

**HAEMOPHILUS INFLUENZAE.
DISTRIBUCION DE BIOTIPOS Y SEROTIPOS
EN RELACION A LA PROCEDENCIA Y SU SENSIBILIDAD
A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS.**

*Carmen Ordóñez de Marín **

RESUMEN

Con la finalidad de relacionar serotipos y biotipos de *H. influenzae* a las distintas fuentes de infección se analizan 444 aislamientos obtenidos en la Sección de Bacteriología Diagnóstica del Centro Regional de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, a partir de las siguientes muestras clínicas: L.C.R. (61), sangre (10), líquido pleural (39), líquido articular (3), absceso (4), tracto respiratorio superior (168), tracto respiratorio inferior (85), tracto genital (8), orina (8) y secreciones de oído (49), ojo (7) y herida (2). Para el serotipaje se utilizan las técnicas de coaglutinación y aglutinación en lámina y para el biotipaje los criterios de Kilian. De los 61 aislamientos procedentes de pacientes con meningitis 60 (98%) y 53 (87%) pertenecen al serotipo b y biotipo I respectivamente. En 10 aislamientos obtenidos de sangre 9 (90%) corresponden al serotipo b y 8 (80%) al biotipo I. De 39 aislamientos del líquido pleural 30 (77%) y 29 (74%) pertenecen al serotipo y biotipo mencionado. Igualmente este serotipo y biotipo predominan en aislamientos procedentes del líquido articular y absceso. En 49 aislamientos de oído 41 (84%) son no tipiables. A los biotipos I, II y V pertenecen 33%, 31% y 22% respectivamente. De 168 aislamientos procedentes del tracto respiratorio superior 155

* Profesor Titular de Pasantía de Bacteriología - Escuela de Bioanálisis - Facultad de Medicina.

(92%) son no tipiables y ellos se distribuyen entre los diferentes biotipos con predominio del biotipo II (38%). En 85 aislamientos obtenidos del tracto respiratorio inferior 72 (85%) son no tipiables. A los biotipos II y I corresponden 46% y 33% respectivamente. Los 8 aislamientos de tracto genital son no tipiables y se observa predominio del biotipo II (37%). De 7 aislamientos de procedencia ocular 6 (86%) son no tipiables y 4 (57%) pertenecen al biotipo II. De 8 aislamientos obtenidos de orina 7 (88%) son no tipiables. A los biotipos II y III corresponden 3 (38%) a cada uno. El 100% de los aislamientos son sensibles a 15 agentes antimicrobianos. El porcentaje acumulativo de inhibición del 100% de los aislamientos se obtiene a concentraciones de ampicilina 0.2 $\mu\text{gr/ml}$, cloramfenicol 6.4 $\mu\text{gr/ml}$, cefotaxima 0.025 $\mu\text{gr/ml}$ y cefoperazona 0.006 $\mu\text{gr/ml}$. La implicación práctica que se deduce de estos resultados es que el biotipaje y serotipaje de los aislamientos de *H. influenzae* desde las distintas fuentes constituyen marcadores epidemiológicos importantes y que en nuestro medio la ampicilina y el cloramfenicol continúan siendo los antibióticos de elección para el tratamiento de meningitis y otras infecciones ocasionadas por *H. influenzae* siendo las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima y cefoperazona, alternativas a utilizar especialmente de hacer su aparición cepas de *H. influenzae* ampicilina y/o cloramfenicol resistentes.

SUMMARY

In order to relate serotypes and biotypes of *H. influenzae* to different infections source, it were analyzed 444 isolations obtained from the Bacteriological Diagnosis Department of the Regional Center of Cateriological Refference of Maracaibo's University Hospital, from the following clinical samples: C.S.F. (61) blood (10) pleural fluid (39) joint fluid (3) abscess (4) upper respiratory tract (168) lower respiratory tract (85) genital tract (8) urine (8) and ear (49), eye (7) and wound (2) se-gregations. To serotype it is utilized coagglutination and slide agglutination technique and to biotype, the Kilian criterion. From the 61 isolations proceeding from patients with meningitis 60 (98%) and 53 (87%) belong to serotype b and biotype I respectively. In 10 isolations obtained from blood 9 (90%) belong to serotype b and 8 (80%) to the biotype I. From 39 isolations of the pleural fluid 30 (77%) and 29 (74%) belong to the mentioned serotype and biotype. Also these serotipe and biotype predominate at the isolations coming from joint fluid and cess. In 49 ear isolations 41 (84%) are nontypables. . To the biotype I, II and V belong 33%, 31% and 22% respectively. From 168 isolations proceeding from upper respiratory tract 155 (92%) are nontypables and they are distributed among different biotypes with biotype II (38%) predominance. In 85 obtained isolations from lower respiratory tract 72 (85%) are nontypables. To the biotypes II and I corres-

pond 46% and 33% respectively. The 8 genital tract isolations are nontypables and it is shown biotypes II (37%) predominance. From 7 ocular source isolations 6 (86%) are nontypables and 4 (57%) belong to biotype II. From 8 urine obtained isolations 7 (88%) are nontypables. To the biotypes II and III belong 3 (38%) to each one. The 100% of the isolations are sensitive to 15 antimicrobial agents. The cumulative percentage of inhibition from 100% of the isolations it is obtained to concentrations of ampicillin 0.2 $\mu\text{gr/ml}$, Chloramphenicol 6.4 $\mu\text{gr/ml}$, cefotaxime 0.025 $\mu\text{gr/ml}$ and cefoperazone 0.006 $\mu\text{gr/ml}$. The practical implication of this results is that the biotyping and serotyping of *H. influenzae* isolations from different source constitute important epidemiological markers and in our ambient the ampicillin and chloramphenicol are still the antibiotic of choice for the meningitis treatment and other infections originate by *H. influenzae* in which the cephalosporins of third generation, cefotaxime and cefoperazone, are the alternative to utilize specially at the moment of appearance of *H. influenzae* strains ampicillin and/or chloramphenicol resistant.

INTRODUCCION

Conocido es el poder de patogenicidad que tiene *H. influenzae* para el humano y especialmente su tendencia a producir meningitis aguda en niños cuya edad oscila entre los tres meses y cinco años^{11, 14, 47, 49, 75, 92, 98, 100, 128}, el serotipo b ocasiona en este grupo etario la inmensa mayoría de la infección meníngea por *H. influenzae*^{47, 50, 52, 75, 78, 92, 100, 128, 133}. En nuestro medio, las casuísticas etiológicas de las meningitis bacterianas reportadas también muestran que *H. influenzae* serotipo b constituye el agente etiológico que produce más frecuentemente este tipo de infección durante la niñez^{88, 99, 104, 106}.

H. influenzae serotipo b desempeña además un papel etiológico en otras infecciones pediátricas tales como septicemia, epiglotitis, pericarditis, osteomielitis, neumonía, empiema, celulitis, infecciones del tracto urinario y endocarditis, las cuales pueden ocurrir en forma individual o asociadas con la invasión meníngea^{6, 33, 39, 44, 54-56, 75, 83, 92, 111, 128}. En Venezuela la verdadera incidencia de este serotipo en los procesos patológicos anteriormente mencionados no se ha establecido, excepto en infección urinaria¹⁰⁵.

Los restantes serotipos de *H. influenzae* han sido considerados patógenos ocasionales que infrecuentemente pueden provocar enfermedades invasivas en el humano^{75, 128, 132}, habiéndose durante los últimos años reportado su aislamiento en síndromes clínicos que anteriormente eran exclusivos del serotipo b^{19, 24, 35, 38, 58, 80, 116, 130, 132}.

Estudios recientes señalan que cepas no serotipiables de *H. influenzae*, tenidas como miembros de la flora normal del tracto respiratorio superior y frecuentemente

asociadas con infecciones crónicas del tracto respiratorio inferior, principalmente del adulto^{75, 128, 132, 137}, pueden constituirse en agentes etiológicos de infecciones sistémicas (tanto en adultos como en niños^{15, 31, 42, 66, 89, 94, 119, 131, 132}).

Kilian^{74, 75}, basándose en la dificultad que existe para caracterizar por métodos serológicos un número importante de cepas de *H. influenzae*, ha propuesto el biotipaje, el cual es un sistema de clasificación que establece seis biotipos en base a propiedades bioquímicas y enzimáticas del microorganismo. Esto ha permitido conocer la relación de biotipos de *H. influenzae* a los cuadros patológicos que éste produce^{3, 18, 51, 53, 67, 75, 78, 96, 108}. El biotipo I es el principal productor de meningitis aguda, bacteremia y epiglotitis^{3, 4, 40, 67, 78, 96}. A los biotipos II y III pertenecen la mayoría de las cepas no tipiables de *H. influenzae* consideradas flora residente del tracto respiratorio superior^{67, 74, 75}. Los mismos biotipos se aíslan de casos de sinusitis, otitis media, infecciones del tracto respiratorio inferior y conjuntivitis crónica^{3, 34, 40, 51, 75, 77, 96}. Prieto y col. han reportado su predominio en cepas aisladas de niñas con infección urinaria^{104, 105} y además han corroborado en nuestro medio la relación existente entre biotipos y procesos infecciosos¹⁰⁴. Estos mismos biotipos y el biotipo IV predominan en las cepas de *H. influenzae* que colonizan el tracto genital^{1, 3}.

