

*Lectura interpretativa del antibiograma en la familia Pasteurellaceae.*

**Por: Daniela Calero & Andrés Zabala**

CONFIDENCIAL

## Índice

<b>1. GENERALIDADES DE LA FAMILIA <i>Pasteurellaceae</i></b> .....	- 1 -
1.1. Sitios de infección más comunes familia <i>Pasteurellaceae</i> .....	- 1 -
1.1.1. Sitios de infección <i>Haemophilus spp.</i> .....	- 1 -
1.1.2. Sitios de infección <i>Pasteurella spp.</i> .....	- 3 -
1.1.3. Sitios de infección <i>Actinobacillus spp.</i> .....	- 6 -
1.1.4. Sitios de infección <i>Aggregatibacter spp.</i> .....	- 7 -
1.2. Identificación de familia <i>Pasteurellaceae</i> .....	- 9 -
1.2.1. Identificación de <i>Haemophilus spp.</i> .....	- 9 -
1.2.2. Identificación de <i>Pasteurella spp.</i> .....	16
1.2.3. Identificación de <i>Actinobacillus spp.</i> .....	17
1.3. Resistencias intrínsecas de <i>H. influenzae</i> .....	23
1.4. Epidemiología de la familia <i>Pasteurellaceae</i> a nivel mundial .....	23
<b>2. LECTURA INTERPRETATIVA DEL ANTIBIOGRAMA</b> .....	27
2.1. <i>Haemophilus spp.</i> .....	27
2.1.1. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.....	27
2.1.2. Selección y disposición de discos para estudios de susceptibilidad antimicrobiana por el método Kirby Bauer .....	36
2.1.3. Identificación del fenotipo de resistencia.....	45
2.1.4. Pruebas de rutina.....	48
2.1.5. Pruebas complementarias .....	48
2.1.6. Comentarios de reporte .....	52
2.2. <i>Pasteurella spp.</i> .....	54
2.2.1. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.....	54
2.2.2. Selección y disposición de discos para estudios de susceptibilidad antimicrobiana por el método de Kirby Bauer .....	56
2.2.3. Identificación de fenotipo de resistencia.....	63
2.2.4. Comentarios de reporte .....	64
2.3. <i>Aggregatibacter spp.</i> y <i>Actinobacillus spp.</i> .....	65
2.3.1. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.....	65
2.3.2. Comentarios de reporte .....	66

## **1. GENERALIDADES DE LA FAMILIA *Pasteurellaceae***

En la familia *Pasteurellaceae* para obtener una adecuada subdivisión en su taxonomía se aplican pruebas genéticas como la secuenciación 16s rRNA, la cual permite observar que está compuesta por: “*Actinobacillus, Aggregatibacter, Avibacterium, Basfia, Bibersteinia, Bisgaardia, Chelonobacter, Cricetibacter, Frederiksenia, Gallibacterium, Haemophilus, Histophilus, Lonopinella, Mannheimia, Mesocricetibacter, Muribacter, Necropsobacter, Nicoletella, Otariodibacter, Pasteurella, Phocoenobacter, Testudinibacter, Ursidibacter, Vespertiliibacter* y *Volucribacter*” (Michael, Bossé, & Schwarz, 2017, p.1-2). Los géneros que más afectan al ser humano son *Pasteurella, Actinobacillus, Haemophilus* y *Aggregatibacter* (Nørskov-lauritsen, 2014).

### **1.1. Sitios de infección más comunes familia *Pasteurellaceae***

Las bacterias que forman parte de la familia *Pasteurellaceae* en su gran mayoría son oportunistas. A pesar de ello, cada bacteria se adapta a su zona de infección y su hábitat principal en el ser humano son las mucosas como el tracto digestivo, genital y respiratorio (Staley, Boone, Chairman, Brenner, Vos, Garrity, Schleifer, 2005, p.851). Entre los microorganismos principales encontramos:

#### **1.1.1. Sitios de infección *Haemophilus spp.***

*Haemophilus spp.* integra diversas especies, sin embargo, son pocas las que afectan al ser humano. Entre la más nombrada se halla a *H. influenzae*, aquella se asocia a afecciones en el tracto respiratorio superior, pueden ser encapsuladas como no capsuladas, muchas bibliografías describen a las cepas encapsuladas como propicias en su crecimiento, mientras que las no capsuladas o (NTHi) tienen mayor dificultad en su tipificación, tratamiento y se manifiestan con recurrencia en problemas como otitis media aguda, sinusitis maxilar aguda, exacerbación bacteriana aguda por bronquitis crónica, conjuntivitis aguda y neumonía (Jorgensen, Carroll, Funke, Pfaller, Landry, Richter & Warnock, 2015).

