994;344:6,362-366.

57. Anuario Estadístico 1995 Secretaría de salud y Dirección general de estadística e informática Méx. 1996 Ed. Grafick S.A. de C. V.
58. Haemophilus Frontera De Investigación Uam Xochimilco Méx. 1994.
59. García C. Ramos Elsa, Giono cerezo Silvia. Bacteriología Médica Diagnóstica, Instituto Politecnico Nacional, Méx. 1993.
60. Moreno Camilli y Giono Cerezo, Haemophilus influenzae, Diagnostico Etiológico, INDRE, 1997
- 61 Davis Ann, Bull george Vacuna contra el Haemophilus influenzae tipo B, Infectología 1987;7:2,79-87.
62. BECTON DICKNSON DE MÉX., S.A. DE C.V., lista de precios 2004.

XI . ANEXOS.

ANEXO I

SEROLOGIA, RESPUESTA INMUNITARIA Y POSIBLES VACUNAS.

La mayoría de pediatras e infectólogos conocen la gravedad de la infección por *H. influenzae*_tipo b (Hib), tanto por la mortalidad que ocasiona como las secuelas que origina. La gravedad, frecuencia y edad de ataque hace imperativa la necesidad de contar con un inmunógeno eficaz que confiera protección contra este patógeno.(8,50)

Para que una vacuna tenga valor clínico son necesarios tres requisitos: a) que exista una respuesta inmunitaria relevante; b) que esta respuesta se correlacione con resistencia adquirida a la infección, y c) que la logística de inmunización sea eficaz.(31)

La protección contra *H. influenzae* es medida por anticuerpos específicos en oposición al polisacárido capsular (PRP); sin embargo, los anticuerpos contra antígenos no capsulares como lipopolisacáridos (LPS) y proteína de la membrana externa (OMP) pueden ser de igual importancia.

En los esfuerzos para prevenir las enfermedades infecciosas por *H. influenzae* se ha elaborado una vacuna con polisacárido capsular del serovar b (polirribosil-ribol-fosfato PRP) la cual no es eficaz en la población de riesgo debido a su baja inmunogenicidad. En la búsqueda de inmunógenos alternativos se han estudiado: proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos (LPS), núcleo de LPS de enterobacterias que tienen reacción cruzada con *H. influenzae*; sin embargo, no se ha logrado un buen inmunógeno.(31-33,48,49,53)

Se tiene evidencia de que la inmunidad humana frente *H. influenzae* tipo b es medida por anticuerpos frente al polisacárido capsular del *H. influenzae* tipo b (PRP), por lo que todas las vacunas están diseñadas buscando estimular la inducción de anticuerpos frente a éste. El principal problema es que el PRP, al ser un polisacárido, es un antígeno T-independiente, que induce una respuesta humoral, sin establecer "memoria inmunológica" y es poco inmunogénico en menores de dos años. Para evitarlo se ha investigado y conseguido elaborar vacunas conjugadas, que actúan como antígenos T-dependientes, eficientes en niños pequeños.

El desarrollo de las vacunas conjugadas se basa en la diferencia entre antígenos T-dependientes y T-independientes. Las vacunas T-independientes pueden convertirse en vacunas T-dependientes mediante la unión química del polisacárido (PRP) a una proteína transportadora.

La respuesta a esta nueva molécula antigénica implica a los linfocitos T y B; es fundamentalmente del tipo IgG y está presente en niños menores de dos años; induce memoria inmunológica, por lo que la reexposición al antígeno produce una respuesta rápida y efectiva. La unión del polisacárido de *H. influenzae* b (Hib) a diferentes proteínas ha dado lugar a varios tipos de vacunas

conjugadas y demostrado su eficacia en niños pequeños, con excelente seguridad y tolerancia.(1,34,35,53) Además se tiene información sobre la inmunización maternal transplacentaria(41).

