

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL NORTE

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA
A ANTIBIÓTICOS DE *Haemophilus influenzae*

TUDO · LO · ILUMINAN

DISERTACIÓN

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO

Opción Análisis Clínicos

Presenta

KARLA LIZETH PÉREZ SOTO

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darme la dicha de tener unos padres maravillosos.

A MIS PADRES que siempre estuvieron conmigo dándome ánimos y fuerzas para seguir adelante en mi carrera a pesar de las adversidades.

A MIS HERMANAS que me apoyaron y me animaron para seguir adelante en las metas que me propuesto.

A MIS MAESTROS que me dieron sus conocimientos para terminar mi carrera así como sus consejos para ser una triunfadora.

A MIS SINODALES M.C. María del Carmen García Moraga, M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda y Q.B. Rafael de la Rosa López por asesorarme y apoyarme en mi disertación, al igual que los consejos que me han brindado a lo largo de mi carrera.

A LA UNIVERSIDAD DE SONORA que fue como mi segunda casa, en donde compartí momentos de alegría a lado de mis compañeros.

CONTENIDO

	Páginas
LISTA DE TABLAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
OBJETIVOS.....	iv
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
CAPITULO 1	
1.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>Haemophilus influenzae</i>.	10
1.1.1 Clasificación.....	10
1.2 Morfología.....	10
1.2.1 Macroscópica.....	10
1.2.2 Microscópica.....	12
1.3 Fisiología.....	14
1.3.1 Metabolismo.....	16
1.4 ANTIGENICIDAD DE <i>Haemophilus influenzae</i>.	17
1.4.1 Capsular.....	17
1.4.2 Lipooligosacárido.....	19
1.4.3 Reacción serológica capsular.....	20
1.4.4 Antígeno somático.....	20
1.5 PATOGENICIDAD DE <i>Haemophilus influenzae</i>.	21

1.5.1 Factores estructurales.....	22
1.5.2 Factores toxigénicos.....	22
1.5.3 Factores enzimáticos.....	24
1.6 FACTORES QUE FAVORECEN LA PRESENCIA DE <i>Haemophilus influenzae</i>.....	25
1.6.1 Modo de transmisión.....	25
1.6.2 Epidemiología.....	25
1.7 INFECCIONES PROVOCADAS POR <i>Haemophilus influenzae</i>....	27
1.8 DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO PARA <i>Haemophilus</i>..	31
1.8.1 Muestra.....	31
1.8.2 Examen directo.....	32
1.8.3 Cultivo.....	32
CAPITULO II	
2.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA <i>Haemophilus influenzae</i>.....	34
2.1.1 Requerimientos nutricionales de factor X y V.....	34
2.1.2 Catalasa.....	36
2.1.3 Ureasa.....	36
2.1.4 Indol.....	39
2.2 PRUEBAS SEROLÓGICAS.....	41
2.2.1 Prueba de Quellung (hinchamiento capsular).....	41
2.2.2 Aglutinación en placa.....	42
2.2.3 Coaglutinación bacteriana.....	42
2.3 SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	43
2.3.1 Difusión con disco (Kirby-Bauer).....	44
2.3.1.1 Antibiograma.....	46
2.3.1.2 Factores de error en el antibiograma.....	48
2.3.1.3 Interpretación de resultados.....	49
2.3.2 Concentración Inhibitoria mínima (CIM).....	51
2.3.2.1 Microdilución en caldo.....	51
2.3.2.2 Escala de Mc Farland.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla	Páginas
1. Especies humanas y animales del género <i>Haemophilus</i>	6
2. Propiedades bioquímicas del <i>Haemophilus Influenzae</i>	9
3. Propiedades diferenciales de las especies de <i>Haemophilus</i> que colonizan al hombre.....	15
4. Polisacáridos capsulares del <i>Haemophilus influenzae</i>	18
5. Medidas de halo de inhibición recomendados por NCCLS.....	50
6. Escala de Mc Farland.....	55
7. Selección de antimicrobianos recomendados por NCCLS.....	58
8. Comparación de métodos de susceptibilidad para <i>Haemophilus</i> ...	61
9. Cepas ATCC recomendadas para el control de calidad por NCCLS para <i>Haemophilus influenzae</i>	62

LISTA DE FIGURAS

Figura	Páginas
1. <i>Haemophilus influenzae</i>	13
2. Estructura de la unidad repetitiva polirribosa-ribitol-fosfato.....	23
3. Algoritmo para Aislamiento, Identificación y Serotipificación de <i>Haemophilus influenzae</i>	33
4. Requerimientos nutricionales de factores X y V.....	35
5. Prueba de la Catalasa.....	37
6. Prueba de la Ureasa.....	38
7. Prueba de Indol.....	40
8. Difusión con disco.....	45
9. Medición de halo de inhibición.....	47
10. Placa para la determinación de la CIM.....	53

RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de la población en general y de la población infantil a nivel mundial, siendo el principal causante *Haemophilus influenzae (Hi)*.

Hi es un bacilo Gram negativo inmóvil, que no forma esporas, con requerimiento nutricionales exigentes, crece aerobia y anaeróbicamente. El crecimiento aerobio requiere la presencia de hemina (factor X) y nicotinamida adenina dinucleótida (factor V). El bacilo fue descubierto por Pfeiffer en 1892 durante una pandemia de influenza. Desde 1930 se conoce seis serotipos capsulares de la a hasta la f. La cápsula representa el mayor factor de virulencia de esta bacteria y la mayor parte de las infecciones invasivas serias son causadas por el serotipo capsular b.

Existen también cepas no capsuladas que pueden producir infecciones en humanos. Actualmente existe una vacuna para prevenir infecciones causadas por el serotipo b. *Hi* es un habitante normal de la vía respiratoria superior, produciendo las formas invasivas de infección representadas por los cuadros clínicos de otitis media, meningitis, epiglotitis entre otras. Los niños pequeños son más susceptibles a ser infectados sobre todo cuando el ambiente familiar existe otra persona portadora.

El método más confiable para establecer el diagnóstico de una infección por *Hi* es la recuperación de la bacteria en cultivo. Existen varios métodos directos y rápidos que permiten el diagnóstico por ejemplo aglutinación de látex, coagulación los cuales detectan el antígeno capsular. Es posible y a veces necesario efectuar ciertas pruebas bioquímicas para identificar *Hi* de otras especies de *Haemophilus*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparación de métodos de detección de la resistencia a antibióticos de *Haemophilus influenzae*.

Objetivos específicos

1. Conocer el método de resistencia a los antibióticos por medio de difusión con disco (Kirby-Bauer)
2. Conocer el método de resistencia a los antibióticos por medio de la concentración mínima inhibitoria (CIM).
3. Resaltar el método apropiado para la identificación de la resistencia a antibióticos de *Haemophilus influenzae*

4. Establecer el control de calidad en el método de difusión con disco (Kirby-Bauer), para *Haemophilus influenzae*.

INTRODUCCION

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) son uno de los problemas de salud mas importante en los países en desarrollo, donde estas constituyen una de las primeras cinco causas de mortalidad en niños menores de 5 años y la primera causa de consulta y hospitalización en los servicios de pediatría. A nivel global se estima que en el año 2000 ocurrieron casi 4 millones de defunciones por infecciones de las vías respiratorias inferiores. (Alvis N; De la Hoz F; Vivas D. **2007**; Morales S. **2003**)

En países en desarrollo, diversos estudios han demostrados que más de la mitad de los casos de neumonía están producidos por bacterias, entre las que predominan *Streptococcus pneumoniae* (30%) y *Haemophilus influenzae* tipo b (*Hib*) (27%), dando lugar a las enfermedades invasivas como: neumonía, meningitis, sepsis, artritis, peritonitis y enfermedades locales como: artritis séptica, epiglotitis, celulitis, neumonía y septicemia; también producen en forma más frecuente: otitis media, sinusitis y conjuntivitis. (Villaseñor A; Herrera E; Vázquez P; Arroyo J; Santos J. **1996**)

Hib es el principal causante de la meningitis bacteriana endémica de la población infantil de los países de América, causando hasta el 30% de los

casos de neumonía con cultivo positivo y entre 20 y 60% de meningitis bacteriana, con una letalidad cercana de 40%. Se estima que este patógeno causa la mitad de los casos de neumonía que motivan ingresos en centros de tercer nivel de atención. (Alvis N; De la Hoz F; Vivas D. **2007**)

El más patógeno para el ser humano es *Haemophilus influenzae*, seguido de *H. parainfluenzae*, *H. ducreyi* y *H. aphrophilus*. Debido a las cepas con capsula polisacárida, sobre todo el serogrupo b (*Hib*). (Campos J. **1998**)

Hi es una bacteria cocobacilar Gram negativa inmóviles, que se encuentra entre las más pequeñas, miden (1.0 a 1.5µm) los hacen parecer casi redondos, de aquí el termino cocobacilos, se han encontrado cepas capsulares (tipificable) o carecer de ella (no tipificable). (Ryan K; Ray C. **2004**) Son anaerobio y aerobio facultativo requieren uno o dos factores de crecimiento específico presentes en la sangre. Algunos necesitan el factor X, que consiste en hem, hematina u otros tetrapirroles. Otros requieren el factor V, que consiste en dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o fosfato de NAD (NADP). (Walker S. **1998**)

La virulencia de estos microorganismos en la especie humana depende de la formación de cápsula; estos microorganismos no producen ningún tipo de exotoxinas, y no se ha demostrado que su endotoxina tenga un papel importante en la patogenicidad del germen. Por tanto, los anticuerpos anticapsulares homólogos tienen un papel protector, que no poseen los anticuerpos antiendotóxicos. (Davis B; Eisen H; Dulbeco R; Ginsberg H. **1978**)

Una variedad de métodos pueden ser utilizados para medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos a antimicrobianos, el de uso más común en los laboratorios de microbiología es la difusión en agar estandarizados para microorganismos de crecimiento rápido y de algunos de crecimiento fastidioso. (Cona E. **2002**)

Por otro lado, el aumento de la resistencia de los agentes infecciosos a los antimicrobianos es una amenaza para la salud pública, e incluso para la estabilidad y seguridad de las naciones. Se ha reportado aparición de resistencia de *S. pneumoniae* y de *H. influenzae* a los antibióticos. (Morales S. **2003**)

Tanto *H. influenzae* como *H. parainfluenzae* pueden presentar resistencia solo a la ampicilina o bien asociada a resistencia múltiple a otros fármacos como el cotrimoxazol, cloramfenicol, tetraciclinas, cefalosporina que se han extendido ampliamente a varias partes del mundo. (Campos J. **1998**)

La incidencia de enfermedad invasiva por esta bacteria ha disminuido en 98% en los Estados Unidos desde la introducción de la vacuna conjugada en los países industrializados. Así como en Chile, España y Brasil ha disminuido un 60% en la incidencia de este microorganismo. (Morales S. **2003**; García C; Lozano P; Rivera J; Rocha R; Giono S. **2008**)

No obstante, según la organización mundial de la salud (OMS), la frecuencia de infecciones graves por *Hib* continua siendo elevado, con no menos de dos millones de casos anuales. Esto es debido a que la vacuna no se utiliza en un gran número de países subdesarrollados, pero, a su vez, muy poblados. Se estima que en los países más ricos del mundo, que son los que pueden permitirse la financiación de la vacuna generalizada, se evitan unos 4000 casos de enfermedades invasoras anuales. (Campos J. **1998**)

ANTECEDENTES

El género *Haemophilus* comprende un grupo de bacilos Gram negativos pequeños, inmóviles, que requieren de factores de desarrollo presentes en la sangre; el nombre del género proviene de dos palabras griegas que significan “que ama la sangre”. (Koneman E; Allen S; Janda W; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

Los miembros del género son parásitos obligados para el ser humano y otros vertebrados. Poseen una marcada especificidad por el huésped y con muy pocas excepciones, cada especie se asocia de manera exclusiva con un huésped específico. En el ser humano casi todas las especies de *Hi* son miembros de la flora nativa del tracto respiratorio superior. (Wolfgang K; Willett H; Amos B; Wilfert C. **1994**)