En relación a la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, *H. influenzae* no ha escapado al grave problema del desarrollo de resistencia y uno de los cambios más notables observados en este patógeno ha sido la aparición en otros países de cepas resistentes a ampicilina^{5, 25, 30, 72, 124, 127, 138}, uno de los agentes usados tradicionalmente y con excelentes resultados en el tratamiento de meningitis y otras infecciones ocasionadas por esta bacteria^{9, 62, 98, 109, 114, 136}. Existen en la literatura médica reportes demostrando que la resistencia de *H. influenzae* a la ampicilina se ha incrementado progresivamente durante la última década^{82, 95, 110, 113, 121, 122}, alcanzando en la actualidad cifras de 10 a 20%⁵⁹, habiendo sido observada más frecuentemente en *H. influenzae* serotipo b^{3, 5, 25, 30, 72, 90, 124, 127, 128} y en menor proporción en otros serotipos⁹⁰ y en cepas no tipiables^{34, 89, 90, 117}. Para cloramfenicol que también ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de infecciones por *H. influenzae*^{9, 98, 114, 136}, al igual que para ampicilina en la década del 70, se inician los reportes de aislamientos de cepas de *H. influenzae* serotipo b resistentes a este antibiótico^{9, 71, 79, 84} y más recientemente, resistencia simultánea para ampicilina y cloramfenicol ha sido descrita en el mismo serotipo^{22, 23, 73, 86, 118, 129}, en otros serotipos²³ y en cepas no serotipiables^{23, 65}. Las cepas de *H. influenzae* resistentes a estos antibióticos pertenecen en su mayoría a los biotipos I y II^{3, 23, 42, 51, 85, 90}. En Venezuela cepas de *H. influenzae* resistentes a ampicilina y/o cloramfenicol no han sido reportadas^{88, 102, 103, 107}.

En el presente trabajo se estudian los aislamientos de *H. influenzae* obtenidos durante los tres últimos años de diversas fuentes, incluyendo la meníngea, a fin de establecer correlación entre sus serotipos y biotipos con la fuente de aislamiento. Se establece además el estado actual de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, incluyendo cefotaxima y cefoperazona, cefalosporinas de tercera generación, que en la actualidad están siendo investigadas como alternativas en el tratamiento de meningitis y otras infecciones ocasionadas por *H. influenzae* 17, 28, 32, 37, 61, 63, 68, 70, 81, 115, como consecuencia de la aparición de cepas resistentes a ampicilina y/o cloramfenicol.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas.- Están representadas por 444 aislamientos de *Haemophilus influenzae* provenientes de diferentes especímenes clínicos de pacientes, principalmente niños quienes recibieron atención médica en el Hospital Universitario de Maracaibo durante el período enero 1982 - diciembre 1984.

Fuentes de aislamiento.- Los 444 aislamientos de *H. influenzae* fueron obtenidos en la Sección de Bacteriología Diagnóstica del Centro Regional de Referencia Bacteriológica, a partir de las siguientes muestras clínicas: Líquido Cefalorraquídeo (61), sangre (10), líquido pleural (39), tracto respiratorio superior (168), tracto respiratorio inferior (85), tracto genital (8), orina (8), líquido articular (3), absceso (4), y secreciones de oído (49), ojo (7) y herida (2).

Medios y técnicas de cultivo.- El método utilizado para procesar el Líquido Cefalorraquídeo (L.C.R.) es con algunas variantes el descrito por Prieto, G.¹⁰¹, la muestra recibida en el laboratorio en tubos de baquelita de 13x100 mm. se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos, decantándose el sobrenadante en tubos que contengan caldo soya tripticasa (C.S.T.) y caldo tioglicolato (C.T.), exceptuando 2 ó 3 gotas que se usan para resuspender el sedimento a partir del cual se siembran los siguientes medios de cultivo en placa de Petri: agar Mac Conkey (M.C.), agar sangre humana (A.S.H.), los cuales son incubados en aerobiosis, Gelosa Chocolate (G.C.), en 10% de CO₂, y agar sangre humana más hemina y menadione (A.S.H. + H.M.) en anaerobiosis. Los medios sembrados se incuban a 35-37° C durante 24-48 horas. Se inocula también un medio de Lowenstain-Jensen. Con el sedimento restante se practican extendidos para coloración de Gram, Ziehl-Neelsen y Auramina Rodamina.

En el procesamiento bacteriológico del hemocultivo, la técnica empleada es la siguiente: se extraen al paciente de 2 a 5 ml. de sangre en forma aséptica y se distribuyen a partes iguales en un frasco A que contiene 100 ml. de C.S.T. y en un frasco B con 100 ml de C.T., al cual se ha incorporado Liquoid (Sodium Polynethol

Sulfonate 5%) en una proporción de 0.003% y sucrosa en una proporción de 15%. Ambos frascos son llevados al laboratorio e incubados a 35-37°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se retiran 5 ml. de cada uno de los frascos y se colocan en dos tubos estériles con tapas de baquelita, previamente identificados, se centrifugan a 2.500 r.p.m. durante 20 minutos, se les descarta el sobrenadante y con los sedimentos se realizan frotis y siembra. El sedimento A se siembra en placas conteniendo los medios de M.C. y A.S.H. (aerobiosis), en G.C. (10% de CO₂) y en un tubo conteniendo C.S.T. El sedimento B se siembra en placas de A.S.H. + H.M. (anaerobiosis), G.C. (10% de CO₂) y en un tubo de C.T. Todos los medios sembrados se incuban a 35-37° C durante 24-48 horas.

Para el estudio bacteriológico de la orina se utiliza el método cuantitativo de recuento de colonias de acuerdo a la siguiente técnica: 0.1 ml. de la orina y de sus diluciones 10⁻² y 10⁻⁴ en solución salina fisiológica (S.S.F.) es colocado en tres placas de M.C. (orina pura, 10⁻² y 10⁻⁴), en dos placas de A.S.H. (orina pura y 10⁻²) y en una placa de G. C. (10⁻²), esta última incubada en atmósfera de 10% de CO₂. Todas las placas se incuban durante 24-48 horas a 35-37° C para proceder a realizar el conteo de colonias. Recuentos iguales o superiores a 10⁴ Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.) por ml es tenido como significativo de infección. Cuando hubo dificultad en establecer el recuento de colonias de *Haemophilus influenzae* en la placa de G.C. con dilución de 10⁻², orina pura y diluciones seriadas 10⁻² y 10⁻⁴ fueron realizadas en medio de G.C.

Para procesar las muestras de tracto genital se emplean los siguientes medios en placa de Petri: M.C. (aerobiosis), A.S.H. (aerobiosis), G.C. y Martin-Thayer (M.T.), los cuales se colocan en atmósfera de CO₂ al 10%. Todos los medios se incuban a 35-37° C durante 24-48 horas.

En el procesamiento bacteriológico de las muestras de tracto respiratorio superior se usan los siguientes medios en placas de Petri: M.C. (aerobiosis), agar sangre de carnero (aerobiosis), agar sangre de carnero conteniendo 30 µgr/ml de Kanamicina (anaerobiosis) y G.C. (10% de CO₂); se siembra además un tubo conteniendo medio de Loeffler. Todos los medios son incubados a 35-37° C durante 24-48 horas.

La metodología utilizada en el estudio bacteriológico de muestras de tracto respiratorio inferior es la que se describe: el esputo se inocula en placas de M.C. (aerobiosis), A.S.H. (aerobiosis) y G.C. (10% de CO₂). Los medios se incuban a 35-37° C durante 24-48 horas. En otros especímenes tales como secreciones traqueales, lavado bronquial y líquido pleural se incluyen además placas de A.S.H. + H. M. conteniendo 100 µgr/ml de Kanamicina (anaerobiosis) y un tubo con C.T. Esta metodología se aplica también a las muestras provenientes de oído, ojo, abscesos, heridas y en líquido articular.

Identificación bacteriológica.- Transcurridas 24-48 horas de incubación, el crecimiento en las placas de G.C. con morfología colonial compatible con el género

Haemophilus, acompañado por su ausencia o un crecimiento escaso en el medio de A.S.H. es sometido a la identificación preliminar mediante extendido coloreado por la técnica de Gram en búsqueda de morfología y afinidad tintorial, prueba de satelitismo y establecimiento de sus requerimientos nutricionales. Para realizar la prueba del satelitismo se utiliza caldo soya tripticasa suplementado con 1% de Hemoglobina y 1% de Isovitalax (C.S.T.S)¹³⁴, el cual es sembrado e incubado por 18-24 horas a 35-37° C. El crecimiento obtenido es diluido 1/100 en S.S.F. y utilizando un hisopo de algodón estéril se siembra en toda la superficie de una placa de A.S.-H.⁷⁵, sobre la cual trazando una línea recta en su parte central, se inocula una cepa de Staphylococcus aureus. Se le incuba a 35-37° C y se examina a las 18-24 horas por crecimiento y formación de colonias de Haemophilus cerca del trazo constituido por el Staphylococcus aureus.

En la determinación de requerimientos nutricionales se emplea el medio de agar Mueller Hinton³⁶, en placa, siendo el inóculo igual al descrito en la prueba anterior. Se siembra toda la superficie de la placa utilizando un hisopo de algodón estéril y luego se colocan las tiras conteniendo los factores X, V y XV. Se incuba a 35-37° C en atmósfera de 10% de CO₂, observándose a las 18-24 horas por crecimiento del microorganismo alrededor de la o las tiras que contengan el o los factores nutricionales requeridos por la cepa en estudio.

A fin de lograr la identificación bacteriológica definitiva de Haemophilus influenzae se investiga la utilización de carbohidratos, actividad hemolítica y presencia de catalasa.

Las reacciones de utilización de carbohidratos se realizan según Kilian, M.⁷⁵, usando soluciones al 1% de glucosa, sucrosa, lactosa, xilosa y ribosa en base de caldo rojo de fenol (DIFCO Laboratories, Detroit, Mich.) suplementadas con los factores X y V (10 mg/lt de cada uno). Los medios se siembran con un inóculo fuerte a partir del crecimiento bacteriano de 18-24 horas en el medio G.C., se incuban a 35-37° C y se procede a su lectura transcurridas 24 horas.

La investigación de la actividad hemolítica se realiza en placas conteniendo agar sangre de caballo o de conejo⁴⁶⁻⁷⁶, las placas se siembran como en la prueba anterior con un inóculo proveniente del medio G.C., se incuban a 35-37° C y son examinadas a las 24 horas.

En la investigación de catalasa se emplea la prueba en lámina⁹⁷, utilizando peróxido de hidrógeno al 3%.