Tipos de vacunas

Existen cuatro tipos de vacunas conjugadas frente a *H. influenzae* b, (1,34,38):

VACUNAS DISPONIBLES EN EL COMERCIO PARA LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR *H. influenzae*:

NOMBRE REGISTRADO	TIPO DE VACUNA	FABRICANTE
PRO-HiBiT	PRP-D	CONNAUGHT LABORATORIES
Hib TITER PedvaxHIB	PRD-CRM 197 o HbOC PRP-OMPC	PRAXIS BIOLOGICS MERCK Sharp & DOHME
Pendiente	PRP-T	INSTITUT MERIEUX

TOMADO DE: MORENO-GIONO 1997(38)

- Vacuna PRP-D: está constituida por la unión química del polisacárido PRP del *H. influenzae* tipo b, a una proteína transportadora de toxoíde diftérico.
- Vacuna HbOC(Lederle): el polisacárido b esa unido a una proteína tranportadora CRM 197, que es mutante no tóxico de la toxina diftérica. Para administración en niños menores de 18 meses en un esquema de dosis múltiple, tiene una eficiencia del 100%, que completa el esquema inicial de tres dosis. Con base en la información disponible, se propone un esquema de vacunación a partir de los dos meses de edad, con intervalos de dos meses entre una y otra aplicación hasta los seis y una dosis de refuerzo a los 15 o 18 meses de edad.
- Vacuna PRP-OMP: compuesta por el polisacárido PRP, enlazado de manera covalente con un complejo de proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* del grupo B. Tienen excelente inmunogenicidad en todos los grupos de edad. En los lactantes menores tienen una respuesta satisfactoria con una sola dosis y se observa un incremento en los títulos de anticuerpos después de la segunda.
- Vacuna PRP-T (Connaught): el polisacárido b está unido al toxoíde tetánico. La administración de una sola dosis de ésta desencadena una buena respuesta en niños entre los 18 y 29 meses de edad, mientras que en los niños de tres meses se encontró una respuesta débil de anticuerpos después de una sola y se incrementa con la aplicación de dosis subsecuentes.

Las instituciones que integran el Sistema Nacional de Salud (México) han establecido el "Nuevo Esquema Básico de Inmunizaciones"; al que incorporan la Vacuna Cuádruple (Difteria, Tos ferina, Tétanos, H. influenzae tipo b) y la Vacuna Triple (Sarampión, Rubéola y Parotiditis); como una innovación relevante que surge de la necesidad de proteger a la población contra las enfermedades que se han identificado en el momento de transición epidemiológica en que vivimos y que esta afectando principalmente a la población infantil. (1,34,35-38)

Son dos los tipos de vacunas aceptadas y empleadas en México por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (1)

VACUNA CUADRUPLE (DPT + Hib)

Proveedor	Composición	Presentación	Composición DPT	Presentación	Otros
Instituto Pasteur Merleux	<u>H.influenzae</u> b Poliósido de <u>H. influenzae</u> tipo b conjugada a la proteína tetánica 10 microgs.	Liofilizado	Antitoxina diftérica purificada 1 dosis vacunante* Antitoxina Tetánica purificada 1 dosis vacunante** <u>Bordetella pertussis</u> 4UI mínimo.	Suspensión inyectable	Trometamol 0.6 mg. Sacarosa 45 mgs. Hidróxido de aluminio 1.25 mgs máximo. 0.05mgs de mercuriothiolato sódico como máx. Solución de cloruro de sodio al 0.9%
Wyeth Lederle	10 microgs de Oligosacáridos de <u>H. influenzae</u> tipo b conjugado con 25 microgs de una proteína mutante de toxoide diftérico CRM 197	Reconstituida	Toxoide diftérico 12.5 Lf. Toxoide tetánico 5Lf. <u>Bordetella pertussis</u> 16 OPU	Reconstituida	Thimerosal 1:10,000 0.85m mgs de fosfato de aluminio.

TOMADO DE: INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL 1997,(1)

*La dosis vacunante de antitoxina diftérica corresponde a no menos de 30 Unidades Internacionales cuando el poder protector de la vacuna se mide en paralelo con el patrón Internacional de la O.M.S., o un subpatrón calibrado en referencia al patrón Internacional.

**La dosis vacunante de antitoxina diftérica corresponde a no menos de 60 Unidades Internacionales cuando el poder protector de la vacuna se mide en paralelo con el patrón Internacional de la O:M:S:, o un subpatrón calibrado en referencia al patrón Internacional.