Haemophilus influenzae (Hi) fue identificado como patógeno por Robert Koch en 1883, en un exudado directo coloreado con Gram de un exudado conjuntival, sin embargo, en general se acredita a Richard Pfeiffer en 1892, este investigador lo aisló por primera vez a partir del esputo de los pulmones de pacientes que habían muertos en una pandemia de influenza, los cual los llamo bacilos de Pfeiffer. (González D; Judais F; Routaboul V; Zaniolo C; Flynn L. **2007**) Para 1930 Margaret Pittman identificó seis serotipos de la a hasta la f, basados en la

composición de la cápsula polisacárida lo cual los clasificó en capsulados y no capsulados, Wilson y Miles en 1917 establecieron el género *Haemophilus*. (Gatti B; Ramírez G; Etchevarría M; Vescina C; Varea A; González S. **2004**; Ryan K; Ray C. **2004**)

En 1976, Kilian realizó la diferenciación de las especies de *Haemophilus*, particularmente de *H. influenzae*. Esta última quedó inicialmente clasificada en 6 biotipos con base en tres reacciones bioquímicas: producción de Indo, actividad de la ureasa y catalasa. Dentro de su taxonomía se encuentra que es de, Reino Procarionte, Orden Eubacteriales, Familia Pasteurellaceae, Genero *Haemophilus* y Especie *Influenzae*. (Tamargo I. **2005**)

Actualmente, el género *Haemophilus* se clasifica en la familia *Pasteurellaceae*, que también incluye los géneros *Pasteurella* y *Actinobacillus*. El género *Haemophilus* comprende nueve especies humanas y varias especies que se hallan en cerdos, vacunos, caballos, conejo, aves de corral y ovino. (ver tabla 1) Las especies humanas de *Haemophilus* se asocian con las vías respiratorias altas, con excepción de *Haemophilus ducreyi* que causan una enfermedad de transmisión sexual denominada chancroide. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

Las especies de *Haemophilus* se encuentran entre las bacterias más pequeñas. Los extremos incurvados de estos bacilos cortos (1.0 a 1.5 μm) los hacen parecer casi redondos, de aquí el termino cocobacilos, su pared celular tiene estructura similar a la de las otras bacterias Gram negativas. *Hi* puede tener cápsula polisacárida pero otras especies de este género no son capsulados. (Ryan K; Ray C. **2004**)

Son anaerobios y aerobios facultativos requieren uno o dos factores de crecimiento específicos en la sangre. Algunos necesitan el factor X, que consiste en hem, hematina u otros tetrapirroles. Otros requieren el factor V,

que consiste en dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o fosfato de NAD (NADP). (Walker S. **1998**)

Tanto el factor X, termostable como del factor V, termolábil están presentes en los eritrocitos, incluidos en los glóbulos rojos de carnero empleados en el agar sangre que habitualmente se emplea en los laboratorios clínicos. La sangre de carnero también contiene enzimas que hidrolizan lentamente el factor V.

TABLA 1. Especies humanas y animales del género *Haemophilus*

<i>Especies humanas</i>	<i>Especies animales</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>H. parasuis</i> (Ganado porcino)
<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. paragallinarum</i> (aves de corral)
<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. paracuniculus</i> (conejo)
<i>H. parahaemolyticus</i>	<i>H. haemoglobinophilus</i> (perros)
<i>H. aphrophilus</i>	<i>H. felis</i> (gatos)
<i>H. paraphrophilus</i>	
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	
<i>H. segnis</i>	
<i>H. ducreyi</i>	

FUENTE: Zinser 1994

En consecuencia los hemófilos dependientes de factor V no suelen desarrollarse en agar sangre de carnero con eritrocitos intactos, estos factores fueron identificados por Lowffs en 1937. (Davis B; Eisen H; Dulbeco R; Ginsberg H. **1978**; Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

El ligero calentamiento de la sangre para la elaboración del agar-chocolate libera estos compuestos. Así como otros nutrientes, que permite el crecimiento de las especies de *Haemophilus* también requieren protoporfirinas IX, hierro y cualquier nucleótido de piridina para el crecimiento aerobio. (Schaechter M; Medoff G; Eisentein B; Guerra H. **1994**)

En los medios de cultivo no se presentan concentraciones óptimas de factores X y, en particular, V, para *Haemophilus*, a menos que se lisen los eritrocitos mediante el calor suave (agar-chocolate) o se digieran y añadan por separado a manera de complemento. Aunque los eritrocitos son las únicas fuentes adecuadas de hematina, el factor V se encuentra en diversas fuentes biológicas, y lo producen algunas otras bacterias y ciertas levaduras. Con el cual surge el llamado “fenómeno satélite”, que consiste en que las bacterias forman colonias en medios de agar-sangre solo cuando están cerca de una colonia de *Staphylococcus* que produce factor V. Las diversas especies de *Haemophilus* se definen por sus necesidades de factores X y V, su dependencia del CO₂ y otras características del cultivo. (Ryan K; Ray C. **2004**; Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

Se identifican más de 15 especies de *Haemophilus* y se sabe que cerca de 10 de ellas ocasionan enfermedades en los humanos. *Haemophilus influenzae* es el patógeno humano más importante, en tanto

que *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus ducreyi* y *Haemophilus parainfluenzae* también son causas importantes de enfermedades en humanos. (Walker S. **1998**)

Hi es una bacteria Gram negativa que coloniza normalmente la nasofaringe humana, aunque también puede causar enfermedades sistémicas y localizadas. Sus diferentes cepas pueden poseer en su superficie una cápsula o no hacerlo, por lo que se divide en *H. influenzae* encapsulada (tipificable) y no encapsulada (no tipificable). (Freitas A; Merchán-Hamann E. **2006**)

Las bacterias encapsuladas se pueden clasificar en seis serotipos designados con las letras de la a hasta la f; el serotipo b es el más importante desde el punto de vista epidemiológico. (García C; Lozano P; Rivera J; Rocha R; Giono S. **2008**)

La separación de cepas de *Hi* en subgrupos o biotipos puede lograrse por medio de una batería de pruebas bioquímicas basadas en las propiedades fenotípicas de los microorganismos (ver tabla 2). *Hi* es bioquímicamente heterogéneo y los factores no capsulares, con frecuencias predecibles por la biovariedad, se asocian con la virulencia. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

Recientemente se ha reconocido a *Haemophilus influenzae* tipo b (*Hib*) como agente etiológico frecuente de infecciones locales por contigüidad, tales como otitis media, sinusitis y conjuntivitis, en niños pequeños. Además en esta última década, se ha descrito como agente causal de enfermedades invasivas tales como neumonía y meningitis en niños de los países en desarrollo. Las cepas con cápsula, en especial las de tipo b, causan hasta el 95% de las meningitis bacterianas así como otras infecciones severas tales como artritis y neumonía, en niños entre los 3 meses y los 5 años de edad de paises en desarrollo, como México. (Villaseñor A; Herrera E; Vázquez P; Arroyo J; Santos J. **1996**)

TABLA 2. Propiedades bioquímicas del *Haemophilus influenzae*

Biovariedad	Indol	Ureasa	Ornitina descarboxilas a	Catalasa	Oxidasa
I	+	+	+	+	+
II	+	+	-	+	+
III	-	+	-	+	+
IV	-	+	+	+	±
V	+	-	+	+	+
VI	-	-	+	+	+

FUENTE: Zinser 1994

CAPITULO I

1.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE *Haemophilus influenzae*

Los *Hib* clasificados así por la cápsula han ido adquiriendo importancia clínica a medida que ha ido transcurriendo el tiempo y su conocimiento ha ido aumentando; llegándose a determinar que son un verdadero problema de salud pública ya que además de producir infecciones superficiales no graves, son causa de infecciones invasivas que llevan a la muerte o enfermedades graves que deja severas secuelas constituyéndose en verdaderos problemas de diagnóstico y terapéutica. (Valenzuela R. **1999**)

1.1.1 Clasificación

1.2 Morfología

1.2.1 Macroscópica

El agar-chocolate es el medio más utilizado para el aislamiento de especies de *Hi*. Para su preparación se añade sangre a la base de agar y se calienta a 80° C hasta que tome un color marrón. El calor libera los factores X y V de las células sanguíneas y también inactiva las enzimas para el factor V, pero deben evitarse un calentamiento prolongado por que el factor V es termolábil. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

El máximo desarrollo se alcanza a 37° C con un pH de 7.4 a 7.8 en condiciones aeróbicas; para su aislamiento primario se recomienda una incubación en presencia de dióxido de carbono al 10% por que tiene un efecto incrementador; en general las colonias son pequeñas y similares a gotas de rocío y tienen una apariencia áspera o rugosa. Esta colonia por lo general tienen un diámetro de 0.5 a 1.5 mm. El *Hib* aislado de enfermedades invasivas producen colonia mucoides y brillantes. (Davis B; Eisen H; Dulbecco R; Ginsberg H. **1978**, Brooks G; Butel J; Morse S. **2005**)

Los medios de agar enriquecido de Levinthal y Fildes también son útiles para el cultivo de muestras clínicas y los medios de agar sangre comunes permiten la proliferación de *Hi* solo cuando la placa de agar se inocula de manera cruzada con un *Staphylococcus aureus* u otro microorganismo que libera el factor V. (Walker S. **1998**)

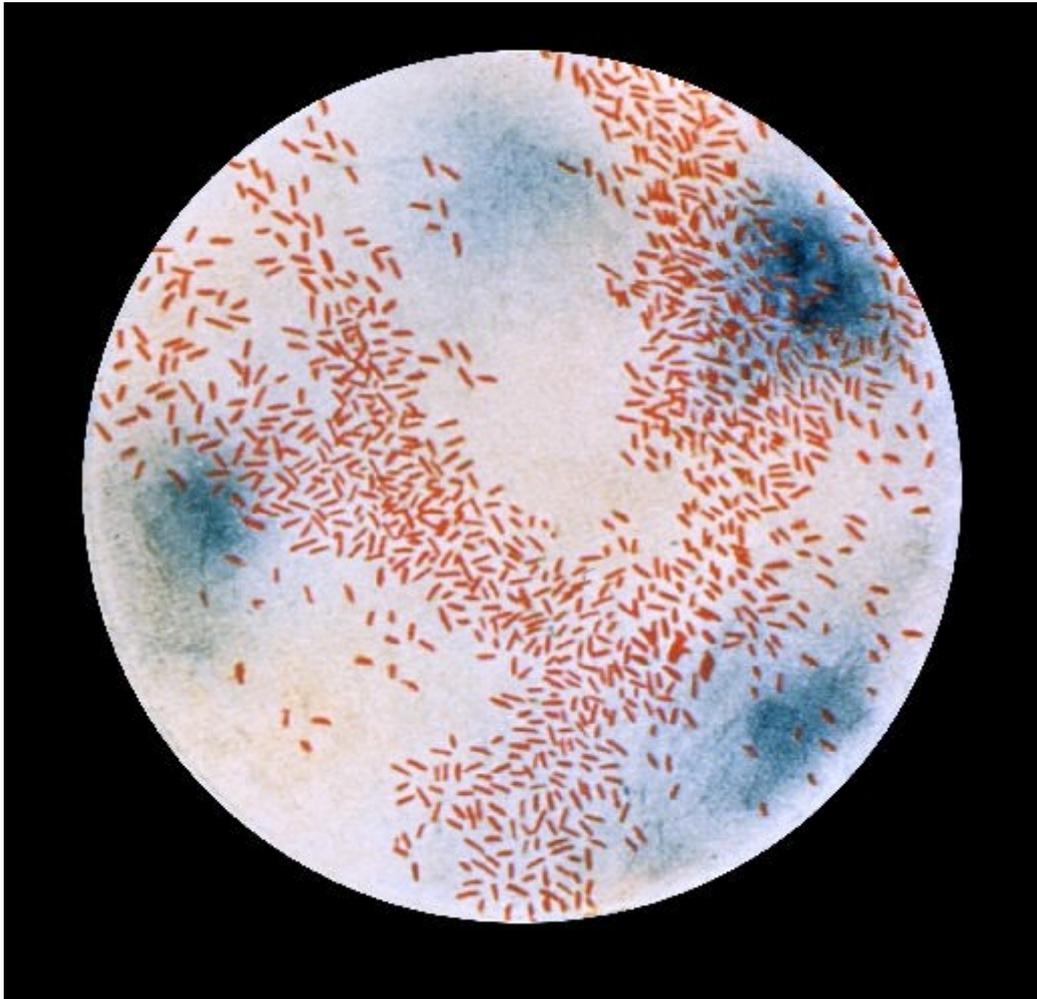
El agar sangre de Casman, con la aplicación de un disco con 10 µm de bacitracina en el área de inoculación más abundante, constituye un método útil para el aislamiento selectivo de especies de *Hi* y pueden reconocerse debido al crecimiento alrededor del disco de bacitracina en este medio y además se puede detectar las propiedades hemolíticas del *H. haemolyticus* se agregara nicotinamida y almidón de maíz para incrementar el crecimiento de las especies de *Haemophilus* y se agregará sangre para proporcionar el factor X y detectar hemólisis.