De igual manera que otros tipos de bacterias, *Haemophilus spp.* se presenta como un microorganismo que forma parte de la microbiota en el ser humano, la encontramos tanto en la orofaringe como en la nasofaringe. En la orofaringe se manifiestan especies como *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* no capsulados (Washington, Allen, Janda, Koneman,

Procop, Shcreckenberger & Woods, 2008). Mientras que, en la nasofaringe predominante en niños que en adultos, se encuentra *H. influenzae* (Staley et al., 2005).

Conforme a otro tipo de cepa se encuentra a *H. aegyptius*, productor de conjuntivitis y se evidencia como un agente causal de la fiebre purpúrica brasileña (BPF), esta patología tiene una característica peculiar, ya que es provocada por cepas clonales de *H. aegyptius* las cuales contienen una relación significativa en su ADN y se la asocia con *H. influenzae*, por lo tanto, se la denomina *H. influenzae* biogrupo *aegyptius* (Pereira, Mofatto, Silva, Alves, Machado, Theizen, Carazzolle, 2019). Al contrario de *H. aegyptius*, en el caso de *H. haemolyticus* tienen poca prevalencia y se la encuentra en nasofaringe y dientes humanos, pero de forma muy escasa (Staley et al., 2005).

Al tratarse de *H. parainfluenzae* se puede decir que se halla dentro de cavidades orales, faringe y flora vaginal normal, además se lo asocia en procesos patológicos como endocarditis bacteriana subaguda. Es importante mencionar que, de acuerdo con Jorgensen et al. (2015) los hemocultivos para *H. parainfluenzae*, puede que conlleven a falsos negativos en muestras de pacientes con infecciones sistémicas por NTHi.

Finalmente, *H. ducreyi* se caracteriza por provocar hemólisis tipo  $\beta$  muy tenue en el agar sangre. Esta cepa se la asocia a enfermedades de transmisión sexual y su sintomatología principal es la producción de chancro en el área de los genitales (Staley et al., 2005). De acuerdo con Jorgensen et al., (2015) la patología se la identifica más en lugares de desarrollo como Asia, África y en América Latina. En la tabla 1 se integran todas las especies *Haemophilus ssp.* con sus posibles complicaciones

**Tabla 1.***Haemophilus spp. microbiota y complicaciones.*

Bacteria	Microbiota- Seres humanos					Complicaciones
	Hipofaringe	Orofaringe	Nasofaringe	Dientes	Flora vaginal	
<i>H. influenzae</i>		x	x			Otitis media aguda, sinusitis maxilar aguda, exacerbación bacteriana aguda por bronquitis crónica, conjuntivitis aguda y neumonía
<i>H. aegyptius</i>						Conjuntivitis purulenta aguda y es agente causal de la fiebre purpúrica brasileña.
<i>H. haemolyticus</i>			x	x		Poco trascendente
<i>H. parainfluenzae</i>	x	x	x		x	Endocarditis bacteriana subaguda
<i>H. ducreyi</i>						Chancro en genitales

*Nota.* Datos obtenidos de Jorgensen et al., (2015) y Staley et al., (2005).

### 1.1.2. Sitios de infección *Pasteurella spp.*

En general, las infecciones por *Pasteurella spp.* en los seres humanos provienen de mordeduras o lesiones de algún tipo con animales que contengan en su microbiota aquellos microorganismos. A su vez de forma prevalente, cepas como *P. multocida*, *subsp. multocida* y *subsp. séptica*, *P. canis*, *P. dagmatis* y *P. stomatis*, son causantes de procesos clínicos y se los encuentra en “fascitis necrotizante, abscesos pulmonares crónicos, endocarditis, meningitis, neumonía, peritonitis, septicemia, absceso periocular y celulitis” (Staley et al., 2005, p.860). En la tabla 2 se especifican algunas bacterias y sus complicaciones.