El Instituto Mexicano del Seguro Social en una publicación de la Coordinación de Salud Comunitaria apoya la capacitación del personal involucrado en la aplicación de las vacunas en todos los niveles de atención a la salud y dependencias médicas del IMSS. Describiendo al detalle cada una de las vacunas, por principio el "Nuevo Esquema Básico de Inmunizaciones" y posteriormente el "Esquema Complementario" con vacunas que se han

incorporado en los últimos años a nivel institucional considerando necesaria su aplicación, con el propósito de mantener e incrementar progresivamente la cobertura de vacunación.

Así pues se ha logrado considerar de relevancia la inmunización contra las enfermedades invasivas por *H. influenzae* tipo b entre otros. Describiendo a continuación al detalle los dos esquemas de inmunización en los que se incluye la vacuna cuádruple (DPT + Hib) y la vacuna antihaemophilus influenzae tipo b. (38,48,49)

NUEVO ESQUEMA BASICO DE INMUNIZACIONES

PRESENTACION

Frasco reconstituído

Frasco liofilizado y jeringa prellenada con solvente 0.5 ml.

INDICACIONES

Esta indicada para la inmunización activa contra las enfermedades causadas por *H. influenzae* tipo b, difteria, tos ferina y tétanos en niños de 2 a 18 meses de edad.

CONTRAINDICACIONES

No aplicar cuando existe: Fiebre mayor o igual a 38°C, Cuando se tengan antecedentes de hipersensibilidad a alguno de los componentes de la vacuna.

DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION

Con cualquiera de las dos presentaciones el esquema consta de 3 dosis, de 0.5 ml. cada una, iniciando a los dos meses de edad, con intervalos de dos meses cada dosis, con refuerzo a los 18 meses de edad.

La vía de aplicación debe ser intramuscular en la cara externa del vasto lateral (músculo). *Este producto no debe aplicarse en región glútea, ni deltoidea.*

EVENTOS ADVERSOS

LOCALES: dolor, calor y enrojecimiento en el sitio de aplicación, así como la presencia de un nódulo en el sitio, el cuál puede durar de 7 a 10 días.

SISTEMICAS: Fiebre mayor a 38.5°C, ocasionalmente convulsivas febriles que pueden ser más frecuentes en niños con historia previa de convulsiones o epilepsia.

CONSERVACION

Debe conservarse a una temperatura de +2°C y +8°C. NO DEBE CONGELARSE.

ESQUEMA COMPLEMENTARIO

VACUNA ANTIHAEMOPHILUS INFLUENZAE TIPO B

PRESENTACION

Frasco liofilizado con su diluyente de 0.5ml, para una dosis.

Frasco reconstituído 0.5 ml, para una dosis.

INDICACIONES

Esta indicado para inmunizar niños de 2 meses a 5 años de edad, contra las enfermedades invasivas causadas por *H. influenzae* tipo b.

CONTRAINDICACIONES

No aplicar cuando existen: Fiebre mayor o igual a 38.5°C, antecedentes de hipersensibilidad a algunos de los componentes de la vacuna.

DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION

Tres dosis de 0.5 ml en el grupo de 2 a 11 meses, con intervalo de 2 meses entre cada dosis y un refuerzo al cumplir los 18 meses de edad, por vía intramúscular en la cara externa del vasto lateral (músculo).

Dos dosis de 0.5ml , en el grupo de 1 a 4 años de edad con intervalos de 2 meses en cada dosis y un refuerzo al cumplir los 5 años de edad por vía intramúscular en la cara externa del vasto lateral (músculo).

EVENTOS ADVERSOS

LOCALES: dolor, calor , enrojecimiento en el sitio de aplicación.

SISTEMICOS: Fiebre mayor o igual a 38.5°C.

CONSERVACION

Debe conservarse a una temperatura de +2°C y +8°C. NO DEBE CONGELARSE.