La proliferación en cualquier agar semisólido es evidentes entre los 18 y 24 horas después de la inoculación pero los cultivos de *Hi* son difícil de mantener en el laboratorio por su tendencia a la autólisis, para mantener en forma a apropiada a los microorganismo virulentos se requieren transferencias frecuentes en medio de agar-chocolate u otros enriquecidos. (Wolfgang K; Willett H; Amos B, **1994**)

1.2.2 Microscópica

El género *Haemophilus* comprende un grupo de bacilos Gram negativos pequeños y pleomórficos. En el líquido cefalorraquídeo (LCR), el líquido articular o los cultivos primarios de estos materiales en un medio enriquecido, los microorganismos predominantes son cocobacilos uniformes de 0.2 a 0.3 por 0.5 a 0.8 mm puede haber cápsulas retráctiles débiles, demostrables por la reacción de Quellung (reacción de hinchazón) con anticuerpos específicos para el tipo, el *Hi* es Gram negativo pero puede variar en su coloración a menos que su procedimiento de tinción se realice con mucho cuidado.(ver figura 1) Los microorganismos no encapsulados que se encuentran en el esputo o de las aspiraciones del oído son más alargadas que los microorganismos encapsulados y pueden presentar una coloración bipolar con la tinción de Gram, lo que puede producir confusión. (Davis B; Eisen H; Dulbecco R; Ginsberg H. **1978**; Brooks G; Butel J; Morse S. **2005**)

FIGURA 1. *Haemophilus influenzae*



FUENTE: Zinser 1994

1.3 Fisiología

Todas las especies de *Hi* requieren uno o los dos factores de crecimiento presentes en la sangre denominados X y V. (ver tabla 3) El factor X es la hematina y el factor V es el NAD o un compuesto similar.

El factor X no es una sola sustancia sino más bien un grupo de compuestos tetrapirroles termostables que son proporcionados por pigmentos que contienen hierro; por lo general son hemina y la hematina. Los microorganismos que dependen de este factor para su crecimiento son incapaces de sintetizar protoporfirinas a partir de ácido δ-aminolevulínico. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**; Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

Al parecer las especies hemina-dependientes carecen de todas las enzimas para la síntesis del tetrapirrol con excepción de la ferroquelatasa o hemo-sintetasa, que están presentes en la forma variable y que cataliza la inserción final de Fe^{+2} o Fe^{+3} en el anillo de protoporfirina.

El factor termolábil V es un dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) o NAD fosfato (NADP) que funciona como enzimas para las deshidrogenasa unidas a la piridina. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

TABLA 3. Propiedades diferenciales de las especies de *Haemophilus* que colonizan al hombre

Especies	Requerimientos De factor V	Requerimientos de factor X	Requerimiento de CO ₂
<i>H. influenzae</i>	+	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	-
<i>H. ducreyi</i>	-	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	+	-	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	+	-	-
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	+	-	+
<i>H. aphrophilus</i>	-	+	+
<i>H. paraphrophilus</i>	+	-	+
<i>H. segnis</i>	+	-	-

FUENTE: Zinser 1994

1.3.1 Metabolismo

El *Hi* es anaerobio pero también un anaerobio facultativo. En un medio libre de oxígeno utiliza nitrato como aceptor final de electrones, la única Quinona producida por *Hi* es la dimetilmenaquinona (DMK), pero algunas especies también producen Ubiquinona, mientras que la Ubiquinona es utilizada en la síntesis del transporte de electrones que conducen solo aceptores de alta potencia, como el Oxígeno o nitrato la DMK puede ser utilizada para el transporte de electrones tanto en la aerobiosis como anaerobiosis. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

1.4 ANTIGENICIDAD DE *Haemophilus influenzae*

A semejanza de los neumococos, los antígenos de *Hi* que despiertan la formación de anticuerpos protectores son sus carbohidratos capsulares. Se han descrito seis tipos, cada uno con diferentes antígenos capsular. El *Hi* encapsulado se puede tipificar mediante aglutinación en placa, coagulación con estafilococos o aglutinación de partículas de látex cubiertas con anticuerpos específicos del tipo. (Davis B; Eisen H; Dulbecco R; Ginsberg H. **1978**; Brooks G; Butel J; Morse S. **2005**)

1.4.1 Capsular

El *H. influenzae* contiene tres clases principales de antígenos de superficie: el polisacárido capsular, el lipopolisacárido y las proteínas de membrana externa. Se ha introducido cierto número de esquema de tipificación y subtipificación basados en la diversidad de estos antígenos.

El principal determinante antigénico del *Hi* es el polisacárido capsular. Este polisacárido confiere especificidad de tipo microorganismo y es la base para el agrupamiento de los microorganismos en seis serovariedades, denominados de a hasta f. (Wolfgang K; Willett H; Amos B, **1994**)

Hay seis tipos de capsula y se denomina con las letras de la a hasta la f. (ver tabla 4) .Casi todas las enfermedades sistémicas de la niñez se debe a microorganismos que expresan cápsulas de tipo b, llamados *Haemophilus influenzae* tipo b (*Hib*).

TABLA 4. Polisacáridos capsulares del *Haemophilus influenzae*

<i>Tipo</i>	<i>Azúcar</i>	<i>PO₄</i>	<i>Acetilo</i>
a	Glucosa	+	-
b	Ribosa y ribitol	+	-
c	Galactosa	+	-
d	Hexosa	-	-
e	Hexosamina	-	+
f	Galactosamina	+	+

FUENTE: Zinser 1994

La cápsula tipo b es la única que contiene una azúcar pentosa, está formada por polirribosa y cadena de fosfato de ribitol y se designa

simplemente como PRP (fosfato de polirribosa). (Walker S. **1998**; Davis B; Eisen H; Dulbecco R; Ginsberg H. **1978**; Brooks G; Butel J; Morse S. **2005**)

1.4.2 Lipooligosacárido

Lo mismo que la membrana externa de las neiserias patógenas, la membrana exterior de *Hi* contienen un lipopolisacárido burdo natural (LPS) llamado lipooligosacárido (LOS). A diferencia de los LPS de los bacilos entéricos los lipopolisacáridos internos que se encuentran en el LOS de *Haemophilus* son muy variables y están sometidos a variaciones de fases.

El LOS se libera en burbujas de la membrana externa (vacuolas) por las *Hib* al multiplicarse y también cuando la bacterias experimenta lisis. Actúan como un factor siliostático, daña el epitelio ciliado y hace que las células epiteliales se desprendan. Estudios experimentales de meningitis reportan que el LOS aumenta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Como LOS contienen un elevado porcentaje del lípido A, los pacientes con bacteriemia están en riesgos de presentar sepsias. (Walker S. **1998**)

1.4.3 Reacción serológica capsular

El *Hi* puede ser tipificado por la reacción de Quellung (hinchazón capsular) si se utiliza antisueros específicos de la serovariedad. La tipificación puede llevarse a cabo de manera directa en muestras clínicas frescas o en aislamiento primario. La aglutinación en portaobjeto es una técnica simple, rápida y precisa para uso de rutina en el laboratorio, pero debe de ser interpretado con cuidado y confirmada con otro procedimiento, contraelectroforesis o la coaglutinación.

La serovariedad del antígeno polisacárido capsular libre que se encuentra en los filtrados de cultivo y en los líquidos corporales puede ser identificada serológicamente por medio de la contraelectroforesis o por aglutinación por partículas de látex. Puesto que los microorganismos del tipo b causan más del 95% de enfermedades invasoras, la detección del antígeno capsular del tipo b es particularmente importante. ((Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

1.4.4 Antígeno somático

La envoltura celular del *Hi* consiste en una membrana externa y otra interna que contienen antígenos proteicos y LOS. El principal componente antigénico del LOS es una fracción oligosacárida no tóxica. Los anticuerpos contra este antígeno somático son independientes de la edad en contraste con la respuesta dependiente de la edad al polisacárido capsular.

El LOS del *Hib* consiste sólo en lípido A y una estructura análoga al oligosacárido del core del lipopolisacárido de las enterobacterias. El componente lípido A de LOS es muy específico para el *Hi* pero es

heterogéneo desde el punto de vista antigénico entre las cepas de *Haemophilus*. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

El interés por los antígenos proteicos de la membrana externa se ha intensificado a causa del fracaso de la vacuna preparada a partir del polisacárido capsular de *Hib* para conferir inmunidad protectora contra la enfermedad sistémica a los niños de menos de dos años de edad. Puesto que tanto los animales como los seres humanos desarrollan anticuerpos contra los antígenos de la membrana externa durante la infección por *Hib*, en la actualidad se están estudiando las proteínas de la membrana externa y se investiga su potencial de vacuna. (Walker S. **1998**; Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

1.5 PATOGENICIDAD DE *Haemophilus influenzae*

La virulencia de estos microorganismos en la especie humana depende de la formación de cápsula; estos microorganismos no producen ningún tipo de exotoxina, y no se ha demostrado que su endotoxina tenga un papel importante en la patogenicidad del germen. Por tanto, los anticuerpos anticapsulares homólogos tienen un papel protector, que poseen los anticuerpos antiendotóxicos. (Davis B; Eisen H; Dulbecco R; Ginsberg H. **1978**)

1.5.1 Factores estructurales

La mayoría de las infecciones son producidas por *Hib*, es el único de los seis serotipos capsulares que contienen una pentosa (ribosa) en lugar de una hexosa, como la subunidad de hidrato de carbono componente de la cápsula.

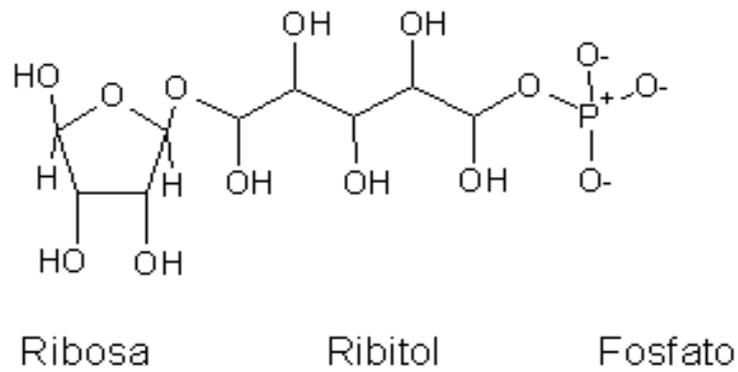
La sustancia capsular tipo b es un polímero lineal compuesto de ribosa, ribitol (un azúcar de 5 carbonos) y fosfato, (ver figura 2) o Polirribosil-ribitol-fosfato (PRP). Otros autores se refieren a la cápsula como fosforribosilribitol (PRRP) del *Hib*. Las infecciones sistémicas siempre son provocadas por cepas encapsuladas y casi siempre por las que elabora el polisacárido capsular del tipo b. Los anticuerpos contra la capsula del tipo b también promueven de manera efectiva la fagocitosis del *Hib* in vitro. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

1.5.2 Factores toxigenicos

Se han identificados varios otros factores potenciales de virulencia, tanto en cepas tipificables como no tipificables de *Haemophilus*. Han sido descritos pili que se adhieren a la mucosa nasal, donde pasan al subendotelio, entre las células epiteliales donde la diseminación ocurre. Los PRP, PRRP, los Pili, LOS y los componentes de membrana externa son necesarios para que una cepa sea totalmente virulenta.