El biotipaje de los aislamientos de H. influenzae se realiza siguiendo los criterios establecidos por Kilian, M. ^{74, 75}, en base a tres reacciones bioquímicas: decarboxilación de la ornitina, producción de indol y ureas, las cuales se practican como pruebas rápidas. En la prueba de ornitina decarboxilasa⁹³ se emplea el sustrato descrito por Moller (DIFCO Laboratories, Detroit, Mich.). La producción de urea es investigada en el siguiente sustrato: KH₂PO₄, 1 gr., K₂HPO₄ 1 gr., ClNa, 5 gr., y

10 mg de rojo de fenol en un litro de agua destilada (ajustar pH a 7.0 con NaOH). Autoclavar y añadir 10.4 ml de una solución acuosa de urea al 10% (peso/volumen) esterilizada por filtración⁷⁵. La producción de indol es detectada por el método de Kowacs²⁹, el medio empleado es caldo peptona. Los medios descritos anteriormente se reparten en pequeñas cantidades (0.5-1 ml de cada uno), los medios no necesitan estar suplementados con factores de crecimiento, se siembran con inóculo fuerte proveniente del crecimiento durante 18-24 horas del microorganismo en estudio en el medio G.C. La lectura se realiza después de 4 horas de incubación a 35-37° C. La prueba de la ornitina en algunos casos requiere 24 horas de incubación.

Identificación serológica.- Los aislamientos de *Haemophilus influenzae* fueron sometidos a identificación serológica mediante las pruebas de coagulación y aglutinación en lámina. En la primera se utiliza Phadebact *Haemophilus* Test (Farmacia Diagnostic, Piscataway, N.J.). El antígeno empleado consiste en una pequeña cantidad del crecimiento bacteriano de 12-18 horas en el medio de G.C., el cual es usado directamente. En la segunda se usan antisueros de la casa comercial DIFCO. Una suspensión bacteriana densa, en solución salina formalinizada al 0.5% realizada a partir de un cultivo de aproximadamente 12-18 horas en el medio de G.C. es utilizada como antígeno.

Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.- Se emplea el método modificado del disco único de alta potencia de Bauer y Kirby^{10, 12, 13, 45, 125, 126}. El medio usado es agar Mueller Hinton chocolateado, el cual es preparado agregándole a la base agar Mueller Hinton, 1% de hemoglobina y 1% de Isovitalex. El inóculo proviene de un C.S.T.-S., previamente inoculado e incubado durante 18-24 horas a 35-37°C y diluido en S.S.F. hasta alcanzar una turbidez igual al standard 0.5 de Mc Farland. La tabla 1 muestra la concentración de los discos usados y los diámetros de la zona de inhibición que permiten establecer criterios de sensibilidad o resistencia a los agentes antimicrobianos.

Concentración Inhibitoria Mínima (C.I.M.).- Para determinar los niveles de sensibilidad o resistencia en microgramos por mililitro se utiliza la técnica de dilución seriada en tubo, el inóculo usado es aproximadamente 10⁵ bacterias por ml. El medio empleado es caldo Mueller Hinton suplementado con 1% de hemoglobina y 1% de Isovitalex y la concentración inhibitoria mínima es determinada por ausencia de turbidez en el tubo^{16, 45, 125, 135}.

Investigación de β -Lactamasa.- En la detección de β -Lactamasa se utiliza el método acidométrico de Escamilla⁴³. Se prepara un sustrato mezclando 1 ml de Rojo de Fenol al 0.5% con 8.3 ml de agua destilada y se añade 1 ml de esta solución a un vial conteniendo 1.000.000 U.I. de Penicilina G, al cual se le agrega NaOH 1N hasta alcanzar un color violeta (pH aproximado: 8.5). A partir de un crecimiento de *H. influenzae* de 18-24 horas en el medio de G.C. se prepara una suspensión densa en 0.2 ml del sustrato anteriormente descrito. La lectura se efectúa en los cin-

co minutos subsiguientes a la inoculación. La producción de β -Lactamasa es determinada por cambio del indicador Rojo de Fenol.

TABLA 1. GUIA PARA INTERPRETAR EL TAMAÑO DE HALO DE INHIBICION.

Agente Antimicrobiano	Potencia Del disco	Zona de inhibición más cercana al disco en M.M.		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina	10 μ gr	19 o menos		20 o más
Carbencilina	100 μ gr	17 o menos	18 - 22	23 o más
Cefamandol	30 μ gr	14 o menos	15 - 17	18 o más
Cloramfenicol	30 μ gr	12 o menos	13 - 17	18 o más
Cefalosporinas (1)	30 μ gr	14 o menos	15 - 17	18 o más
Cefoxitina	30 μ gr	14 o menos	15 - 17	18 o más
Cefoperazona	75 μ gr	15 o menos	16 - 20	21 o más
Cefotaxima	30 μ gr	14 o menos	15 - 22	23 o más
Gentamicina	10 μ gr	12 o menos	13 - 14	15 o más
Kanamicina	30 μ gr	13 o menos	14 - 17	18 o más
Streptomocina	10 μ gr	11 o menos	12 - 14	15 o más
Sulfas	250 ó 300 μ gr	12 o menos	13 - 16	17 o más
Tetraciclinas (2)	30 μ gr	14 o menos	15 - 18	19 o más
Tobramicina	10 μ gr	11 o menos	12 - 13	14 o más
Trimethoprim - Sulfametoxazole	25 μ gr	10 o menos	11 - 15	16 o más

(1) Incluye: Cephalotina, Cephaloridina, Cephalezina, Cephacetrila, Cephapirina y Cefaclor.

(2) El disco de Tetraciclinas es usado para las pruebas de susceptibilidad de todas las Tetraciclinas, Clortetraciclina, Demeclociclina, Doxyciclina, Methacyclina, Oxytetracyclina, Rolltetracyclina y Minocyclina.

F. I.: Finegold, S., Martin, W. & Scott, E.- Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. The C.V. Mosby Co. 1982. Xisth Edition.

RESULTADOS

La tabla 2 permite apreciar la distribución de 444 aislamientos de H. influenzae en relación a la edad. La mayoría de ellos 298 (67.11%) se producen en niños que recibieron atención médica en el Departamento Pediátrico y se distribuyen en la siguiente forma: tracto respiratorio superior 103 (23.20%), L.C.R. 61 (13.75%), oído 49 (11.05%), líquido pleural 39 (8.78%), sangre 10 (2.25%), tracto respiratorio inferior 7 (1.57%), tracto genital 7 (1.57%), orina 7 (1.57%), ojo 6 (1.35%), absceso 4 (0.90%), líquido articular 3 (0.67%) y herida 2 (0.45%). Los 146 (32.89%) aislamientos restantes provienen de adultos, atendidos en otros servicios, de ellos 78 (17.58%) y 65 (14.65%) corresponden a tracto respiratorio inferior y superior respectivamente, el resto de los aislamientos pertenecen al tracto genital, orina y conjuntiva ocular, con un aislamiento para cada una de estas fuentes.

Los 444 aislamientos de H. influenzae muestran en placa de G.C. morfología colonial correspondiente a colonias grisáceas, semiopacas, lisas, planas, convexas, borde entero, observándose en ocasiones tendencia al crecimiento confluyente.

TABLA 2. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. 444 AISLAMIENTOS DISTRIBUCION POR PROCEDENCIA Y EDAD. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO 1982 - 1984.

	Niños		Adultos	
	Nº de Aislamientos	%	Nº de Aislamientos	%
Tracto respiratorio superior	103	23.20	65	14.65
L.C.R.	61	13.75		
Oído	49	11.05		
Líquido Pleural	39	8.78		
Sangre	10	2.25		
Tracto Respiratorio Inferior	7	1.57	78	17.58
Tracto Genital	7	1.57	1	0.22
Orina	7	1.57	1	0.22
Ojo	6	1.35	1	0.22
Abscesos	4	0.90		
Líquido Articular	3	0.67		
Herida	2	0.45		
TOTAL	298	67.11	146	32.89

La morfología microscópica en el 100% de los aislamientos muestra en extendido coloreado con Gram, efectuado a partir de colonias que crecen en el medio de G.C. presencia de bacilos Gram negativo, cortos o cocobacilos con marcado pleomorfismo.

La tabla 3 resume en los 444 aislamientos de H. influenzae los resultados de los estudios bacteriológicos que permitieran caracterizarlos como tales. Hay una uniformidad del 100% a la positividad o negatividad de los aislamientos en dichos estudios, excepto en la producción de indol que registra 83.72% de positividad, la úrea que es hidrolizada por el 88.28% de los aislamientos y la ornitina que es descarboxilada por el 51.79% de ellos.

La distribución de biotipos de los 444 aislamientos de H. influenzae puede apreciarse en la tabla 4. El biotipo más frecuentemente encontrado es el biotipo I con 175 aislamientos, lo cual representa el 39.43%, le siguen el biotipo II con 145 (32.65%) aislamientos y el III con 51 (11.50%). Biotipos aislados menos frecuentemente son el V, IV y VI con 35 (7.88%), 21 (4.72%) y 17 (3.82%) aislamientos respectivamente.

TABLA 3. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. 444 AISLAMIENTOS ESTUDIOS BACTERIOLOGICOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

Estudio Bacteriológico	Reacción	%
Requerimiento de factor V	+	100.
Requerimiento de factor X	+	100.
Satelitismo	+	100.
Hemólisis	-	100.
Catalasa	+	100.
Glucosa	+	100.
Sucrosa	-	100.
Lactosa	-	100.
Xilosa	+	100.
Ribosa	+	100.
Indol	+	(83.72)
Urea	+	(88.28)
Ornitina decarboxilasa	+	(51.79)

TABLA 4. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. 444 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR BIOTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

H. Influenzae Biotipo	Nº de Aislamientos	%
I	175	39.43
II	145	32.65
III	51	11.50
IV	21	4.72
V	35	7.88
VI	17	3.82
	444	100.