El Centro de Control de Enfermedades (CCD) y la Academia Americana de Pediatría (AAP) diseñaron ciertas recomendaciones para el uso de la vacuna(34,37):

- Todos los niños deberán inmunizarse a los 24 meses de edad.
- Los niños que no recibieron la vacuna a los 24 meses de edad deberán inmunizarse antes de su quinto aniversario (60 meses de edad). Los niños que acuden a las guarderías deben recibir especial atención.
- Existe poca información sobre la aplicación de la vacuna a niños entre 18 a 23 meses de edad. Si se administra a niños de este grupo de edad, la posibilidad de protección es incierta.
- Como la respuesta a la vacuna no es consistente en los niños de entre 18 y 23 meses de edad, la mayor parte de las autoridades recomiendan la revacunación. Y aunque no existe información suficiente para recomendar el tiempo preciso para esta segunda dosis, la reinmunización puede aplicarse dos a 12 meses después de la dosis inicial, pero no antes de los 24 meses de edad. La inmunización previa no modifica la respuesta inmunológica ni produce reacciones adversas a vacunas subsecuentes. los padres de los niños inmunizados d entre 18 y 23 meses de edad deberán estar concientes de la revacunación.
- Los niños de entre 18 y 23 meses de edad que pertenecen a grupos de alto riesgo (ejemplo las guarderías) deberán considerarse candidatos para la inmunización.
- La vacunación no se recomienda en niños menores de 18 meses de edad.
- Los niños con padecimientos crónicos concomitantes con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades invasivas por *H. influenzae* tipo b (aerolencia anatómica o funcional y lesiones malignas relacionadas con inmunosupresión) deberán recibir la vacuna, aunque la información sobre su eficiencia aún es limitada. Dentro de este grupo deben incluirse niños mayores de 60 meses de edad.
- Los niños con deficiencias en la síntesis de inmunoglobulinas posiblemente no se beneficien de la vacuna y deberán seguir recibiendo dosis periódicas de inmunoglobulinas.
- Los niños que entraron en contacto en el hogar o guardería con casos de enfermedad invasiva y que habían sido previamente vacunados deberán recibir también el tratamiento profiláctico antes descrito. Aunque se considera que estos niños corren un riesgo menor, la vacuna no parece afectar el estado de portador, y el organismo puede transmitirse a otros niños susceptibles.
- Todos los casos de enfermedades invasivas por *H. influenzae* deberán reportarse a la Oficina de Alimentos y Fármacos (FDA) o la CCD. Además todos los eventos graves que se presenten en un lapso de 28 días posteriores a la vacuna deberán informarse al departamento de salud del Estado o a la FDA.

ANEXO II

PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

La quimioterapia de infecciones por *H. influenzae* cada vez resulta más difícil por la rápida aparición de organismos resistentes a los fármacos, incluso cepas que tienen la resistencia mediada por cromosomas o plásmidos. Según la localización geográfica, se ha señalado que la frecuencia de cepas que resisten a la ampicilina varían del 5 y 55%. También se han señalado cepas resistentes al cloranfenicol y tetraciclina.(5,56). Uno de los cambios más notables de *H. influenzae* ha sido la resistencia progresiva a la acción de los fármacos antimicrobianos en uso (20), los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en *H. influenzae*, por lo general están relacionados con la presencia de plásmidos "R". Se han descrito diferentes especies moleculares de plásmidos de resistencia en *H. influenzae* y microorganismos relacionados; sin embargo, se han caracterizado por lo menos los que codifican para la resistencia de penicilinas naturales y semisintéticas, cefalosporinas y fármacos análogos, cloranfenicol y algunos aminoglucósidos (kanamicina). El determinante genético involucrado en la resistencia a las penicilinas y cefalosporinas, es el trasposón Tna (TNI), elemento que codifica la producción de lactamasa beta, enzima que rompe el anillo beta lactámico o cefalosporánico. La resistencia al cloranfenicol se sabe que está medida por la enzima acetiltransferasa, que cataliza la reacción: cloranfenicol + acetil - S - CoA hacia 3 acetoxicloranfenicol 2 HS - CoA. En cambio, en relación a la resistencia a los aminoglucósidos no se ha descrito cuál de las enzimas "inactivantes" de los aminoglucósidos es la involucrada.(18,45,46)

El estudio de la transferencia genética de los determinantes de resistencia ha permitido demostrar que en *H. influenzae*, los plásmidos involucrados pueden ser "donados" por conjugación, mecanismo que pudiera llevarse a cabo *in vivo*; sin embargo, no debe descartarse la transformación y la transducción como sistema de transferencia genética, que en un momento pueda explicar la diseminación de los diferentes plásmidos R.(18)