La capacidad del *Hib* para ocasionar enfermedad sistémica es su cápsula antifagocítica, liberando cerca de la mitad del material capsular que

FIGURA 2. Estructura de la unidad repetitiva polirribosa-ribitol-fosfato



FUENTE: Koneman 1999

sintetiza el ambiente, donde actúa como atrayente para el anticuerpo anti-PRP. *Haemophilus* produce una proteasa de IgA1 que inactiva las

inmunoglobulinas (Ig) A1 humanas, que representan más del 90% de la IgA presentes en la orofaringe. (Koneman E; Allen S; Janda M. **1999**)

1.5.3 Factores enzimáticos

El *Hi* es una de las cinco especies de bacterias que se sabe que producen proteasas de IgA, enzimas que poseen la capacidad única de hidrolizar la cadena pesada de la IgA1 humana como su único sustrato conocido. Las proteasas de IgA son endopeptidasas neutras distinguibles de otras enzimas microbianas porque sus fragmentos de segmentación, Fab- α y Fc- α no experimentan degradación secundaria. *Hi* infecta principalmente las superficies mucosas del ser humano, donde las defensas del huésped están mediadas por la IgA secretora, la segmentación de la IgA podría contribuir al potencial de virulencia del microorganismo, es el único miembro del género que produce esta enzima.

Las cepas de *Hi* producen tres clases diferentes de proteasas de IgA que clivan las distintas uniones peptídicas dentro de la región bisagra de la IgA. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

1.6 FACTORES QUE FAVORECEN LA PRESENCIA DE *Haemophilus influenzae*

1.6.1 Modo de transmisión

El medio ambiente húmedo y cálido de las diversas regiones de nuestro país, es el lugar adecuado para este microorganismo. La bacteria se transmite de una persona a otra por vía respiratoria a través de gotitas de saliva o secreciones respiratorias aerosolizadas. Ingresan al organismo por la nasofaringe, la coloniza y permanece en ella durante algunos meses en forma asintomática. (Romanin V; Chiavetta L; Salvay M; Chiolo M; Regueira M; Barrios A; Califano G; García S; Gentile A. **2007**)

H. influenzae tipo b puede transmitirse mientras los microorganismos están presentes, aunque no haya secreción nasal. La enfermedad ha de ser trasmisible entre 24 y 48 horas después del comienzo del tratamiento con antibióticos. (Cruces R; Donoso F; Camacho A. **2006**)

1.6.2 Epidemiología

Las infecciones invasivas son uno de los problemas de salud pública más importantes en los países en desarrollo, donde afecta a niños menores de 5 años en los países en desarrollo e industrializados. Según la estimación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se estima que *Hib* produjo

10,2 millones de muertes por en menores de 5 años en el mundo, de los cuales, 1,856.000 se atribuyeron a infecciones respiratorias como neumonía y meningitis. (Alvis N; De la Hoz F; Vivas D. **2007**. Llop A. **2006**)

En nuestro país no se conoce la magnitud de la morbilidad y mortalidad producidas por estos patógenos ni la susceptibilidad de estos a los antimicrobianos de uso común. Según las estadísticas del Ministerio de Protección Social de Colombia, en 2001, la neumonía causó la muerte de alrededor de 5.000 niños menores de 5 años y el ingreso hospitalario de aproximadamente a 80.000 niños, mientras que la meningitis ocasionó la muerte de alrededor de 600 niños y el ingreso aproximadamente 3.000 niños. (Davis B; Eisen H; Dulbecco R; Ginsberg H. **1978**)

Además, la mortalidad en los casos tratado de meningitis es inferior al 10%. A pesar de ello, la meningitis por *Hi* produce de 1.500 a 2.000 muertes anuales en Estados Unidos, afectando principalmente a niños de corta edad. (Ryan K.; Ray C. **2004**)

1.7 INFECCIONES PROVOCADAS POR *Haemophilus influenzae*

Meningitis. Es la manifestación aguda más grave de la infección sistémica por *Haemophilus influenzae* b. Es usual el antecedente de una infección del tracto respiratorio superior y es muy frecuente la presencia previa o concomitante de una otitis media; a menudo puede asociarse con antecedentes de un traumatismo craneal reciente o remoto, neurocirugía, sinusitis, otitis o un escape de LCR. Esta infección grave, la meningitis puede causar de forma fulminante y conducir a la muerte en pocas, por lo general en los niños menores de 1 año de edad. (Llop A **2006**)

La incidencia de la enfermedad es de alrededor de 45 al 48% y se ha informado que va en aumento en los últimos años, más del 90% de los aislamientos obtenidos de casos de meningitis pertenecen al serotipo b. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

Los microorganismos se diseminan a la sangre procedente de la nasofaringe o del oído medio y después entran al sistema nervioso central en el plexo coroide altamente vascularizado. Una vez en el espacio subaracnoideo, se encuentran bastante aislados del sistema inmunitario y se multiplica con rapidez, esta enfermedad se debe a cepas tipificables o no tipificables. (Walker S. **1998**)

Epiglotitis. El *Hib* es el agente causal más frecuente de epiglotitis, esta infección es por lo general aguda, con comienzo brusco de edema laríngeo obstructivo. La epiglotitis aparece rara vez en lactantes, pero se le observa típicamente en niños entre los 2 y 7 años de edad. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

La epiglottitis infectada presenta microabscesos y el pronunciado edema puede ocasionar la obstrucción completa de las vías aéreas. La que requiere traqueotomía de emergencia dentro de las 12 horas del comienzo. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

Otitis media. El *Streptococcus pneumoniae* y el *H. influenzae* son los causantes más frecuentes de otitis media aguda. Esta infección se observa primordialmente en niños entre los 6 meses y los 2 años de edad. Más del 90% de las cepas de *Hi* recuperadas a partir del aspirado del oído medio de niños con este cuadro son no tipificable, y el 10% son microorganismos del tipo b. (Walker S. **1998**)

Los pacientes con otitis media aguda producida por *Hi* suelen presentar dolor de oídos, con exudación del oído externo o sin ella, también puede haber fiebre y otros síntomas sistémicos, particularmente en niños, hasta una cuarta parte de los niños con otitis media producida por microorganismos del tipo b pueden presentar concomitantemente bacteriemia, meningitis o ambas. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**. Walker S. **1998**)

Sinusitis. *H. influenzae* es el principal agente etiológico de esta infección, ya que este microorganismo es responsable de 20 a 25% de los casos de sinusitis aguda en los adultos y de 36 a 40% en los niños. *H. influenzae* y *S pneumoniae* fueron los microorganismos hallados con mayor frecuencia, estos agentes bacterianos pueden constituir invasores secundarios después de una infección viral. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

Neumonía. La neumonía por *Hi* puede ser otra manifestación de la infección sistémica por el microorganismo, o desarrollarse como prolongación y complicación de una infección primaria del tracto respiratorio. Los pacientes con enfermedad sistémica es lobular, segmentaria y purulenta; características que resaltan similares a las neumonía neumococicas. En estos pacientes los microorganismos capsulados de tipo b son los agentes etiológicos habituales. Las cepas no tipificables de *Hi* son causantes importantes de neumonía, con bacteriemia o sin ella. Además, se ha comunicado la presencia de neumonía bacteriémica producida por tipos capsulados de *Hi* diferentes del tipo b en pacientes con enfermedades subyacentes que disminuyen los mecanismos de defensa del huésped, local o sistémico. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

Bacteriemia. Es una manifestación frecuente y precoz de la infección aguda del *Hi* tipo b. Algunos niños pueden presentar bacteriemia primaria sin meningitis, pero eso se considera inusual. Sin embargo, la diseminación hematogena del microorganismo puede dar como resultado varias otras manifestaciones clínicas de la infección.

La siembra de tejidos blando producen celulitis; en los niños, ésta aparece a menudo en forma de edemas violáceos o a su lado en las mejillas y en la zona periorbital de la cara. La artritis séptica y la osteomielitis también pueden complicar la bacteriemia por *Hi*. Así mismo, se ha comunicado sepsis neonatal por *Hi*. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

Celulitis. El *Hi* causa celulitis en niños menores de 2 años y rara vez en adultos acianos. La región comprometida con mayor frecuencia es la

mejilla, aunque la celulitis puede ocurrir en áreas periorbitarias y en otras localizaciones, en especial las extremidades superiores. De manera clásica la celulitis de la mejilla por *Hi* tiene un comienzo agudo, se desarrolla con rapidez en el curso de pocas horas y se acompaña de dolor y edema.

En el periodo avanzado de la infección aparece un color púrpura azulado distintivo. Puesto que la celulitis debida a *Hi* habitualmente es una enfermedad bacteriémica, puede dar como resultado infección metastática. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

Conjuntivitis. Las especies de *Haemophilus* también producen una forma aguda y contagiosa de conjuntivitis, denominada "ojo rojo". Se produce brotes localizados de conjuntivitis aguda entre personas que comparten toallas, pañuelos y otros objetos que entran en contacto directo con la piel de la cara o los ojos.

El rosado difuso de la esclerótica y la presencia de un exudado seroso o purulento, son virtualmente diagnósticos de la conjuntivitis por *Haemophilus* y por *Haemophilus aegyptius*, la bacteria asociada con la conjuntivitis, está considerada una especie diferenciada dentro del género y fenotípicamente similar al biotipo III de *H. influenzae*. Sin embargo, los estudios de nucleótidos genómicos han demostrado más de 70% de homología de secuencias entre *H. aegyptius* y *H. influenzae*, lo que sugiere que los dos microorganismos pertenecen a la misma especie. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

1.8 DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO PARA *Haemophilus*

Los productos patológicos utilizados para el diagnóstico de *Hib* puede variar en dependencia del proceso de infección, no obstante en el caso de las infecciones invasivas, son muy útiles las muestra de sangre, LCR, líquido articular, líquido pleural y orina, entre otros.

1.8.1 Muestra

La muestra debe ser tomada con un hisopo estéril de mango flexible, en un medio de transporte Stuart, sin congelar, ni refrigerar, para ser trasladado dentro de las 2 horas al laboratorio de referencia para su procedimiento, esto se debe a que el microorganismo muera a temperatura ambiente, se debe incubar en un medio enriquecido de factores X y V (agar-chocolate) para su crecimiento, debido a que ocupa de estos nutrientes, ya que es un microorganismo fastidioso. (Romanin V; Chiavetta L; Salvay M; Chiolo M; Regueira M; Barrios A; Califano G; García S; Gentile A. **2007**)