El resultado de la identificación serológica de los 444 aislamientos de H. influenzae se evidencia en la tabla 5. De ellos 298 (67.11%) son no serotipables. Los 146 (32.89%) aislamientos restantes resultan ser serotipables con la siguiente dis-

TABLA 5. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. 444 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR SEROTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

H. Influenzae Serotipos	N° de Aislamientos	%
a	8	1.80
b	129	29.07
d	1	0.22
e	2	0.45
f	6	1.35
nt*	298	67.11
	444	100.

* no tipiable

tribución de serotipos: serotipo b 129 (29.07%), serotipo a 8 (1.80%), serotipo f 6 (1.35%), serotipo e 2 (0.45%) y serotipo d 1 (0.22%) aislamiento.

Las tablas 6-14 nos permiten apreciar la relación de serotipos y biotipos de H. influenzae según la procedencia del espécimen clínico. En los aislamientos procedentes de L.C.R., sangre, líquido pleural, absceso y líquido articular podemos observar predominio del serotipo b y biotipo I.

De 61 aislamientos de H. influenzae provenientes de pacientes con meningitis 60 (98.36%) pertenecen al serotipo b y 1 (1.64%) al serotipo a. Al biotipo I corresponden 53 (86.89%) aislamientos y 8 (13.11%) al biotipo II. Esto puede apreciarse en la tabla 6.

TABLA 6. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. L.C.R. 61 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR BIOTIPOS Y SEROTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

Biotipo	N° de Aislamientos	%	Serotipo	
			a	b
I	53	86.89		53
II	8	13.11	1	7
			1 (1.64%)	60 (98.36%)

En la tabla 7 se observa que en 10 aislamientos logrados de sangre, 9 (90%) corresponden al serotipo b y 8 (80%) al biotipo I.

TABLA 7. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. SANGRE. 10 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR BIOTIPOS Y SEROTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

Biotipo	N° de Aislamientos	%	Serotipo b	No Tipiables
I	8	80.	8	
II	1	10.	1	
III	1	10.		1
			9 (90%)	1 (10%)

En 39 aislamientos obtenidos del líquido pleural 30 (76.93%) pertenecen al serotipo b, 3 (7.69%) al serotipo a, 1 (2.56%) al serotipo e y 5 se muestran no tipiables. Se puede observar además que al biotipo I pertenecen 29 (74.36%) y a los biotipos II, V y IV se les asignan 7 (17.95%), 2 (5.12%) y 1 (2.57%) aislamientos respectivamente. Esta distribución es mostrada en la tabla 8.

TABLA 8. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. LIQUIDO PLEURAL. 39 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR BIOTIPOS Y SEROTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

Biotipo	N° de Aislamientos	%	Serotipo			No Tipiable
			a	b	e	
I	29	74.36		28		1
II	7	17.95	3	2		2
IV	1	2.57			1	
V	2	5.12				2
			3 (7.69%)	30 (76.93%)	1 (2.56%)	5 (12.82%)

En 4 aislamientos procedentes de abscesos, 2 corresponden al serotipo b, 1 al serotipo a y 1 es no serotipiable. Al biotipo I pertenecen 2 aislamientos, 1 al II y otro al III.

Los 3 aislamientos de H. influenzae provenientes del líquido articular se ubican en el serotipo b y biotipo I.

En las tablas 9-14, que muestran la distribución de serotipos y biotipos de las fuentes restantes, se evidencia predominio de los aislamientos no serotipiables, lo cual se acompaña de una disminución notoria del serotipo b y biotipo I en los aislamientos.

En la tabla 9 puede observarse que en 49 aislamientos de H. influenzae logrados de oído, 41 (83.68%) son no tipiables y 8 (16.32%) pertenecen al serotipo b. En relación al biotipaje estos aislamientos se distribuyen de la manera siguiente: al biotipo I corresponden 16 (32.66%) aislamientos, al II 15 (30.62%), al V 11 (22.44%) y al III 7 (14.28%).

TABLA 9. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. OIDO. 49 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR BIOTIPOS Y SEROTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

Biotipo	Nº de Aislamientos	%	Serotipo b	No tipiable
I	16	32.66	8	8
II	15	30.62		15
III	7	14.28		7
V	11	22.44		11
			8 (16.32%)	41 (83.68%)

La tabla 10 nos permite apreciar que de 168 aislamientos de H. influenzae provenientes del tracto respiratorio superior 155 (92.25%) resultan ser no tipiables, 9 (5.52%) corresponden al serotipo b, 3 (1.78%) se ubican en serotipo f y 1 (0.59%) es asignado al serotipo e. Se muestra también la distribución en detalle de los aislamientos entre los seis biotipos existentes, observándose un marcado predominio del biotipo II con 63 (37.50%) aislamientos, le siguen los biotipos III y I con 31 (18.45%) y 30 (17.85%) respectivamente.

De 85 aislamientos de H. influenzae obtenidos del tracto respiratorio inferior, 72 (84.70%) son no tipiables y los 13 (15.30%) aislamientos restantes se reparten

entre los serotipos b (7.05%), a (3.54%), f (3.54%) y d (1.17%). Se observa predominio del biotipo II con 39 (45.88%) aislamientos. Le sigue en frecuencia el biotipo I con 28 (32.95%) perteneciendo a este biotipo la mayoría de los aislamientos serotipables. El resto de los aislamientos se distribuyen en los biotipos III (8.24%), IV (8.24%), V (3.52%) y VI (1.17%). Estos resultados se evidencian en la tabla 11.

TABLA 10. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR. 168 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR BIOTIPOS Y SEROTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

Biotipo	N° de Aislamientos	%	Serotipo			No Tipiable
			b	e	f	
I	30	17.85	7		2	21
II	63	37.50	2		1	60
III	31	18.45				31
IV	11	6.55		1		10
V	17	10.12				17
VI	16	9.53				16
			9	1	3	155
			(5.52%)	(0.59%)	(1.78%)	(92.25%)

TABLA 11. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR. 85 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR BIOTIPOS Y SEROTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

Biotipo	N° de Aislamientos	%	Serotipo				No Tipiable
			a	b	d	f	
I	28	32.95	1	5		3	19
II	39	45.88	1	1			37
III	7	8.24	1				6
IV	7	8.24			1		6
V	3	3.52					3
VI	1	1.17					1
			3	6	1	3	72
			(3.54%)	(7.05%)	(1.17%)	(3.54%)	(84.70%)

Los 8 aislamientos de H. influenzae procedentes de tracto genital son no serotipables y aparecen distribuidos entre los biotipos II (3), I (2), IV (2) y V (1). Esta relación es mostrada en la tabla 12.

TABLA 12. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. TRACTO GENITAL. 8 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR BIOTIPOS Y SEROTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

Biotipo	Nº de Aislamientos	%	No Tipiable
I	2	25.	2
II	3	37.50	3
IV	2	25.	2
V	1	12.50	1
			8 (100%)

En la tabla 13 se aprecia que de 8 aislamientos logrados de orina 7 (87.50%) son no serotipables y 1 (12.50%) corresponden al serotipo b. A cada uno de los biotipos II y III pertenecen 3 de estos aislamientos y al biotipo I pertenecen 2.

TABLA 13. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. ORINA. 8 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR BIOTIPOS Y SEROTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

Biotipo	Nº de Aislamientos	%	Serotipo b	No Tipiable
I	2	25.	1	1
II	3	37.50		3
III	3	37.50		3
			1 (12.50%)	7 (87.50%)

De 7 aislamientos de H. influenzae de procedencia ocular 6 (85.70%) son no serotipables y 1 (14.30%) es ubicado en el serotipo b. Los aislamientos se reparten en los siguientes biotipos: II (4), I (2) y V (1). Estos resultados pueden apreciarse en la tabla 14.

TABLA 14. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. OJO. 7 AISLAMIENTOS. DISTRIBUCION POR BIOTIPOS Y SEROTIPOS. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982-1984.

Biotipo	N° de Aislamientos	%	Serotipos b	No Tipiable
I	2	28.54	1	1
II	4	57.16		4
V	1	14.30		1
			1 (14.30%)	6 (85.70%)

Los 2 aislamientos de H. influenzae obtenidos a partir de herida, se muestran no serotipables y corresponde uno al biotipo II y otro al biotipo III.

Los estudios de susceptibilidad y resistencia a los agentes antimicrobianos practicados a los 444 aislamientos revelan que todos ellos se muestran uniformemente sensibles a: ampicilina, carbenicilina, cloramfenicol, cefalosporinas, cefamandol, cefoxitina, cefoperazona, cefotaxima, gentamicina, kanamicina, streptomina, sulfas, tetraciclinas, tobramicina y trimethoprim-sulfametoxazole.

En la tabla 15 se observa la C.I.M. en $\mu\text{gr/ml}$ para ampicilina y cloramfenicol de 118 aislamientos de H. influenzae obtenidos de L.C.R. (61), sangre (10), líquido pleural (39) y orina (8). Los porcentajes acumulativos de inhibición muestran que concentraciones de 0.2 $\mu\text{gr/ml}$ de ampicilina son inhibitorios para el 100% de los aislamientos y concentraciones de 0.1 $\mu\text{gr/ml}$ lo son para el 69.23% de ellos. En relación al cloramfenicol concentraciones de 6.4 $\mu\text{gr/ml}$ inhiben el 100% de los aislamientos y concentraciones de 3.2 $\mu\text{gr/ml}$ lo hacen para el 49.23% de ellos. Para estos agentes antimicrobianos la C.I.M. muestra una excelente correlación con los halos de inhibición logrados por el método de difusión del disco.

TABLA 15. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. 118 AISLAMIENTOS. NIVELES DE SENSIBILIDAD EN $\mu\text{GR/ML}$. HOSPITAL UNIVERSITARIO. MARACAIBO. 1982 - 1984.

Antibiótico	N° de Aislamientos	$\mu\text{gr/ml}$							
		0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	
Ampicilina	118	90	118						
%		69.23	100						
Cloramfenicol	118						64	118	
%							49.23	100	

La tabla 16 muestra en los 118 aislamientos de H. influenzae provenientes de las fuentes anteriormente mencionadas la C.I.M. en $\mu\text{gr/ml}$ para cefoperazona, cefotaxima, cefamandol y cefoxitina. Para cefoperazona una concentración de 0.006⁻

TABLA 16. HAEMOPHILUS INFLUENZAE. 118 AISLAMIENTOS. NIVELES DE SENSIBILIDAD EN μ GR/ML. HOSPITAL UNIVERSITARIO, MARACAIBO. 1982 - 1984.