Davis y col. en 1978, reportaron que la resistencia a la tetraciclina en *H. influenzae* está medida por el transposón Tn10, transposón que posee la información necesaria para que el antibiótico no penetre al interior de la célula bacteriana, o en su defecto para que se dé un aumento en la secreción del antibiótico hacia el medio externo.(38)

La resistencia a la Kanamicina fue demostrada por Dang Van y col. en 1975, los cuales determinaron que la resistencia residía en un plásmido transferible. (39)

La posibilidad de que uno de cuatro o cinco de los procesos infecciosos graves, ocasionados por *H. influenzae* tipo b, tengan como características_ ser beta lactamasa positivos, plantean la necesidad de buscar otras alternativas para

el tratamiento antimicrobiano.(18) La quimioterapia de infecciones invasoras por *H. influenzae* varía según los lugares y la naturaleza de la infección. Algunos de los diversos antimicrobianos que se utilizan, sean aislados o en combinaciones variadas, son: penicilina G, ampicilina, amoxicilina, meticilina, sulfamidas, eritromicina, cefamandol, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, estreptomina, trimetoprim sulfametoxazol y las nuevas cefalosporinas.(5,45-47)

Una alternativa atractiva la representan las cefalosporinas de tercera generación, como: cefuroxima, cefatoxima, moxalactam. En las cuales la modificación en el núcleo "cefem", les confiere amplio espectro(entre ellos acción contra *H. influenzae*), estabilidad, potencia y resistencia a los beta lactamasa. La dosis de los antibióticos que se administren son por kg/día, siguiendo las especificaciones pediátricas para cada uno de ellos.

El esquema con antibióticos se debe prolongar por lo menos durante diez días, aunado a las medidas de sostén de acuerdo con el padecimiento.(45-47)

QUIMIOPROFILAXIS

- El tratamiento inicial para los niños con meningitis posiblemente causada por *H. influenzae* de tipo b puede consistir en cefotaxima, ceftriaxona o ampicilina en combinación con cloramfenicol. No debe utilizarse ampicilina sola como tratamiento inicial dado que, según la localidad, el 12 al 40% de los aislamientos de *H. influenzae* producen beta-lactamasa y, por lo tanto, son resistentes a la ampicilina. La resistencia al cloramfenicol también es común en algunos países, hasta 1993 rara vez ha sido comunicado en E.U.A.
- Para los pacientes con meningitis no complicada que responden rápidamente suele ser satisfactorio el tratamiento durante 7 a 10 días con un antibiótico apropiado (es, decir, aquel al cual el microorganismo es susceptible por pruebas in vitro), administrado por vía intravenosa en una dosis alta. En casos seleccionados puede utilizarse tratamiento oral con cloramfenicol, En casos complicados de meningitis causada por *H. influenzae*, puede estar indicado el tratamiento durante más de 10 días.
- Para el tratamiento de otras infecciones invasoras por *H. influenzae* las recomendaciones son similares pero se basan principalmente en la experiencia empírica.
- La farmacocinética del cloramfenicol es imprevisible. Además el tratamiento concomitante con algunos fármacos como fenobarbital, fenitoína, carbamazepina y rifampicina puede alterar el metabolismo del cloramfenicol. Por el contrario, el cloramfenicol puede interferir en el metabolismo de agentes tales como la fenitoína, la tolbutamina y el dicumarol. Por ende si se cuenta con las pruebas, deben controlarse las concentraciones séricas del cloramfenicol en pacientes que reciben este fármaco.