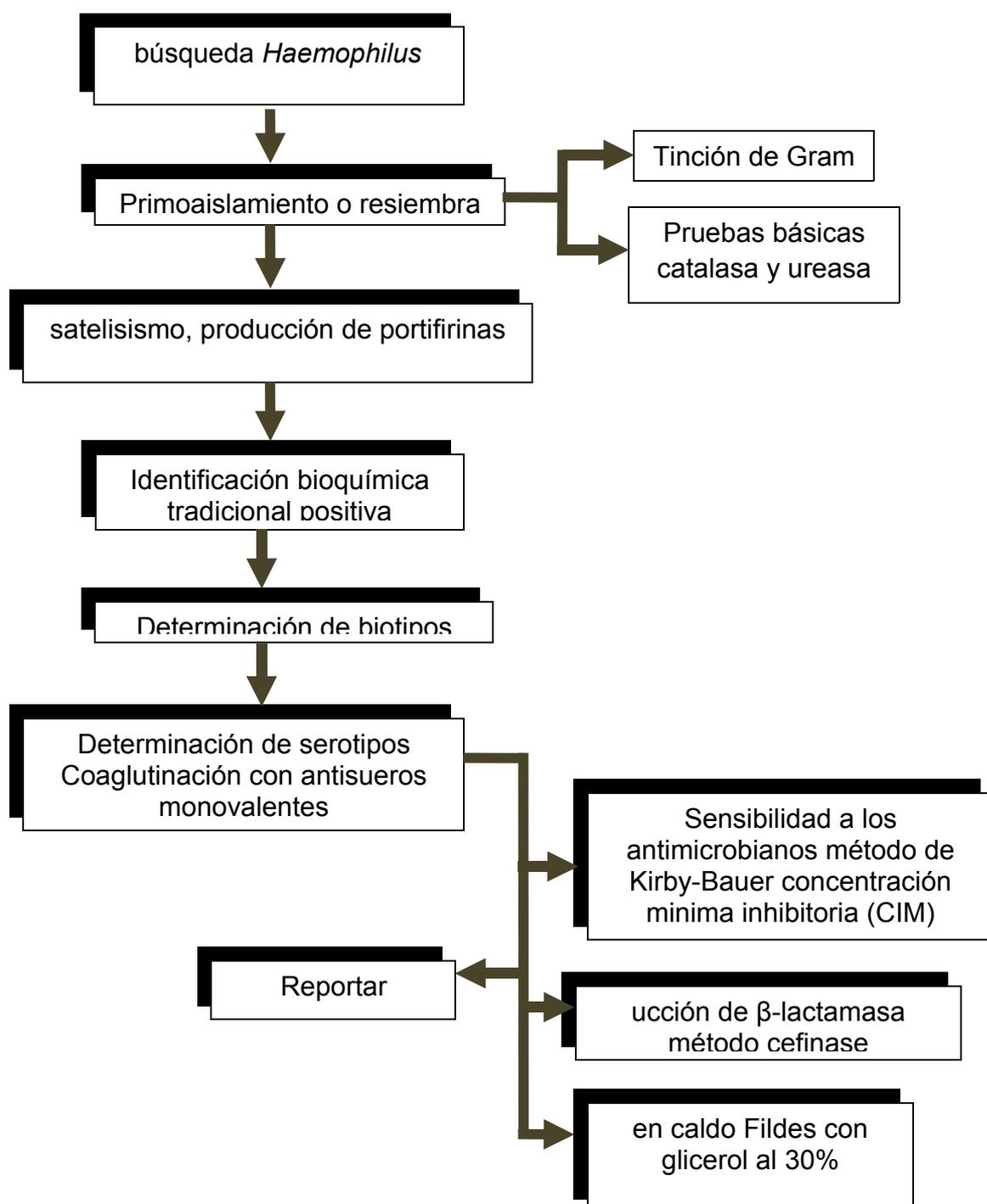
1.8.2 Examen directo

Los frotis a partir de muestras obtenidas de sitios normalmente estériles, son de gran utilidad cuando son teñidos con Gram, (ver figura 3) y permiten observar las características morfológicas del microorganismo aunque no siempre es confirmatorio el diagnóstico, las muestras adecuadas para el examen directo incluyen las del líquido cefalorraquídeo, artrocentesis toracocentesis o materiales aspirados del oído medio y muestras de esputo. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

1.8.3 Cultivo

Como el *Hi* es un microorganismo exigente y muere rápidamente en los materiales clínicos a la temperatura del ambiente, las muestras deben ser sembradas de inmediato en un agar-chocolate con bacitracina u otros medios enriquecidos que contengan los factores X y V. Las colonias son grises, circulares con un tamaño de 0.2 a 0.3 por 0.5 a 0.8 μm de diámetro en las primeras 24 horas de desarrollo, se desarrolla a una temperatura de 37°C con un pH de 7.8 y una atmósfera del 5 al 10% de CO₂, observando su morfología de cocobacilos. La adición de bacitracina al medio de cultivo crea condiciones selectivas para el desarrollo *Hi*. (Wolfgang K; Willett H; Amos B. **1994**)

FIGURA 3. Algoritmo para Aislamiento, Identificación y Serotipificación de *Haemophilus influenzae*



FUENTE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos 2004

CAPITULO II

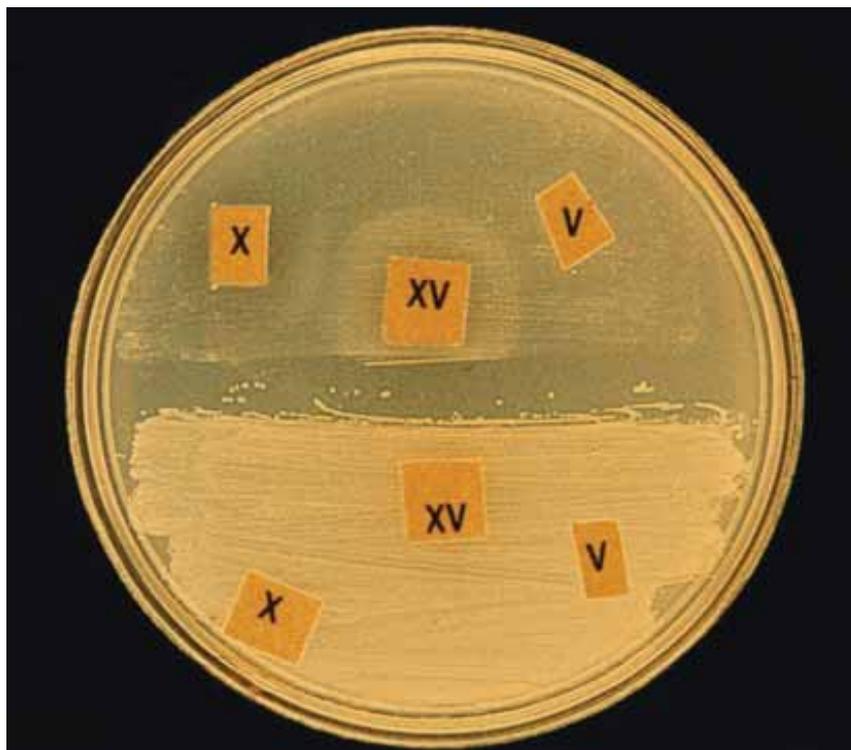
2.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA *Haemophilus influenzae*

En su estudio taxonómico del género *Haemophilus*, Kilian introdujo el uso de pruebas bioquímicas para identificar y caracterizar hemófilos. A partir de los resultados de 3 pruebas producción del indol, actividad de ureasa y catalasa, así como los requerimientos nutricionales que requieren para su crecimiento. Kilian dividió las cepas de *Hi* en cuatro biotipos, estos eran independientes del serotipo del microorganismo; es decir, que organismos de diferentes serotipos o cepas no tipificables podían tener el mismo patrón de reacciones biotípicas. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

2.1.1 Requerimientos nutricionales de factores X y V

Hi es un microorganismo fastidioso que requiere medios de cultivo que contengan hemina (factor X) y dinucleótido de adeninnicotidamida (NAD y factor V) (ver figura 4) para crecer. El medio estándar es el agar chocolate que se prepara a menudo con sangre de caballo, que es una buena fuente de factores X y V. Es necesario calentar la sangre para hacer que ambos factores sean disponibles para el microorganismo. Las cepas de *Hi* se identifican con base a su requerimiento de los factores de crecimiento X y V.

FIGURA 4. Requerimientos nutricionales de factores X y V



FUENTE: Ajello G. y *et al.* 2003

Hi se puede diferenciar de la mayoría de las otras especies por sus requerimiento de ambos factores de crecimiento X y V. *H haemolyticus* es la única otra especie que requiere ambos factores X y V, pero esta especie se diferencia de la *Hi* por la producción de hemólisis en agar sangre de caballo o conejo. (Ajello G; Elliott J; Facklam R; Popovic T. **2003**)

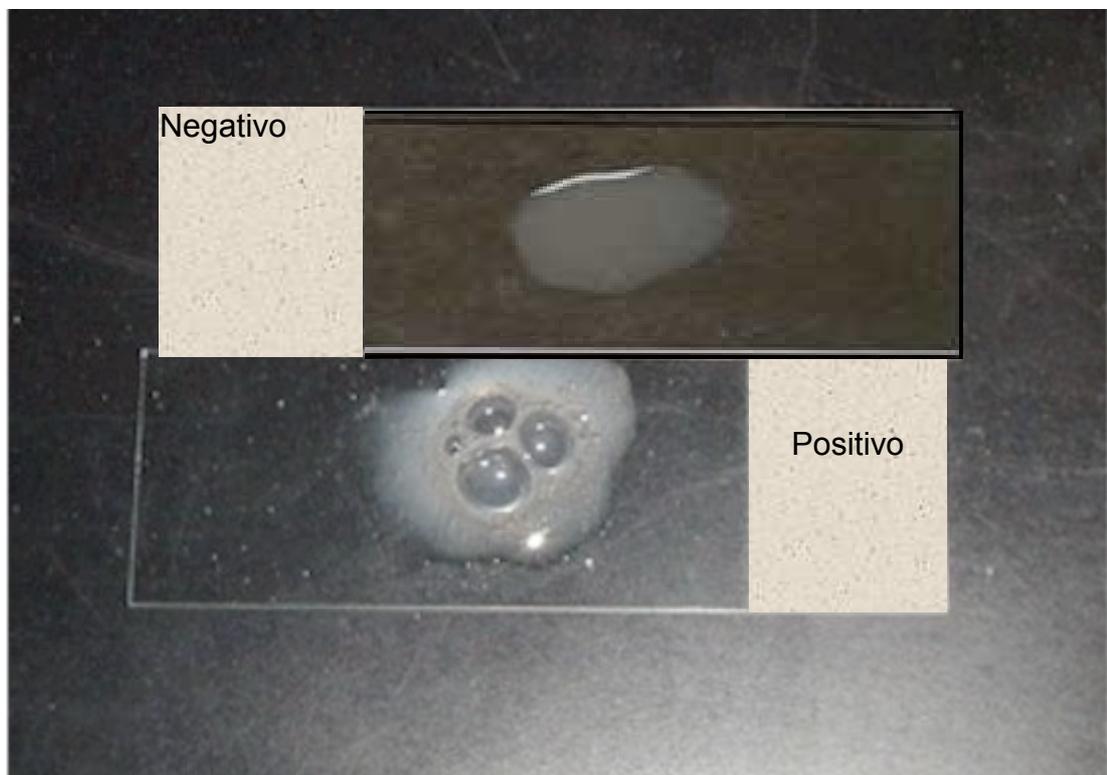
2.1.2 Catalasa.

La enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua. La liberación del oxígeno se puede observar a simple vista por la formación de burbujas (ver figura 5). (Mac Faddin J. **1990**)

2.1.3 Ureasa.

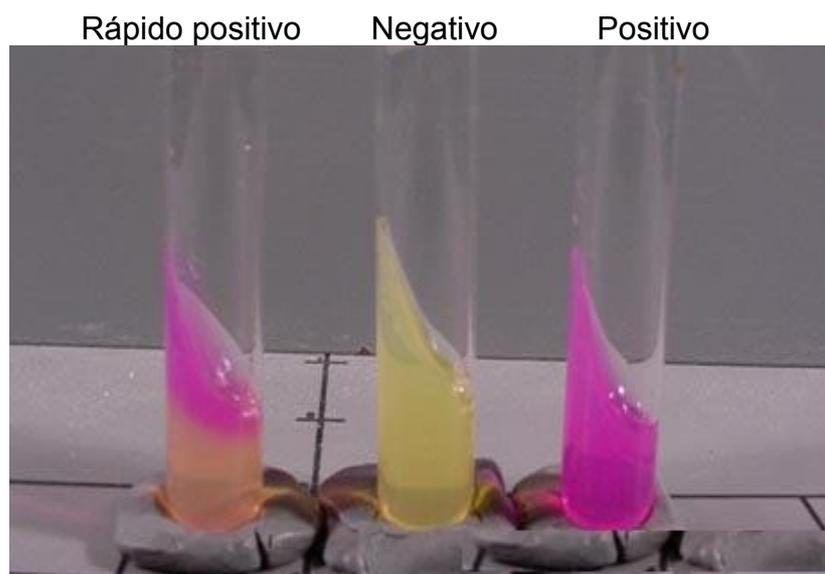
Mediante esta prueba se determina la capacidad del microorganismo de desdoblar la urea en CO₂ y amoníaco por acción de la enzima ureasa. Se visualiza el proceso debido a que la alcalinidad que se produce origina un cambio de color en el indicador que lleva incorporado el medio. La urea es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos, esta prueba se puede ser en tubo con medio sólido o sobre discos de papel impregnados. (ver figura 6) (Mac Faddin J. **1990**)