Antibiótico	Nº de Aislamientos	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	μ gr/ml
Cefoperazona	88	88										
%		100										
Cefotaxima	118		67	118								
%			55.83	100								
Cefamandol	118								82	118		
%									68.33	100		
Cefoxitina	118									94	118	
%										78.33	100	

μ gr/ml logra la inhibición del 100% de los aislamientos. En relación a cefotaxima concentraciones de 0.025 μ gr/ml son necesarias para un porcentaje acumulativo de inhibición del 100% de los aislamientos. Para cefamandol y cefoxitina concentraciones de 1.6 μ gr/ml y 3.2 μ gr/ml respectivamente logran un porcentaje acumulativo de inhibición del 100% de los aislamientos. La C.I.M. para estas cuatro cefalosporinas muestra también una excelente relación con los resultados obtenidos por el método de difusión del disco.

Finalmente la investigación de β ta-Lactamasa practicada en 118 aislamientos de H. influenzae demuestra que ellos están desprovistos de esta enzima.

DISCUSION

En la distribución etaria y diversidad de procedencia de los 444 aislamientos de H. influenzae de este estudio, destaca el número de aislamientos logrados a partir del L.C.R. de niños, lo cual es representativo de la frecuencia con la cual este microorganismo constituye el agente etiológico de meningitis en nuestro medio en la niñez, especialmente en los primeros años de la misma.

Los resultados obtenidos en esta investigación en los parámetros utilizados para caracterizar los aislamientos de H. influenzae son coincidentes con los reportados por otros autores^{3, 34, 67, 78, 96, 108}, excepto en la positividad (100%) en la utilización de la xilosa, lo cual si bien concuerda con lo logrado por Kilian, M. y col⁷⁸, difiere del obtenido en otros estudios^{3, 34, 96} que señalan variabilidad en la utilización del mencionado carbohidrato.

Los resultados del biotipaje revelan que todos los aislamientos de H. influenzae estudiados se distribuyen entre los seis biotipos conocidos^{74, 75}.

El serotipaje permite establecer que el 29.07% de los aislamientos pertenecen al serotipo b, el 3.82% a otros serotipos y el 67.11% son no tipiables serológicamente.

A semejanza de lo que ha sido reportado por otros autores^{47, 50, 52, 75, 78, 90, 92, 100, 128, 133}, el 98.36% de los aislamientos de H. influenzae provenientes del L.C.R. corresponden al serotipo b. Al biotipo I corresponden el 86.89% de los aislamientos y al biotipo II el 13.11% de ellos. Ambos biotipos han sido reportados por Albritton, W. y col³ en Canadá y por Kilian, M. y col⁷⁸ en Noruega y Dinamarca predominando en aislamientos de H. influenzae a partir de pacientes con meningitis.

La mayoría de los aislamientos de H. influenzae procedentes de sangre (90%), líquido pleural (76.93%), absceso (50%) y líquido articular (100%) pertenecen también al serotipo b, lo cual es coincidente con lo reportado por otros autores^{3, 44, 46, 75, 90, 92, 96, 128}. Igualmente vuelve a observarse predominio del biotipo I y menor incidencia del biotipo II en los aislamientos logrados de estas fuentes. Resultados similares han sido obtenidos por Albritton, W., y col³ en Canadá y Oberhofer, T. y Back, A.⁹⁶ en Estados Unidos. Se coincide con Kilian, M. y col⁷⁸ y otros autores^{67, 108} al señalar que el significativo predominio del biotipo I en los aislamientos de H. influenzae de las fuentes anteriormente mencionadas, sugieren la posibilidad de la existencia de factores de virulencia adicionales asociados con este biotipo en particular. Eng. R. y col⁴² han mencionado que la utilidad epidemiológica del serotipaje implica considerar a cualquier aislamiento de H. influenzae perteneciente al biotipo I, como una cepa que independientemente de la presencia de cápsula, es capaz de causar un proceso patológico grave.

A similitud de lo reportado por otros autores^{1, 2, 40, 48, 67, 74, 77, 96}, puede apreciarse en estos resultados altos porcentajes de aislamientos de H. influenzae no tipiables serológicamente a partir de oído (83.68%), tracto respiratorio superior (92.25%), tracto respiratorio inferior (84.70%), tracto genital (100%), orina (87.50%), ojo (85.70%) y herida (100%), lo cual se acompaña de una disminución notable del serotipo b y biotipo I en los aislamientos. Claramente estos microorganismos son patógenos y pueden causar variedad de infecciones en adultos y en niños^{15, 31, 42, 66, 89, 94, 119, 131, 132}, no obstante, los factores de virulencia en H. influenzae no serotipiables no han sido completamente caracterizados y en la actualidad investigaciones encaminadas a dilucidar esta interrogante se realizan en varios países.

Los aislamientos de H. influenzae obtenidos de oído se distribuyen entre los biotipos I (32.66%), II (30.62%), V (22.44%) y III (14.28%), esta distribución concuerda con reportada por Kilian, M.⁽⁷⁴⁾, pero difiere de la casuística presentada por Long, S. y col⁸⁵, quienes reportan al biotipo I en el 67% de sus aislamientos y con las de Barmkamp, S. y col⁸ y de Maria, T. y col³⁴ quienes señalan predo-

minio de los biotipos II y III en aislamientos de *H. influenzae* a partir de esta fuente. Esta variabilidad en los biotipos predominantes de *H. influenzae* a partir de oído podría lograr su explicación en base a la apreciación de Granato y col⁵³, quienes indican que algunos biotipos son endémicos de ciertas áreas geográficas. Estudios posteriores serán necesarios a fin de ratificar esta observación.

De este estudio se desprende que el biotipo de *H. influenzae* más frecuentemente aislado en nuestro medio en especímenes de tracto respiratorio superior es el biotipo II (37.50%) hallazgo que concuerda con lo reportado por otros autores^{57, 67, 96}. El predominio del biotipo II en estos aislamientos, como lo señala Holmes, R. y col⁶⁷, no necesariamente representa que sea el biotipo más corrientemente aislado en procesos infecciosos del tracto respiratorio superior, sino que puede indicar que es el biotipo predominante en la flora residente del mencionado tracto.

En los aislamientos de *H. influenzae* provenientes de tracto respiratorio inferior, se evidencia predominio de los biotipos II (45.88%) y I (32.95%), resultados coincidentes con estudios realizados en Estados Unidos^{40, 96, 132} y Canadá³, que señalan porcentajes elevados de estos biotipos en muestras de esputo y aspiración traqueal. En este trabajo el predominio de aislamientos de *H. influenzae* no serotopiables (84.70%) en especímenes de tracto respiratorio inferior podría parcialmente reflejar la distribución de edades de aquellos pacientes de quienes son recibidas muestras para ser procesadas, ya que el 91.76% de ellas provienen de adultos y sólo 8.24% de niños.

Al igual que ha sido reportado por otros autores^{1, 2, 48}, el biotipo II también predomina (37.50%) en los aislamientos de *H. influenzae* procedentes del tracto genital. Comparten el segundo lugar los biotipos I y IV con 25% de los aislamientos cada uno, lo que difiere de estudios previos^{1, 2, 48}, que coinciden en señalar en este sitio al biotipo III.

Igualmente el 57.16% de los aislamientos de *H. influenzae* obtenidos de conjuntiva ocular corresponden al biotipo II. Al biotipo I 28.54% y al V 14.30%. Esta distribución de biotipos concuerda con reportes de otros autores^{3, 40, 77, 96} en relación al predominio del biotipo II, pero difiere en la ausencia del biotipo III en estos aislamientos.

En relación a la producción de infección urinaria por *H. influenzae*, estos resultados son concordantes con los reportados por Prieto, G. y col¹⁰⁵, en cuanto al predominio de los biotipos II (37.50%) y III (37.50%). Ambos biotipos han sido reportados por Albritton, W. y col^{1, 2} y Gagre - Kidan, T. y col⁴⁸ en el tracto genitourinario. El 87.50% de los aislamientos logrados a partir de orina se obtienen de niñas lo cual pudiera tener origen en la más frecuente colonización o infección del tracto genitourinario por *Haemophilus* en el sexo femenino^{1, 2, 29, 64}.

En este estudio, a consecuencia de que todos los aislamientos resultaron sensibles a los 15 agentes antimicrobianos investigados, no se logra establecer la relación

del desarrollo de resistencia a biotipos y serotipos. A diferencia de lo reportado por algunos autores, que señalan porcentajes de resistencia hasta de un 35% para ampicilina en algunas áreas^{82, 95, 110, 112, 122}, el 100% de los aislamientos de *H. influenzae* logrados en este estudio muestran niveles de sensibilidad a este antimicrobiano, al ser inhibidos por concentraciones de 0.1 $\mu\text{gr/ml}$ a 0.2 $\mu\text{gr/ml}$. Ello tiene importancia desde el punto de vista médico por cuanto es el agente de elección para el tratamiento de meningitis y otras infecciones causadas por este microorganismo^{9, 62, 98, 109, 114, 136}. Para cloramfenicol que también ha sido utilizado con éxito para el tratamiento de la misma entidad clínica^{9, 98, 114, 136} y para el cual se han reportado cepas resistentes^{9, 26, 71, 79, 84, 87} y recientemente resistencia simultánea para ampicilina y cloramfenicol^{22, 23, 65, 73, 86, 118, 129}, en el presente trabajo los aislamientos de *H. influenzae* muestran niveles de susceptibilidad para este antibiótico del orden de los 3.2 $\mu\text{gr/ml}$ a 6.4 $\mu\text{gr/ml}$, lo cual está aún dentro de los niveles de sensibilidad en base a las concentraciones obtenidas en sangre y L.C.R. al ser usado en las dosis terapéuticas⁴⁵.