- Se recomienda el tratamiento de dexametasona para lactantes y niños de 2 meses y mayores con meningitis con *H. influenzae* tipo b.
- La epiglotitis es una emergencia médica. Se debe establecer rápidamente una vía aérea por tubo endotraqueal o traqueostomía.
- El líquido sinovial, pleural o pericárdico infectado debe ser drenado.
- Para otitis media muchos expertos recomiendan el tratamiento oral con amoxicilina como terapéutica inicial. Los agentes alternativos eficaces, especialmente para las cepas de *H. influenzae* resistentes a la ampicilina, incluyen trimetropina-sulfametoxazol, eritromicina-sulfisoxazol, amoxicilina-ácido clavulánico, defaclor, cefixima, acetato de cefuroxima y otras cefalosporinas orales de espectro ampliado y agentes relacionados que cuentan con la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la otitis media.
- *Está indicado el tratamiento respiratorio durante 24 horas después de iniciada la antibioticoterapia eficaz (2-7).*

Se recomienda la quimioprofilaxis a los contactos y convivientes cercanos de los casos confirmados, menores de cuatro años de edad, los contactos expuestos en el domicilio, en centros de cuidado infantil y salas de recién nacidos, independientemente de los antecedentes de vacunación.

La Academia Norteamericana de Pediatría aconseja dar la quimioprofilaxis con el esquema siguiente:

ANTIBIOTICO	EDAD	DOSIS	DURACION
RIFAMPICINA	HASTA 1 MES	10 MG/KG/DÌA	4 DIAS
	1 MES A 12 AÑOS	20 MG/KG/DÌA	4 DIAS

TOMADO DE: EPIDEMIOLOGIA, SSA, 1997(34)

Una conducta similar se seguirá en las guarderías donde hay contactos que tengan menos de dos años de edad, a quienes se complementará el esquema de tres dosis o se les aplicará el refuerzo de la vacuna DPT-Hib.

La profilaxis se debe iniciar tan pronto como sea posible, de preferencia dentro de las primeras 24 horas del diagnóstico del caso índice. En adultos la quimioprofilaxis con rifampicina no excederá de los 600 mg/día/durante 4 días.(18,34).

XII. APENDICE.

PRUEBA DE SATELITISMO A COLONIAS DE *S. aureus*.

Procedimiento:

Se inocula una placa de gelosa sangre y otra de agar soya tripticaseína con la cepa sospechosa de *H. influenzae* y se extiende sobre la superficie en estrías muy cerradas. Con una asada de *Staphylococcus aureus* se siembra una estría única a la mitad de cada placa. Se incuba a 35°C con tensión de dióxido de carbono durante toda la noche y se busca el crecimiento de colonias típicas de *H. influenzae* en la cercanía de las estrías de *S. aureus*.^{13,21}.

PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE REACCIONES HEMOLÍTICAS

Procedimiento:

La cepa bacteriana en estudio se siembra por estría en gelosa sangre y se incuba 24- 48 hrs a 37 °C en baja tensión de oxígeno. En estas condiciones *H.influenzae* no tiene acción hemolítica y eso la diferencia de otras especies, especialmente de *H. haemolyticus* y de *H. parahaemolyticus*.

PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Todas las pruebas bioquímicas se inoculan con una asada gruesa, proveniente de un cultivo puro (24 hrs) en gelosa chocolate. Los tubos se incuban a 37°C , leyéndose los resultados después de 4 horas de incubación,(de 2 a 5 días como máximo, antes de descartarlos)⁴⁰. Las pruebas de descarboxilación de la ornitina, en algunos casos se debe dejar incubar 25 hrs.

Estas mismas pruebas se han montado en una forma rápida, una de las ventajas que representan es que el microorganismo no necesita crecer y por lo tanto no incluyen factores de crecimiento^{14,25,40}.

PRUEBA DE INDOL Y ORNITINA

Se emplea el medio MIO para las dos pruebas mencionadas, inoculando el medio por punción y se incuba de 18-24 hrs y se realiza la interpretación de resultados : La producción de indol se registra añadiendo unas gotas de reactivo de Kovacs, que adquiere una coloración roja, si el indol está presente. Ningún cambio al agregar el reactivo de Kovacs es indol negativo.

El catabolismo de la ornitina se aprecia por el vire del indicador del medio púrpura. La coloración amarilla en el fondo del medio, que puede ser púrpura al final es ornitina descarboxilasa negativo.

PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE UREA

Medio Caldo Urea de Stuart.

Se inocular una asada en el medio, se incuba 18-24 hrs y se realiza la interpretación de resultados:

La presencia de ureasa es detectada por la alcalinización del pH y el virre consecuente del indicador a un color rojo oscuro del caldo.