FIGURA 5. Prueba de Catalasa



FUENTE: Mac Faddin J. 1990

FIGURA 6. Prueba de la ureasa



FUENTE: Mac Faddin J. 1990

2.1.4 Indol

Esta prueba pone de manifiesto la presencia de la enzima Triptofanasa en nuestras bacterias. Esta enzima cataliza la reacción de desaminación, atacando la molécula triptófano solamente en su cadena lateral y dejando intacto el anillo aromático en la forma de indol, se utiliza el reactivo de Kovac, reflejando un cambio de color en la superficie, si no este será amarillo. (ver figura 7) (Mac Faddin J. **1990**)

FIGURA 7. Prueba de Indol

Positivo

Negativo



FUENTE: Mac Faddin J. 1990

2.2 PRUEBAS SEROLÓGICAS

Para el diagnóstico rápido de infecciones producidas por *Hib* se dispone de técnicas inmunológicas para la detección de antígeno capsular PRP tipo b como son: la prueba de Quellung (hinchamiento capsular), aglutinación en placa y la coaglutinación bacteriana. Estas pruebas nos permiten identificar a *Hi* tipificables o no tipificables. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

2.2.1 Prueba de Quellung (hinchamiento capsular)

Esta prueba es fácil para la identificación de *Hi* debido a que el microorganismo se tiñe de color azul debido al colorante azul de metileno pareciendo tener un “halo” tumefacto a su alrededor, esta aparente “tumefacción” se debe a la formación de un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del microorganismo, lo que causa un cambio del índice de refracción de la cápsula y una tumefacción aparente. También puede parecer que las células en el preparado se arraciman debido a uniones cruzadas celulares por los anticuerpos anticapsulares. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

2.2.2 Aglutinación en placa

Las bacterias y otras células en suspensión se aglutinan cuando se mezclan con anticuerpos dirigidos contra los componentes de la superficie. Sin embargo, es probable que en la actualidad la aglutinación en placa sea el sistema más sensible, versátil y fácilmente disponible para la detección de antígeno del Hib. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

2.2.3 Coagulación bacteriana

También existe una prueba confirmatoria por coagulación en cultivo (Phadebact *Haemophilus* Test, Karo Bio Diagnostics AB) para la identificación y serotipificación simultánea de *Hib* procedentes de medios de aislamientos primarios. Para aumentar la visibilidad de la aglutinación se utiliza la capacidad de la proteína A de la superficie de *Staphilococos aureus* para unirse al Fc de las moléculas de anticuerpo, se puede preparar un reactivo donde la cepa Cowen de *S. aureus* se mezclan con anticuerpos conocidos (es preferible el uso de antisueros monoclonados). (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

2.3 SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos. El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. (García J; Cantón R; García J; Gómez M; Martínez L; Rodríguez C; Vila J. **2000**)

La resistencia microbiana se ha reportado casi en todos los países y demuestra que los microorganismos han desarrollado, en su proceso evolutivo, formas cada vez más eficaces para evadir los puntos de acción del antibiótico. Los mecanismos de resistencia más estudiados son: alteración del sitio blanco del antibiótico, la inactivación enzimática y la alteración de la permeabilidad al antibiótico. (Crespo M. **2005**)

Básicamente hay tres metodologías para abordar el estudio de susceptibilidad *in vitro* como son: método de difusión con disco (Kirby-Bauer), dilución en caldo o agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la detección rápida de enzimas. (Trucco O. **2002**)

2.3.1 Difusión con disco (Kirby-Bauer)

El primer método utilizado en la sensibilidad antimicrobiana fue descrito por Kirby-Bauer en 1966, incorporando el agente antimicrobiano a discos de papel permitiendo así preparar un gran número de pruebas idénticas y almacenarlas para uso futuro.

Este método de difusión en agar, es cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedios o resistentes, y está diseñado específicamente para bacterias de crecimiento rápido y de algunos fastidiosos, el inóculo bacteriano se lleva a una concentración igual a la del estándar 0.5 de MacFarlane, permitiendo llegar a un punto crítico de crecimiento para el microorganismo. La placa es inoculada en agar chocolate para *Hi*, para después introducir los discos de antibiótico, (ver figura 8) los diámetros alrededor de cada disco son medidos y están recomendados y estandarizados por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (Herrera M. **1999**)

La selección de antimicrobianos en el estudio de susceptibilidad *in vitro* tiene como objetivo disponer de un adecuado apoyo en la elección de las terapias antimicrobianas. (González P. **2002**)

Una de las ventajas es que es un método sencillo, barato y fácil control y estandarización, así como la realización de algunas modificaciones en cuanto a los requerimientos nutricionales para poder llevar a cabo el antibiograma para organismos exigente o muy exigente, en cambio las desventajas que brinda información cualitativa. (Taroco R; Seija V; Vignoli R. **2008**, Herrera M. **1999**)

FIGURA 8. Difusión con disco



FUENTE: Ajello G. *et al* 2003

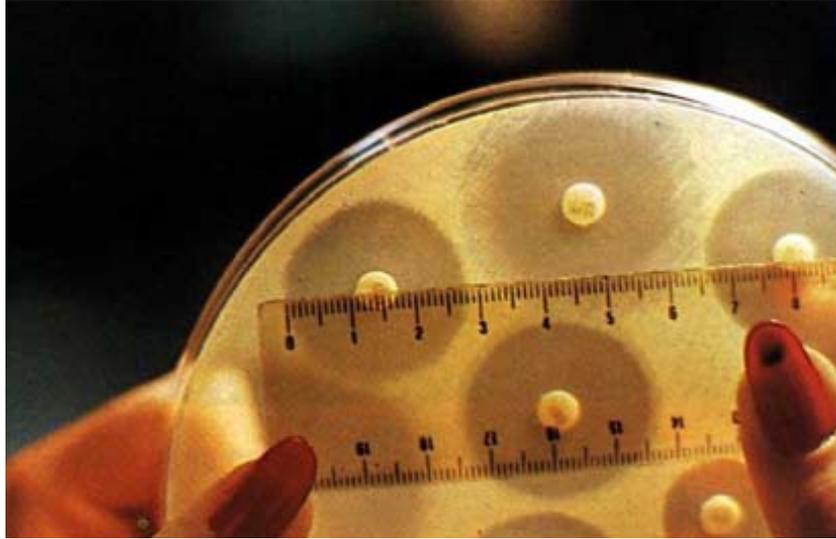
2.3.1.1 Antibiograma

El antibiograma es el estudio *in vitro* del comportamiento de los antimicrobianos frente a los diferentes microorganismos, teniendo como objetivo medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección. La sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico. (Sánchez J, Feris J. **1998**)

La función de esta técnica consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos, que al contacto con la superficie húmeda del agar, el disco difunde el antibiótico por todo el agar formándose un halo de inhibición de crecimiento bacteriano, que son medidos y estandarizados por el NCCLS (ver figura 9). (Taroco R, Seija V, Vignoli R. **2008**)

Para la selección de antimicrobianos para el estudio de la susceptibilidad *in vitro* debemos reconocer las características estructurales y genéticas de cada microorganismo determinando así patrones de resistencia, tanto natural como adquirida, así como también las características de los antimicrobianos que determinan su mecanismo de acción y espectro antibacteriano. También contempla propiedades farmacológicas tales como la vía de administración, características farmacocinéticas y de biodisponibilidad. (González P. **2002**)

Figura 9. Medición de halo de inhibición



FUENTE: Ajello G. et al 2003

2.3.1.2 Factores de error en el antibiograma

Varios son los factores de error que pueden explicar el por qué se presenta en ocasiones una falta de correlación entre los resultados del laboratorio, entre los factores tenemos el medio de cultivo, el pH, la humedad, efecto de timina o timidina, la atmosfera, la cantidad de cationes divalentes y los antibióticos caducos. (Taroco R; Seija V; Vignoli R. **2008**)

Para no tener ningún error en el antibiograma los medios se preparan de la mejor manera posible, asegurándose de que la concentración del agar sea la correcta exactamente a 4 mm, permitiendo así una mejor difusión de los antibióticos, los medios deben ser lo más frescos posibles, con no más de 7 días de preparados y siempre deben ser guardados en bolsas de plásticas selladas y a 4°C y asegurarse de que el polvo este en buenas condiciones para su uso. (Herrera M. **1999**)

Otro punto es que el pH debe ser ajustado a pH fisiológico de 7.2-7.4 esto es debido a que, si el pH es demasiado bajo ciertas drogas como aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos parecerán menos activas, mientras otras como las tetraciclinas parecerán tener mayor actividad. Si el pH es más alto se podrán esperar resultados opuestos (Ajello G; Elliott J; Facklam R; Popovic T. **2003**)

Sin embargo, la humedad también afecta debido a que el agar a utilizar no debe contener gotas de agua en la superficie, otros factores de error son los cationes divalentes de calcio y magnesio que tienen un dramático efecto sobre los aminoglucósidos y las tetraciclinas. Si el medio esta deficiente de cationes, habrá zonas de inhibición grandes alrededor del disco, siendo falsos sensibles. Otro factor y el más importante la atmosfera de incubación. Debemos incubar en aire ambiente o usar el frasco de la vela que proporciona un ambiente entre 3 y 5% de CO₂, necesario para el crecimiento. (Sánchez J; Ferias J. **1998**, Cona E. **2002**)

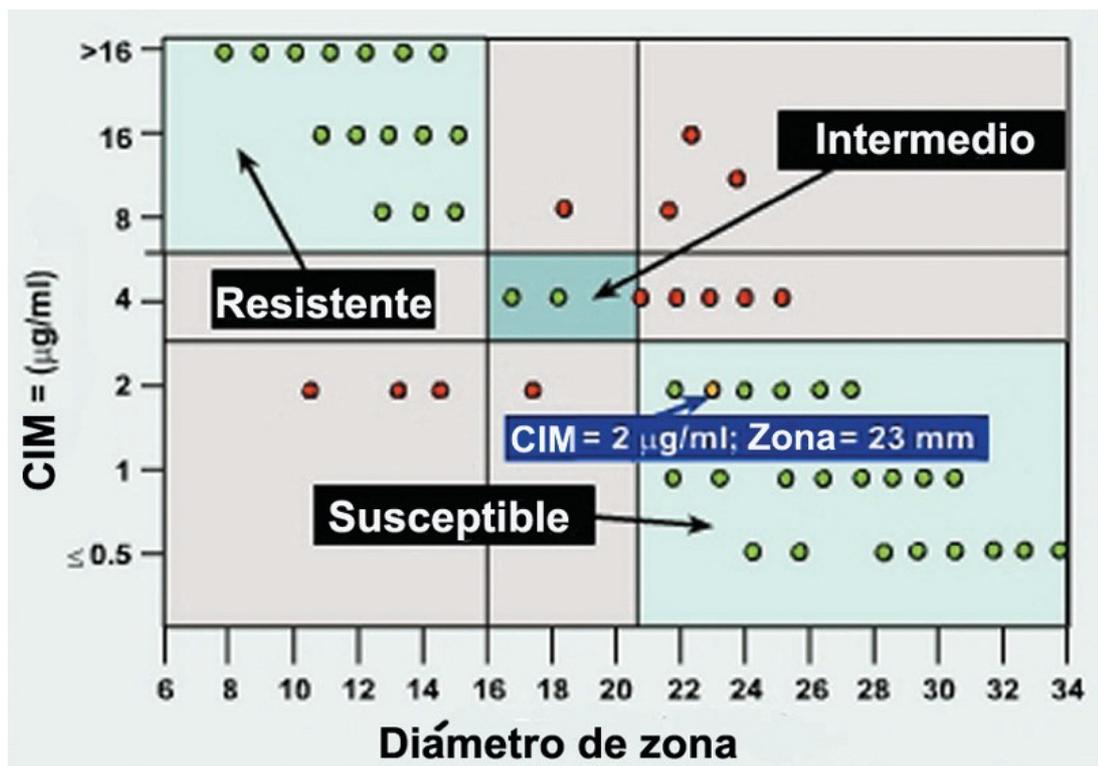
Por otra, los medios que contengan un exceso de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y triometoprim, produciendo alteraciones en las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano, en cuanto a los antibióticos deben estar en las mejores condiciones posibles, que se respete la cadena de frío, que no se humedezcan y que realmente contengan la concentración del antibiótico que dice tener. (Malbrán C. **2001**, Herrera M. **1999**)