Como consecuencia de la emergencia de cepas de *H. influenzae* resistentes a la ampicilina y/o cloramfenicol, la búsqueda de nuevas alternativas en el tratamiento están siendo investigadas, en este sentido las cefalosporinas de tercera generación se muestran con excelente actividad *in vitro* contra este microorganismo^{7, 17, 20, 27, 28, 37, 41, 60, 69, 70, 103, 123, 139} y en la actualidad se utilizan con éxito en el tratamiento de los diversos tipos de infecciones que ocasiona esta bacteria, incluyendo la infección meníngea^{17, 28, 32, 37, 61, 63, 68, 70, 81, 115}. A semejanza de los resultados obtenidos por otros autores^{17, 20, 27, 28, 60, 69, 70, 139}, el 100% de los aislamientos logrados en este estudio muestran excelentes niveles de sensibilidad para cefoperazona al ser inhibidos por concentraciones de 0.006 $\mu\text{gr/ml}$. Comportamiento similar se registra para cefotaxima al obtener niveles de sensibilidad del orden de los 0.012 $\mu\text{gr/ml}$ a 0.025 $\mu\text{gr/ml}$.

Al igual que lo reportado por Burns y col²¹ los aislamientos de *H. influenzae* en este estudio son β -lactamasa negativa.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se deduce que en nuestro medio, la ampicilina continúa siendo el antibiótico de elección para el tratamiento de las meningitis y otras infecciones ocasionadas por *H. influenzae*.

La utilidad de cefotaxima y probablemente de cefoperazona en el tratamiento de infección meníngea y otros procesos infecciosos causados por *H. influenzae* es evidente. El uso de estas cefalosporinas en nuestro medio está soportado por los niveles de sensibilidad obtenidos y proveen alternativas a utilizar, especialmente de hacer su aparición en nuestro medio cepas resistentes a la ampicilina y/o cloramfenicol.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALBRITTON, W. BRUNTON, J., MEIER, M., BOWMAN, N. & SLANEY, L.- Haemophilus influenzae: comparison of respiratory tract isolates with genitourinary tract isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 16: 826, 1982.
2. ALBRITTON, W., HAMMOND, G. & RONALD, A.- Bacteremic Haemophilus influenzae genitourinary tract infections in adults. *Archives of Internal Medicina*, 138: 1819, 1978.
3. ALBRITTON, W., PENNER, S., SLANEY, L. & BRUNTON, J.- Biochemical characteristics of Haemophilus influenzae in relationship to source of isolation and antibiotic resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 7: 519, 1978.
4. ALPHEN, L., RIEMENS, T., POOLMAN, J., HOPMAN, C. & ZANEN, H.- Homogeneity of cell envelope protein subtypes, lipopolysaccharide serotypes, and biotypes among Haemophilus influenzae type b from patients with meningitis in The Netherlands. *The Journal of Infectious Diseases*, 148: 75, 1983.
5. American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Disease. Ampicillin-resistant strains of Haemophilus influenzae type b. *Pediatrics*, 55: 145, 1975.
6. ASMAR, B., SLOVIS, T., REED, J. & DAJANI, A.- Haemophilus influenzae type b pneumonia in 4 children. *Journal of Pediatrics*, 93: 389, 1978.
7. BACKER, C., THORNSBERRY, C. & JONES, R.- In vitro antimicrobial activity of cefoperazone, cefotaxime, moxalactam (LY 127935), azlocillin, mezlocillin, and other β -lactam antibiotics against Neisseria gonorrhoeae and Haemophilus influenzae, including β -lactamase-producing strains. *Antimicrobial Agentes and Chemotherapy*, 17: 757, 1980.
8. BARENKAMP, S., MUNSON, Jr. R., & GRANOFF, D.- Outer membrane protein and biotype analysis of pathogenic nontypable Haemophilus influenzae. *Infection and Immunity*, 36: 535, 1982.
9. BARRET, F., TABER, L., MORRIS, C., STEPHENSON, W., CLARK, D. & YOW, M., A 12 year review of the antibiotic management of Haemophilus influenzae meningitis: comparison of ampicillin and conventional therapy including chloramphenicol. *Journal of Pediatrics*, 81: 370, 1972.
10. BARRY, A. & THORNSBERRY, C.- Susceptibility testing: diffusion test procedures. In: Lennette, E., Ballows, A., Hausler, W., Truant, J., eds.: *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980. Third edition, p. 453.
11. BASTOS, C., TAUNAY, A., GALVAO, P., TIRIBA, A., SARAIRA, P., CASTRO, I. & LOMAR, A.- Meningitis consideracoes gerais sobre 15.067 casos internados no Hospital "Emilio Ribas" durante o quidenio 1958-1972. Ocorrencia, etiologia e letalidade. *Revista da Associaçao Medica Brasileira*, 19: 451, 1973.
12. BAUER, A.- Current status of antibiotic susceptibility testing with single high potency disk. *American Society Medical Technology*, 32: 97, 1968.
13. BAUER, A., KIRBY, W., SHERRIS, J. & TURK, M.- Antibiotic susceptibility by a standardised single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493, 1966.
14. BEATY, H.- The central nervous system: meningitis. In: Bennett, J. and Brachman, P., eds: *Hospital Infections*. Boston. Little, Brown and Company, 1979, 1st. ed, p. 409.
15. BERK, S., HOLTSCLAW, S., WIENER, S., & SMITH, J.- Nontypeable Haemophilus influenzae in the elderly. *Archives of Internal Medicine*, 142: 537, 1982.
16. BRINKLEY, A. & HUBER, T.- Method for evaluating broth culture media: application to Haemophilus. *Journal of Clinical Microbiology*, 8: 520, 1978.
17. Brown, W. & Fallon, R.- Cefotaxime for bacterial meningitis. *Lancet*, I: 1246, 1979.

18. BRUUN, B. & FRIIZ-MOLLER, A.- Ampicillin sensitivity and biotypes of recent Danish isolates of *Haemophilus influenzae*. *Acta Pathology Microbiology of Scandinavian*, 84: 201, 1976.
19. BUCK, L. & DOUGLAS, G.- Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type e. *Journal of Clinical Microbiology*, 4: 381, 1976.
20. BULGER, R. & WASHINGTON II, J.- Effect of inoculum size and β -lactamase production on in vitro activity of new cephalosporins against *Haemophilus* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17: 393, 1980.
21. BURNS, T., HINDS, D. & HAWKINS, E.- *Haemophilus* organisms: urinary tract pathogens in children? *Diagnostic Microbiology of Infectious Diseases*, 2: 251, 1984.
22. CAMPOS, J., GARCIA-TORNEL, S. & GAIRI, J.- Invasive infections caused by multiply resistant *Haemophilus influenzae* type b. *Journal of Pediatrics*, 104: 162, 1984.
23. CAMPOS, J., GARCIA-TORNEL, S. & SANFELIU, I.- Susceptibility studies of multiply resistant *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric patients and contacts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25: 706, 1984.
24. CAWThERN, T. MARRARO, R. & McCLESKEY, F.- Bacteremia associated with *Haemophilus influenzae* type e, biotype 4. *Journal of Clinical Microbiology*, 7: 1, 1978.
25. Center for Disease Control. Ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* meningitis. *Morbidity and Mortality weekly report*, 23: 77, 1974.
26. Center for Disease Control. Chloramphenicol resistant *Haemophilus influenzae*. Connecticut, Massachusetts. *Morbidity and Mortality weekly report*, 25: 267, 1976.
27. CHABBERT, I. & LUTZ, A.- HR 756, the syn isomer of a new methoxymino-cephalosporin with unusual antibacterial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14: 749, 1978.
28. CHERUBIN, CH., CORRADO, M., RAMACHANDRAN, S., GOMBERT, M., LANDESMAN, S., & HUMBERT, G.- Treatment of gram-negative bacillary meningitis: role of the new cephalosporin antibiotics. *Reviews of Infectious Diseases*, 4: S453, 1982.
29. CLARKE, P. & COWAN, S.- Biochemical methods for bacteriology. *Journal General of Microbiology*, 6: 187, 1952.
30. CLYMO, A. & HARPER, I.- Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* meningitis. *Lancet*, 1: 453, 1974.
31. CONTRONI, G., CHANG, M., GOLD, B. & RODRIGUEZ, W.- *Haemophilus influenzae* biotype III infections in children and report of three unusual cases. *American Journal of Clinical Pathology*, 76: 718, 1981.
32. DADERNAT, H. & DELMAS, C.- Comparative activity of cefotaxime and selected β -lactam antibiotics against *Haemophilus influenzae* and aerobic gram-negative rods. *Reviews of Infectious Diseases*, 4: S401, 1982.
33. DAJANI, S., ASMAR, I. & THIRUMOORTHY, C.- Systemic *Haemophilus influenzae* disease. *Journal of Pediatrics*, 94: 355, 1979.
34. DEMARIA, T., LIM, D., BARNISHAN, J., AYERS, L. BIRCK, H.- Biotypes of serologically nontypeable *Haemophilus* isolated from the middle ears and nasopharynxes of patients with otitis media with effusion. *Journal of Clinical Microbiology*, 20, 1102, 1984.
35. DENIS, F. & CHIRON, J.- Meningitis caused by *Haemophilus* type c. *Journal of Pediatrics*, 93: 1064, 1978.
36. Difco Laboratories, Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. *Difco Manual*. Detroit Michigan. 1984. Tenth editions, p. 287.
37. DRASAR, F., FARREL, W., HOWARD, A., HINCE, C., LEUNG, T. & WILLIAMS, J.- Activity of HR-756 against *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides fragilis* and other gram-negative rods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 4: 445, 1978.