2.3.1.3 Interpretación de los resultados

Los resultados de sensibilidad serán interpretados de acuerdo a las tablas de la NCCLS. Se define en tres categorías: resistentes, intermedio y sensible. El resultado sensible significa que hay una alta probabilidad de que el paciente responda al tratamiento con el antibiótico testado. El resultado resistente implica alta chance de falla terapéutica. La categoría intermedia puede tener varios significados. (Cona E. **2002**)

La lectura se realiza a través de la medición de los halos de inhibición que ya están estandarizados por la NCCLS (ver tabla 5). Estos diámetros deben de estar dentro de los establecidos en las tablas, de lo contrario podremos concluir que existe alguna variable que está cambiando las condiciones en que se debe realizado el procedimiento. (Taroco R; Seija V; Vignoli R. **2008**)

TABLA 5. Medidas de halo de inhibición recomendados por la NCCLS



FUENTE: Ortez J. 2000

2.3.2 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Este es el método de referencia recomendado por la NCCLS, reservado para casos especiales y estudios epidemiológicos de resistencia. Consiste en microdilución en caldo HTM, que constituye el *gold standard*, como alternativa en situaciones clínicas. (Trucco O. **2002**)

Es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación repentina. Las CIMs pueden ser determinadas mediante métodos de dilución en caldo o en agar y otro método más moderno es el método E-test usando tiras de un gradiente de concentración antibiótica. Se puede realizar en tubos, microplacas y en agar. (Andrews J. **2001**. Sánchez J; Feris J. **1998**)

Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo. A partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como microdilución en caldo. (Taroco R; Seija V; Vignoli R. **2008**)

2.3.2.1 Microdilución en caldo

El método de dilución es cuantificar la actividad *in vitro* de los antimicrobianos, basándose en la determinación del crecimiento del organismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo. Esta metodología es muy engorrosa por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para

su realización. (García J; Cantón R; García J; Gómez M; Martínez L; Rodríguez C; Vila J. **2000**)

Este método se prepara en las mismas condiciones de turbidez, pureza y crecimiento de todas las pruebas de sensibilidad. Procediendo a preparar las diferentes diluciones del antibiótico se parte de una solución madre que se debe diluir en las condiciones adecuadas para cada antibiótico. (Herrera M. **1999**)

Las microdiluciones esta estandarizadas por el Comité Nacional para los Estándares en el Laboratorio Clínico de Estados Unidos (NCCLS). (Rivas P. **2004**) Que consiste en preparar las diferentes soluciones del antibiótico, donde se parte de una solución madre que se debe diluir en las condiciones adecuadas para cada antibiótico. Esta solución madre es diferente para cada antibiótico y su escogencia depende del tipo de antibiótico y la cepa a probar (Pasterán F; Galas M. **2008**)

Para determinar la cantidad de polvo antimicrobiano (ATB) o solvente necesarios para preparar una solución estándar (SE) se puede utilizar alguna de las siguientes fórmulas: (Malbrán C. **2001**)

Fórmula 1

$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen de SE (ml)} \times \text{Concentración de SE (\mu\text{g/ml})}}{\text{Potencia de ATB (\mu\text{g/mg})}}$$

Fórmula 2

$$\text{Volumen de SE (ml)} = \frac{\text{Pesada de ATB (mg)} \times \text{Potencia de ATB (\mu\text{g/mg})}}{\text{Concentración de SE (\mu\text{g/ml})}}$$

Las pruebas de microdilución en caldo de CIM se realiza en una placa de poli-estireno que contienen aproximadamente 96 celdillas, (ver figura 10) el caldo Mueller-Hinton debe tener el contenido apropiado de cationes (Ca^{++}

FIGURA 10. Placa para la determinación de la CIM



FUENTE: www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos.htm

y Mg^{++}), así como un pH de 7.2-7.4 a temperatura ambiente (25°C), para poder obtener un resultado favorable. (Rankin I. **2000**)

2.3.2.2 Escala de Mc Farland

Se trata de una serie de patrones de turbidez previamente calibrados. Consiste en varios tubos de vidrio herméticamente cerrados que contienen {1% de Cl_2Ba + cantidades crecientes de SO_4H_2 al 1%}; por lo tanto, en cada tubo se origina un precipitado de SO_4Ba , origen de la turbidez. Para cada cepa bacteriana hay que establecer la equivalencia entre la turbidez de cada tubo y la masa o la concentración de bacterias (en céls/ml) que genera una turbidez similar. Se trata de una serie de patrones de turbidez previamente calibrados. (ver tabla 6) (Pasterán F; Galas M. **2008**)

Para verificar la densidad correcta del estándar se usa un espectrofotómetro, donde la absorbancia a 625 nm debe ser 0.08 a 0.10, para el estándar 0,5 de Mc Farland. Donde representa 10^8 UFC/ml para bacterias de rápido crecimiento. La estandarización de inóculo es esencial ya que el tamaño de la zona de inhibición es muy dependiente de la densidad del inóculo utilizado. (Rankin I. **2000**)

El inóculo estandarizado para el método de dilución en agar, se puede preparar permitiendo el crecimiento del microorganismo hasta la turbidez 0,5 de la escala de McFarland o bien resuspendiendo colonias directamente hasta alcanzar dicha turbidez. La preparación del inóculo inicial y la dilución final del mismo, puede variar para algunos microorganismos. El inóculo ya diluido debe usarse antes de 15 minutos tras su preparación. (Malbrán C. **2001**)

TABLA 6. Escala de Mc Farland

Estándar N°	Volumen (mL)		Equivalente en N° bacterias/mL (x108)
	BaCl ₂ (1.175%)	H ₂ SO ₄ (1%)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

FUENTE: Pasterán F; Galas M. 2008

Las placas de microdilución deben taparse o sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Es necesario controlar el inóculo así preparado, sembrando alícuotas diluidas en medio sólido que, una vez incubadas, permitan el recuento del inóculo realmente usado. Una forma sencilla de realizar este recuento es diluir 10 µL del tubo o del pocillo de control positivo en 10 mL de suero salino, sembrando posteriormente 100 µL de esta dilución. Para un inóculo de 5×10^5 CFU/mL deben crecer 50 colonias en la placa de medio sólido. (Rankin I. **2000**)

2.3.2.3 Interpretación de resultados

La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente (el 80% en el caso de las sulfamidas) el crecimiento del microorganismo estudiado. La interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos o pocillos usados como control positivo. Los resultados son sensibles, intermedios y resistentes. (García J; Cantón R; García J; Gómez M; Martínez L; Rodríguez C; Vila J. **2000**)

En el caso de las placas de microdilución dichos controles positivos deben presentar una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para observar el crecimiento de los pocillos, a veces resulta necesario limpiar la parte inferior de la placa de microtitulación, lo que puede realizarse con papel absorbente. La lectura es más sencilla utilizando un lector con espejo (también usado en las técnicas de diagnóstico serológico) en el que se refleja la parte inferior de la placa de microtitulación. (Rankin I. **2000**)

2.4 ANTIBIÓTICOS DE ELECCIÓN EN TRATAMIENTO CONTRA ***Haemophilus influenzae***

Los antibióticos recomendados por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), son ampicilina, clorafenicol, amoxicilina/ácido clavulánico, (ver tabla 7) debido a que presentan mayor sensibilidad a estos antibióticos, dando un buen resultado en el tratamiento de este microorganismo. (Trucco O. **2002**)

La resistencia encontrada en el estudio realizado por el laboratorio del IPK fue a la trimetoprim/sulfametoxazol: 41.77%, tetraciclina: 18.99%, ampicilina 17.72%, amoxicilina/ácido clavulánico: 7.59% , clorafenicol: 6.33%. (Fuentes K; Tamargo I; Toraño G. **2004**)

Respecto a los países en vías de desarrollo, se encontró resistencia a cloramfenicol y cotrimoxazol de 32,5%, 21,5% y 49,2% respectivamente. Un estudio realizado en Cuba durante los años 1993 a 1995, en el que se aislaron cepas de *Hi* de niños con meningitis, arrojó como resultado que el 97% de las cepas correspondían a *Hib*. Se observó una resistencia a ampicilina del 40%, a cloramfenicol del 43,3%, a sulfametoxazol del 36%, a trimetoprim del 37% y a tetraciclina del 31,3%, con una prevalencia de multirresistencia de 30%. (Trucco O. **2002**; Alarco R; Caverro V, Hernández H, Tapia E. **2008**)

TABLA 7. Selección de antimicrobianos recomendados por NCCLS

Antimicrobianos	Carga del disco (μg)	Ø Halo de inhibición (mm)		
		Resistente	Susceptibilidad intermedia	Susceptibilidad
Ampicilina	10	< 18	19-21	> 22
Amoxicilina	20/10.	< 19	-	> 20
Trimetoprim/sulfa	1.25/23.75	< 10	11-15.	> 16
Clorafenicol	30	< 25	26-28	> 29
Cefuroxima	30	< 16	17-19	> 20
Cefatoxima	30	-	-	> 26
Meropenem	10	-	-	> 20

FUENTE: Trucco O. 2002

CAPITULO III

3.1 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Históricamente, la sensibilidad se ha evaluado mediante diferentes sistemas, entre ellos: la concentración inhibitoria mínima (CIM) en caldo o agar, la difusión en disco (Kirby-Bauer) y la detección rápida de enzimas. Las más utilizadas son las pruebas de difusión en disco o kirby-Bauer y la concentración inhibitoria mínima.

Las pruebas utilizadas de rutina, como la microdilución en caldo y la difusión en disco, se usan básicamente para las bacterias que crecen bien después de las 12 a 18 horas de incubación.

El método de difusión de disco es el más simple y brinda información efectiva sobre los niveles de susceptibilidad al antibiótico, donde la bacteria solo crecerá hasta donde el antibiótico puede ejercer su efecto. Esta prueba es la más empleada en los laboratorios de rutina con pocos recursos o de bajos volúmenes y en hospitales de primer y segundo nivel. (Crespo M. **2005**)

Esta técnica es fácil de efectuar y de gran reproductibilidad, de bajo precio y no requiere equipo especial, los resultados son fácilmente interpretados por los clínicos, su desventaja es, que debe ser modificada para poderla empelar en organismos fastidiosos o de crecimiento lento (Herrera M. **1999**)

En cambio, el método de microdilución en caldo proporciona información cuantitativa (CIM) facilita el procedimiento de un mayor número de antibióticos y puede realizarse de forma automatizada y semiatomatizada

brindando la oportunidad de de hacer identificaciones más precisas. Sin embargo, esta prueba es costosa, no es accesible en todos los hospitales y además presenta dificultades en la detección de la resistencia en algunos gérmenes. (ver tabla 8) (Crespo M; **2005**)

3.1.1 Control de calidad en microbiología

El control de calidad en Microbiología Clínica envuelve el monitoreo de los medios de cultivos, reactivos, instrumentos, procedimientos y el personal, para asegurar una adecuada práctica en el aislamiento, identificación y caracterización de agentes etiológicos causantes de enfermedades, el conocimiento de la flora normal, la taxonomía bacteriana y la interpretación correcta de las prueba de susceptibilidad a los antibióticos. (Caballero E. **1999**)

El NCCLS recomienda el uso de cepas control de la American Type Culture Collection (ATCC) (ver tabla 9) para el Control de Calidad (CC), que han sido seleccionadas con base en su susceptibilidad o resistencia a un agente antimicrobiano en particular y su desempeño confiable. Algunas cepas son usadas solo para CC de prueba de difusión en disco, otras para Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), mientras que otras son usadas en ambas pruebas. (Rankin I. **2000**)

TABLA 8. Comparación de métodos de susceptibilidad para *Haemophilus*

	Carga del disco (μg)	Difusión de disco (mm)		
		resistente	Susceptibilidad intermedia	susceptibilidad
Ampicilina	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefuroxima	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Meropem	10	≤ 15	14-15	≥ 16
		CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
Ampicilina		≥ 32	-	≤ 8
Cefuroxima		≥ 64	-	≤ 8
Cefotaxima		≥ 32	-	≤ 8
Meropem		≥ 16	-	≤ 4

FUENTE: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 2008

**TABLA 9. Cepas ATCC recomendadas para el control de calidad por
NCCLS para *Haemophilus influenzae***

CEPAS	ANTIBIOTICO
ATCC 29212	Trimetropim/sulfametoxazol
ATCC 49247	Ampicilina
ATCC 49766	Cefuroxima, Meropem
ATCC 10211	Crecimiento adecuado

FUENTE: Rankin I. 2000; Harbeck R; Spiegel C. 2000; Cona E. 2002

El estudio de susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos de los microorganismos patógenos, puede realizarse a través de diversos métodos, el de uso más común por los laboratorios de microbiología es el de difusión en agar, estandarizado para microorganismos de crecimiento rápido y algunos fastidiosos. El método recomendado por el NCCLS se basa en el descrito originalmente por Bauer *et al*, que obtienen resultados cualitativos. (Cona E. **2002**)

Sin embargo, se usa cepas control para los métodos de susceptibilidad, con el fin de poder supervisar la exactitud y la fiabilidad de la metodología, debido también al gran número de variables que pueden afectar los resultados. (García J; Cantón R; García J; Gómez M; Martínez L; Rodríguez C; Vila J. **2000**)

Por lo tanto, las cepas control que se usan en el medio de difusión de disco son ATCC 29212: Esta cepa interfiere con la actividad de trimetoprima y de sulfametoxazol, así como control negativo de la detección de la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos. La ATCC 49766: Cepa resistente a ampicilina no productora de β -lactamasas, con un control de calidad de la prueba de difusión para *Haemophilus* utilizando HTM (utilizada para todas las drogas excepto cefalosporinas). También la ATCC: 10211 cepa nutricionalmente exigente. Indicada para el control de calidad del medio de cultivo HTM (Haemophilus Test Media). (García J; Cantón R; García J; Gómez M; Martínez L; Rodríguez C; Vila J. **2000**)

Por otra parte, para el método de dilución se utilizan las cepas control como la ATCC 25922: Calidad de la prueba de sensibilidad, ATCC 29212: Interfiere con la actividad de trimetoprima y de sulfametoxazol, control negativo de la detección de la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos, ATCC 35218: Concentración de inhibidores de β -lactamasas, probar solo frente a combinaciones como ampicilina/sulbactama, amoxicilina/ácido clavulánico, ticarcilina/ ácido clavulánico y la ATCC 27853: Concentración

de cationes: Aumento de resistencia a aminoglucósidos cuando aumenta la concentración de calcio, magnesio y pH, aumenta la resistencia a aminoglucósidos.(Harbeck R; Spiegel C. **2000**)

Las pruebas de sensibilidad, ésta debe encontrarse dentro de los límites máximos o mínimos impuestos por las regulaciones internacionales, el control de calidad debe ser efectuado al menos una vez por semana, cada vez que se cambia el lote del medio de cultivo o se prepara medio fresco y cada que se cambia un antibiótico o se inicie el uso de uno nuevo.

CONCLUSIONES

1. Se concluye que el método de difusión con disco (Kirby-Bauer), es mejor para la prueba de sensibilidad antimicrobiana, es rápido, fácil y sencillo, no se ocupa material caro, ni instrumentos costosos. La forma de interpretación de los resultados ante los antibióticos son: susceptibles, resistentes y susceptibles intermedio.
2. El método de concentración inhibitoria mínima (CIM) por medio de microdilución en caldo, es un poco complicado, ya que es más laborioso y difícil de hacer, porque se ocupa una gran cantidad de material así como soluciones y reactivos, por eso esta prueba no es muy solicitada en los laboratorios ni en los hospitales.
3. Sin embargo, el método más solicitado para la prueba de sensibilidad antimicrobiana, es el de difusión con disco, porque es más accesible para los laboratorios y hospitales, debido al efecto que tiene los discos de difundirse y así encontrar el antibiótico adecuado para las enfermedades ocasionadas por *Haemophilus influenzae*.
4. El control de calidad que tiene el método de difusión con disco es muy sencillo y fácil de mantener, debido al monitoreo de los reactivos, los medios de cultivo, así como otros factores externos. Mediante este control de calidad nos damos cuenta si los resultados obtenidos son confiables.
5. Este método también cuenta con cepas de control de calidad, que son seleccionadas con base a su susceptibilidad o resistencia a los antimicrobianos y su desempeño confiable para administrar el adecuado tratamiento a dichas enfermedades.

RECOMENDACIONES

1. El método recomendado para la sensibilidad antimicrobiana es el de difusión de disco, ya que nos facilita la rápida interpretación de los resultados.
2. Se recomienda este método como uso de rutina en los laboratorios de microbiología y en los hospitales, debido a que no es muy laborioso y tiene un bajo costo.
3. También, se recomienda por su buen control de calidad, debido a que la elaboración de las placas y la siembra de los microorganismos están debidamente controlados para un buen resultado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alarco R, Cavero V, Hernández H, Tapia E. **2008**. Sensibilidad antibiótica de cepas de *Haemophilus spp* aisladas en pacientes pediátricos en un hospital general entre los años 2003-2006. Rev. Méd. Hered. 19(2):61.
2. Alvis N, De la Hoz F, Vivas D. **2007**. Relación costo-efectividad de la vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b en niños menores de 2 años de edad en Colombia. Rev. Soc. Bol. Péd. 46(2):95-104.
3. Ajello G, Elliott J, Facklam R, Popovic T. **2003**. Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo. Centro para el control y la prevención de enfermedades. Atlanta, Georgia. EUA 7-31.
4. Andrews J. **2001**. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48(1):5-16.
5. Brooks G, Butel J, Morse S. **2005**. Microbiología Médica. Editorial Manual Moderno. México. 18ª Edición. 786 pp .
6. Caballero E. **1999**. Manual de control de calidad en Microbiología clínica en México. 100 pp.
7. Campos J. **1998**. Género *Haemophilus influenzae*: Interés clínico y epidemiológico. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majahonda, Madrid. Rev. Bacter. 1-4.
8. Cona E. **2002**. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. Rev. Chil. Infect. 19(2):77-81.
9. Crespo M. **2005**. La resistencia bacteriana. Grupo de Microbiología Medica y Enfermedades Infecciosas. Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia. Vol 9(1):31-42.
10. Cruces R, Donoso F, Camacho A. **2006**. Circular de vigilancia epidemiológica de enfermedades invasivas por *Haemophilus influenzae* tipo b (*Hib*). Santiago de Chile. Subsecretaría de Salud Pública. División de planificación Sanitaria. 1-5.

11. Davis B, Eisen H, Dulbecco R, Ginsberg H. **1978**. Tratado de Microbiología. Editorial Salvat Editores. Barcelona España. Segunda Edición. 1559 pp.
12. Fuentes K, Tamargo I, Toroño G. **2004**. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Haemophilus influenzae* no tipables aisladas en niños sanos. Rev. Cubana. Méd. Trop. 56(2):139-4.
13. Freitas A, Merchán-Hamann E. **2006**. Impacto de la vacuna conjugada en la incidencia de meningitis por *Haemophilus influenzae* en el Distrito Federal de Brasil: resultados de 3 años de seguimiento. Rev. Panam. Salud pública. 19(1):33-37.
14. García C, Lozano P, Rivera J, Rocha R, Giono S. **2008**. Identificación y tipificación de *Haemophilus influenzae* mediante PCR múltiple. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla México. 436-450 pp.
15. García J, Cantón R, García J, Gómez M, Martínez L, Rodríguez C, Vila J. **2000**. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimiento en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas 1-56.
16. Gatti B, Ramírez G, Etcheverría M, Vescina C, Varea A, González S. **2004**. Aislamiento de distintos serotipos de *Haemophilus influenzae* en muestras profundas de pacientes pediátricos. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Rev. Argent. Microbiol. 36(1)1-6.

17. González D, Judais F, Routaboul V, Zaniolo C, Flynn L. **2007**. Enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* no tipificable. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Rev. Argent. Microbiol. 37(4):2.
18. González P. **2002**. Antibiograma por método de difusión: selección de antimicrobianos. Rev. Chil. Infect. 19(2):82-84.
19. Harbeck R, Spiegel C. **2000**. *Haemophilus*: Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Departaments of Laboratory Medicine

- and Microbiology. Universidad de Washington 183-189.
20. Herrera M. **1999**. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de Laboratorio. Costa Rica. Rev. Méd. Hosp. Nac. de niños 34(1):1-11.
 21. Koneman E, Allen S, Janda W, Schrecknberger P, Winn W. **1999**. Diagnostico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Quinta Edición. 1432 pp.
 22. Llop A. **2006**. *Haemophilus influenzae*. Susceptibilidad a los antimicrobianos y comportamiento frente a la vacuna en Cuba, la Habana. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" 10-115.
 23. Mac Faddin J. **1990**. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial panamericana, México. 301 pp.
 24. Morales S. **2003**. Vigilancia Epidemiológica centinela de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en menores de 5 años en el Perú. Rev. Méd. Exp. Salud Pública. 20(3):1-6.
 25. Malbran C. **2001**. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Buenos Aires, Argentina. Subsecretaria de Investigación y Tecnología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. 3-69 pp.
 26. Oristela C. **2008**. Pan American Health Organization Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 28(1):1-188.
 27. Ortez J. **2000**. Guía para usar el documento NCCLS. Departaments of Laboratory Medicine and Microbiology. Universidad de Washington. 25-38 pp.
 28. Pasteran F, Galas M. **2008**. Manual de procedimientos, sensibilidad a los antimicrobianos en *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*. Organización Mundial de la Salud. Centro Regional de Referencia Who-global Salm Surv para América del Sur. 1-44 pp.
 29. Rankin I. **2000**. Aseguramiento de Calidad/Control de Calidad (AC/CC). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana; Departaments of Laboratory Medicine and Microbiology Universidad de Washington 65-91 pp.

30. Rivas P. **2004**. Prueba de sensibilidad antimicótica en aislamiento clínico de *Cándida spp.* de pacientes con cáncer. Bogotá, Colombia. Rev. Colombiana de Cancerología 8(1):22-28.
31. Romanin V, Chiavetta L, Salvay M, Chiolo M, Regueira M, Barrios A, Califano G, García S, Gentile A. **2007**. Vacuna anti-*Haemophilus influenzae* tipo b (*Hib*) en el Calendario Nacional de Argentina: portación nasofaríngea de *Haemophilus influenzae* tipo b tras 8 años de su introducción. Buenos Aires. Arch. Argent. Pediatr. 105(6):1-12.
32. Ryan K, Ray C. **2004**. Microbiología Médica, una introducción a las enfermedades infecciosas. Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores México. Cuarta Edición. 1060 pp.
33. Sánchez J, Feris J. **1998**. Antibiograma: utilidad y limitaciones. Arch. Dom. Ped. 34(3):83-86.
34. Schaechter M, Medoft G, Eisentein B, Guerra H. **1994**. Microbiología. Mecanismo de las enfermedades infecciosas. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Segunda Edición. 1000 pp.
35. Tamargo I. **2005**. Caracterización de aislamiento de *Haemophilus influenzae* en Cuba. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Ciudad de la Habana. 8-133 pp.

36. Taroco R, Seija V, Vignoli R. **2008**. Métodos de estudio de la sensibilidad antimicrobiana. Colombia. Rev. Bacteriológica 663-670 pp.
37. Truco O. **2002**. Estudio de susceptibilidad *in vitro* en *Haemophilus influenzae*. Rev. Chil. Infect. 19(2):125-128.
38. Valenzuela R. **1999**. Infecciones Invasivas por *Haemophilus Influenzae* tipo b. Rev. de Honduras Pediátricas. 20(3):2.
39. Villaseñor A, Herrera E, Vázquez P, Arroyo J, Santos J. **1996**. Prevalencia de estado de portadores de *Haemophilus influenzae* en niños de la Ciudad Nezahualcóyoth, Estado de México, México. Salud Pública Méx. 38(2):87-93.
40. Walker S. **1998**. Microbiología. Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores. México. Primera Edición. 535 pp.
41. Wolfgang K, Willett H, Amos B. **1994**. Zinsser Microbiología. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Segunda Edición. 1615 pp.
42. www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/seminarioAntibioticos.htm.

Accesado 22/03/2009