38. DWORZACH, D., BLESSING, L., HODGES, G. & BARNES, W.- Haemophilus influenzae type of pneumoniae in adults. *The American Journal of the Medical Sciences*, 275: 87, 1978.
39. ECHEVERRIA, P., SMITH, E., INGRAM, D., SADE, R. & GARDNER, P.- Haemophilus influenzae b pericarditis in children. *Pediatrics*, 56: 808, 1975.
40. EDBERG, S., MELTON, E & SINGER, J.- Rapid Biochemical of Haemophilus species by using the Micro-ID. *Journal of Clinical Microbiology*, 11: 22, 1980.
41. EICKHOFF, T. & EHRET, J.- In vitro comparison of cefoxitin, cefamandole, cephalixin and cephalothin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9: 999, 1976.
42. ENG. R., CORRADO, M., CLERI, D. SIERRA, M.- Non-type b Haemophilus influenzae infections in adults with reference to biotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 11: 669, 1980.
43. ESCAMILLA, J.- Susceptibility of Haemophilus influenzae to ampicillin as determined by use of a modified, one minute beta-lactamase test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9: 196, 1976.
44. FEIGIN, R., SHACKELFORD, P. & KEENEY, R.- Haemophilus influenzae abscess associated with septicemia. *American Journal of Diseases of Children*, 121: 534, 1971.
45. FINEGOLD, S. & MARTIN, W.- Antimicrobial susceptibility tests and assays. In: Bailey and Scott's *Diagnostic Microbiology*, Saint Louis: The C.V. Mosby Company, 1982, Sixth edition, p. 531.
46. FINEGOLD, S. & MARTIN, W.- Gram-negative coccobacillary facultative bacteria. In: Bailey and Scott's *Diagnostic Microbiology*. Saint Louis: The C.V. Mosby Company, 1982, Sixth edition, p. 266.
47. FINEGOLD, S. & MARTIN, W.- Microorganisms encountered in cerebrospinal fluid. In: Bailey and Scott's *Diagnostic Microbiology*, Saint Louis: The C.V. Mosby Company, 1982, Sixth edition, p. 273.
48. GAGRE-KIDAN, T., LIPSKY, B. & FLORDE, J.- Haemophilus influenzae as a cause of urinary tract infections in men. *Archives of Internal Medicine*, 144: 1623, 1984.
49. GISELER, P., NELSON, K. & LEVIN, S.- Community-acquired purulent meningitis: a review of 1316 cases during the antibiotic era, 1954-1976. *Reviews of Infectious Diseases*, 2: 725, 1980.
50. GLOBE, M., SCHIFFER, M., ROBBINS, J., ET AL.- An outbreak of Haemophilus influenzae type b meningitis in an enclosed hospital population. *Journal of Pediatrics*, 88: 36, 1976.
51. GOLDBERG, R. & WASHINGTON II, J.- The taxonomy and antimicrobial susceptibility of Haemophilus species in clinical specimens. *American of Clinical Pathology*, 70: 899, 1978.
52. GRANOFF, D., & DAUM, R.- Spread of Haemophilus-influenzae type b: recent epidemiologic and therapeutic considerations. *Journal of Pediatrics*, 97: 854, 1980.
53. GRANATO, P., JUREK, E. & WEINER, L.- Biotypes of Haemophilus influenzae: relationship to clinical source of isolation, serotype and antibiotic susceptibility. *American Journal of Clinical Pathology*, 79: 73, 1983.
54. GRANOFF, D., & NANKERVIS, G.- Cellulitis due to Haemophilus influenzae type b. *American Journal of Diseases of Children*, 130: 1211, 1976.
55. GRANOFF, D. & ROSKES, S.- Urinary tract infection due to Haemophilus influenzae type b. *Journal of Pediatrics* 84: 414, 1974.
56. GRANOFF, D., SARGENT, E. & JOLIVETTE, D.- Haemophilus influenzae type b, Osteomyelitis. *American Journal of Diseases of Children*, 132: 488, 1978.

57. GRATTEN, M., LUPIWA, T., MONTGOMERY, J. & GEREKA, G.- Distribution and relationship to serotype of *Haemophilus influenzae* biotypes isolated from upper respiratory tracts of children and adults in Papua New Guinea. *Journal of Clinical Microbiology*, 19: 526, 1984.
58. GREENE, G.- Meningitis due to *Haemophilus influenzae* other than type b: case report and review. *Pediatrics*, 64: 1021, 1978.
59. GREENLEE, J.- Anatomic considerations in central nervous system infections. In: MANDELL, G., DOUGLAS, R., BENNETT, J., eds. *Principles and practice of infectious diseases*. A Wiley Medical Publications, John Wiley & Sons, New York, 1985, Second edition, p. 562.
60. GREENWOOD, D., PEARSON, N. & ELEY, A.- Comparative in vitro activities of cefotaxime and ceftizoxime (FK 749): new cephalosporins with exceptional potency. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17: 397, 1980.
61. HALL, W., OFFER, B. & GERDING, D.- Comparative activities of the oxa- β -lactam LY-127935, cefotaxime, cefoperazone, cefamandole and ticarcillin against multiple resistant gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 17: 273, 1980.
62. HALTALIN, K. & SMITH, J.- Reevaluation of ampicillin the rapy for *Haemophilus influenzae* meningitis. *American Journal of Diseases of Children*, 12: 328, 1971.
63. HAMILTON-MILLER, J., BRUMFITT, W. & REYNOLDS, A.- Cefotaxime (HR-756), a new cephalosporin with exceptional broad-spectrum activity in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 4: 437, 1978.
64. HAMMEISCHIAG, M., ALPERT, S., ROSNER, I., THURSTON, P., SEMINE, D., MC COMB, D. & MC CORMACK, W.- Microbiology of the vagina in children: normal and potentially pathogenic organisms. *Pediatrics*, 62:57, 1978.
65. HEYMANN, C., TURK, D. & ROTIMI, V.- Multiple antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae*. *Lancet*, I: 553, 1981.
66. HIRSCHL, B., AUCKENTHALER, R., BARENKAMP, S. & GRANOFF, D.- Recurrent meningitis in an adult due nontypable *Haemophilus influenzae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 149: 656, 1984.
67. HOLMES, R., DE FRANCO, L. & OTTO, M.- Novel method of biotyping *Haemophilus influenzae* - that uses API 20E. *Journal of Clinical Microbiology*, 15: 1150, 1982.
68. JONES, R. & THORNSBERRY, C.- Cefotaxime: a review of the in vitro antimicrobial properties and spectrum of activity. *Reviews of Infectious Diseases*, 4: S300, 1982.
69. JORGENSEN, J. & ALEXANDER, G.- Comparative activities of selected Beta-Lactam antibiotics against *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13: 342, 1978.
70. JORGENSEN, J., CRAWFORD, S. & ALEXANDER, G.- In vitro activities of moxalactam and cefotaxime against aerobic gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17: 937, 1980.
71. KATTAU, S.- Chloramphenicol-resistant *Haemophilus*. *Lancet*, I: 814, 1976.
72. KATZ, S.- Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Pediatrics*, 55: 5, 1975.
73. KENNY, J., ISBURG, C. & MICHAELS, R.- Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type b resistant to both ampicillin and choramphenicol. *Pediatrics*, 66: 14, 1980.
74. KILIAN, M.- A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of new species. *Journal General of Microbiology*, 93: 962, 1976.
75. KILIAN, M.- *Haemophilus*. In: LENNETTE, E., BALLEWS, A., HAUSLER, W. & TRUANT, J., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D. C., American Society for Microbiology, 1980, Third edition, p. 330.

76. KILIAN, M.- The haemolytic activity of *Haemophilus* species. *Acta Pathology of Microbiology of Scandinavian*, 84: 339, 1976.
77. KILIAN, M., MORDHORST, C., DAWSON, C. & LAUTROP, H.- The taxonomy of *Haemophilus* isolated from conjuntivae. *Acta Pathology of Microbiology of Scandinavian*, 84: 132, 1976.
78. KILIAN, M., SPØRENSEN, I. & FREDERIKSEN, W.- Biochemical characteristics of 130 recent isolates from *Haemophilus influenzae* meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 9: 409, 1979.
79. KINMONTH, A., STORRS, C. & MITCHELL, R.- Meningitis due to chloramphenicol-resistant *Haemophilus influenzae* type b. *British Medical Journal*, I: 694, 1978.
80. KITAGAWA, S., KAPLAN, L. & SEILHEIMER, D.- Lung abscess due to *Haemophilus influenzae* type c. *American Journal of Diseases of Children*, 133: 650, 1979.
81. KOBAYASHI, Y., MORIKAWA, Y. & HARUTA, T.- Clinical evaluation of Cefotaxime in the treatment of purulent meningitis in children. *The Japanese Journal of Antibiotics*, 34: 946, 1981.
82. LERMAN, S., BRUNKEN, J. & BOLLINGER, M.- Prevalence of ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* causing systemic infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18: 474, 1980.
83. LI, K., KIERNAN, S., WALD, E. & REILLY, J.- Isolated uvulitis due to *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatrics*, 74: 1054, 1984.
84. LONG, S. & PHILLIPS, S.- Chloramphenicol-resistant *Haemophilus influenzae*. *Journal of Pediatrics*, 90: 103, 1977.
85. LONG, S., TETER, M. & GILLIGAN, P.- Biotype of *Haemophilus influenzae* correlation with virulence and ampicillin-resistant. *Journal of Infectious Diseases*, 147: 800, 1983.
86. MAC MAHON, P., SILLS, J., HALL, E. & FITZGERALD, T.- *Haemophilus influenzae* type b resistant to both chloramphenicol and ampicillin in Britain. *British Medical Journal*, 284: 1229, 1982.
87. MANTEN, A., VAN KLINGERSEN, B. & DESSENS-KROON, M.- Chloramphenicol-resistance in *Haemophilus influenzae*. *Lancet*, 1: 702, 1976.
88. MARIN, C.- Infección meníngea por *Haemophilus influenzae*. Metodología para su aislamiento, caracterización y estudio de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. (Trabajo de ascenso). Facultad de Medicina. Universidad del Zulia, 1977.
89. MARRARO, R., MC CLESKEY, F. & MITCHEL, J.- Pneumonia due to *Haemophilus influenzae* (H. aegyptius) biotype 3. *Journal of Clinical Microbiology*, 6: 172, 1977.
90. MASON, E., KAPLAN, S., LAMBERTH, L., HINDS, D., KVERNLAND, S., LOISELLE, E. & FEIGIN, R.- Serotype and ampicillin susceptibility of *Haemophilus influenzae* causing infections in children: 3 years of experience. *Journal of Clinical Microbiology*, 15: 543, 1982.
91. MC CORMACK, W., EVRARD, J., LAUGHLIN, C., ROSNER, B., ALPERT, S., CROCKETT, V., MC COMB, D. & ZINNER, S.- Sexually transmitted conditions among women college students. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 139: 130, 1981.
92. MC GOWIM, J., KLEIN, J. & BRATTON, L.- Meningitis and bacteremia due to *Haemophilus influenzae* occurrence and mortality at Boston City Hospital in 12 selected years. *The Journal of Infectious Diseases*, 130: 119, 1974.
93. MØLLER, V.- Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta Pathology of Microbiology of Scandinavian*, 36: 158, 1955.
94. MUSER, D., KUBITSCHKE, K., CRENNAN, J. & BAUGHN, R.- Pneumonia and acute febrile tracheobronchitis due to *Haemophilus influenzae*. *Annals of Internal Medicine*, 99: 444, 1983.

95. NELSON, J.- The increasing frequency of β -lactamase positive Haemophilus influenzae type b. *Journal of the American Medical Association*, 244: 239, 1980.
96. OBERHOFER, T. & BACK, A.- Biotypes of Haemophilus encountered in clinical laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 10: 168, 1979.
97. PAIK, G.- Reagents, stains, and miscellaneous test procedures. In: LENNETTE, E., BALLOWS, A., HAUSLER, W. & TRUANT, J., eds. *Manual of Clinical Microbiology*, Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980, Third edition, p. 1001.
98. PETER, G. & SMITH, D.- Haemophilus influenzae meningitis at the Children's Hospital Medical Center in Boston, 1958 to 1973. *Pediatrics*, 55: 523, 1975.
99. PINEDA, M.- Frecuencia etiológica de las meningitis en el Departamento Pediátrico del Hospital Universitario de Maracaibo. (Trabajo de ascenso). Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. 1976.
100. PRIETO, G.- Meningitis bacteriana. Etiología. Consideraciones sobre el diagnóstico etiológico. *Revista Facultad de Medicina*, 1: 37, 1968.
101. PRIETO, G.- Notas sobre el diagnóstico bacteriológico de las meningitis. *Publicación Facultad de Medicina*, 1969.
102. PRIETO, G., MARIN, C. & MARTINEZ, A.- Estado actual de la sensibilidad y resistencia del Haemophilus influenzae a los agentes antimicrobianos incluyendo ampicilina y clo-ramfenicol. *XIV Jornadas Nacionales de Microbiología*, Caraballeda, 1984.
103. PRIETO, G., MARIN, C. & MARTINEZ, A.- Sensibilidad del Haemophilus influenzae a las cefalosporinas incluyendo cefotaxima y cefoperazona. *XIV Jornadas Nacionales de Microbiología*. Caraballeda, 1984.
104. PRIETO, G., MARIN, C. & MARTINEZ, A.- Biotipos y serotipos de Haemophilus influenzae y su relación a la procedencia del espécimen clínico. *XIV Jornadas Nacionales de Microbiología*. Caraballeda, 1984.
105. PRIETO, G., MARIN, C., MARTINEZ, A. & LEAL, E.- Infección urinaria por Haemophilus influenzae. *Memorias XIII Jornadas Nacionales de Microbiología*, Coro, 1983.
106. PRIETO, G., PINEDA, M., ZABALA, N., TORRES, A. & MARTINEZ, A.- Frecuencia etiológica de las meningitis en el Hospital Universitario de Maracaibo. *Investigación Clínica*. Suplemento N° 1, 1983.
107. PRIETO, G., PINEDA, M., ZABALA, N., TORRES, A. & MARTINEZ, A.- Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de los microorganismos más frecuentemente aislados en L.C.R. *Investigación Clínica*, Suplemento N° 1, 1983.
108. RETTER, M., & BANNATYNE, R.- A comparison of conventional and Minitek systems for biotyping Haemophilus influenzae. *American Journal of Clinical Pathology*, 75: 827, 1981.
109. SANDERS, D. & GARBEE, H.- Failure of response to ampicillin in Haemophilus influenzae meningitis. *American Journal of Diseases of Children*, 117: 331, 1969.
110. SCHEIFELE, D.- Ampicillin-resistant Haemophilus influenzae in Canada. Nationwide survey of hospital laboratories. *Canadian Medical Association Journal*, 121: 198, 1979.
111. SCHULT, K.- Isolation of Haemophilus in urine cultures from children. *Journal of Pediatrics*, 95: 565, 1979.
112. SCHWARTZ, R.- The increasing incidence of ampicillin resistance in Haemophilus influenzae. *Journal of the American Medical Association*, 239: 320, 1978.
113. SCHWARTZ, R., GOLDENBERG, R., PARK, C. & KEIM, D.- The increasing prevalence of bacteremic ampicillin-resistant Haemophilus influenzae infections in a community hospital. *Pediatrics Infectious Diseases*, 1: 242, 1982.

114. SHACKLEFORD, P., BOBINSKI, J., FEIGIN, R. & CHERRY, J.- Therapy of Haemophilus influenzae meningitis reconsidered. *New England Journal of Medicine*, 287: 634, 1972.
115. SHAH, P.- Cefotaxime and meningitis. *Lancet*, 1: 490, 1980.
116. SHINSHIDO, H. & MATSUMOTO, K.- Meningitis due to Haemophilus influenzae type e biotype 4. *Journal of Clinical Microbiology*, 10: 926, 1979.
117. SHURIN, P., PELTON, S., SCHEIFEL, D. & KLEIN, J.- Otitis media caused by non-typable ampicillin-resistant strain of H. influenzae. *Journal of Pediatrics*, 88: 646, 1976.
118. SIMASATHIEN, S., DUANGMANI, C. & ECHEVERRIA, P.- Haemophilus influenzae type b resistant to ampicillin and chloramphenicol in an orphanage in Thailand. *Lancet*, II: 1214, 1980.
119. SIMON, H., SOUTHWICK, F., MOELLERING, R. & SHERMAN, E.- Haemophilus influenzae in hospitalized adults: current perspectives. *American Journal of Medicine*, 69: 219, 1980.
120. SMITH, A.- Antibiotic resistance in Haemophilus influenzae. *Pediatrics Infectious Diseases*, 2: 352, 1983.
121. SYRIOPOULOU, V., SCHEIFELE, D., HOWIE, V. ET AL.- Incidence of ampicillin-resistant Haemophilus in otitis media. *Journal of Pediatrics*, 89: 839, 1976.
122. SYRIOPOULOU, V., SCHEIFELE, D., SMITH, A., ET AL.- Increasing of ampicillin resistance in Haemophilus influenzae. *Journal of Pediatrics*, 92: 889, 1978.
123. THIRUMOORTHY, M., ROBOS, D. & DAJANI, A.- Susceptibility of Haemophilus influenzae to chloramphenicol and eighth β -lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20: 208, 1981.
124. THOMAS, W., MC RAYNOLDS, J., MOCK, C. & BAILEY, D.- Ampicillin-resistant Haemophilus influenzae meningitis. *Lancet*, I: 313, 1974.
125. THORSBERRY, C., GAVAN, T. & GERLACH, E.- New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. *Cumitech 6*. Coordinating ed., Sherris, J. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1977.
126. THORSBERRY, C. & KIRVEN, L.- Antimicrobial susceptibility of Haemophilus influenzae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6: 620, 1974.
127. TURK, D.- Ampicillin-resistant Haemophilus influenzae meningitis. *Lancet*, I: 453, 1974.
128. TURK, D.- The pathogenicity of Haemophilus influenzae. *Journal of Medical Microbiology*, 18: 1, 1984.
129. UCHIYAMA, N., GREENE, G., KITTS, D. & THRUPP, L.- Meningitis due to Haemophilus influenzae type b resistant to ampicillin and chloramphenicol. *Journal of Pediatrics*, 97: 421, 1980.
130. VINER, J. & MASSANARI, M.- Haemophilus influenzae type d meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 9: 280, 1979.
131. WALLACE, J., BAKER, C., QUINONES, F., HOLLIS, D., WEVER, R. & WISS, K.- Nontypable Haemophilus influenzae (biotype 4) as a neonatal, maternal and genital pathogen. *Reviews of Infectious Diseases*, 5: 123, 1983.
132. WALLACE, J., MUSER, D., SEPTIMUS, E., MC GOWAN, J., QUINONES, F., WISS, K., VANCE, P. & THIR, P.- Haemophilus influenzae infections in adults: characterization of strains by serotypes, biotypes and β -lactamase production. *Journal Infectious Diseases*, 144: 101, 1981.
133. WARD, J., GORMAN, G., PHILLIPS, C., ET AL.- Haemophilus influenzae type b, disease in a day-care center. Report of an outbreak. *Journal of Pediatrics*, 92: 713, 1978.

134. WASHINGTON II, J., editor.- Laboratory procedures in clinical microbiology. Boston, 1974, LITTLE, BROWN and Co.
135. WASHINGTON II, J., & SUTTER, V.- Dilution susceptibility test. In: LENNETTE, E., BALLOWS, A., HAUSLER, W. & TRUANT, J., eds. *Manual of Clinical Microbiology*, Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980. Third edition, P. 453.
136. WEHRLE, P., MATHIES, A. & LEEDON, J.- The critically ill child: management of acute bacterial meningitis. *Pediatrics*, 44: 991, 1966.
137. WHINSNANT, J.- Haemophilus. In: JOKLIN, W., WILLET, H., AMOS, D., eds. ZINSSER. *Microbiology*. New York: Appleton-Century-Crofts, 1980. 17th edition, p. 604.
138. WILLIAMS, J. & CAVANACH, P.- Ampicillin-resistant Haemophilus influenzae meningitis. *Lancet*, I: 864, 1974.
139. WISE, R., ROLLASON, T., LOGAN, M., ANDREWS, J. & BEDFORD, K.- HR-756, a highly active cephalosporin: comparison with cefazolin and carbenicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14: 807, 1978.