Como bacteria principal y en la que se centra un poco el capítulo está *P. multocida*. Su riesgo radica en la producción de bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos o que tengan alguna enfermedad hepática y tumores, de igual manera la propagación de esta bacteria da como resultado neumonías, meningitis entre otras situaciones (Washington et al., 2008).

Con respecto a *P. canis*, se encuentran en la microbiota normal de los perros como biotipo I y en terneros el biotipo II. Las infecciones en el ser humano son causadas de igual manera por mordeduras de perros y sus signos principales son abscesos y osteomielitis (Washington et al., 2008).

En cuanto a *P. dagmatis* se integra como microbiota normal oral en perros y gatos. Según Washington et al. (2008), existen reportes clínicos en los seres humanos sobre la bacteria en muestras provenientes de celulitis, abscesos inguinales y faríngeos, heridas por mordedura de perro y gato, rara vez se encuentra en endocarditis, neumonía, bacteriemia, peritonitis puesto que, usualmente se asocian a procesos patológicos primarios como diabetes o inmunodeficiencia.

De igual manera que *P. canis*, *P. stomatis* es aislada en pacientes expuestos a mordeduras por animales y se las encuentra en microbiota de vías respiratorias tanto de perros como de gatos (Washington et al., 2008).

**Tabla 2**

*Bacterias Pasteurella spp.*

Bacteria	Aparato respiratorio de animales						Tubo digestivo		Complicaciones
	Perros	Corderos	Gatos	Gallinas	Roedores	Caballos	Ganado vacuno	Cerdos	
<i>P. multocida</i> subespecie <i>multocida</i>	x	x	x				x		
<i>P. multocida</i> subespecie <i>septica</i>	x	x	x				x		
<i>P. multocida</i> subespecie <i>gallicida</i>	x	x	x	x			x		Infecciones en seres humanos por mordeduras
<i>P. pneumotropica</i>	x		x		x				Infecciones por mordeduras que causa meningitis, bacteriemia infecciones osteoarticulares, infección de heridas, celulitis e infecciones de vías respiratorias altas
<i>P. aerogenes</i>								x	Aislados en oídos, cultivos vaginales y osteomielitis vertebral,
<i>P. bettyae</i>									Aislada en aparato genitourinario y abscesos de la glándula de Bartolino
<i>P. dagmatis</i>	x			x					Enfermedades sistémicas
<i>P. canis</i>	x	x							Infecciones sistémicas
<i>P. stomatis</i>	x								Infecciones por mordeduras
<i>P. caballi</i>							x		Aislado en endocarditis, neumonía, peritonitis, heridas abscesos e infecciones del aparato genital
<i>P. gallinarum</i>				x					Bacteriemia rara

Nota. Datos obtenidos de Washington et al., (2008).

### 1.1.3. Sitios de infección *Actinobacillus spp.*

Las bacterias que más afectan al ser humano son *Actinobacillus ureae* y *Actinobacillus hominis*. Cabe mencionar que, antes se consideraba a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* como parte del grupo, pero en la actualidad se la clasifica dentro de un nuevo género denominado *Aggregatibacter spp.* Si bien *A. ureae* como *A. hominis* son parte de la microbiota de la orofaringe y del tracto respiratorio superior, también se reportan de forma poco habitual, ya que en su mayoría se las observan como consecuencias subclínicas (Nørskov-lauritsen, 2014). También existen otras bacterias como *A. lignieresii*, *A. equuli* y *A. suis*, presentes en la población, pero suelen ser por casos de mordedura de algún animal, entre ellas se encuentra ovejas y caballos (Washington et al., 2008). Su distribución y complicaciones se coloca en la tabla 3.

Nørskov-lauritsen (2014) señala que *A. ureae* puede ser reportada en meningitis, pese a que Washington et al. (2008) la considera como un comensal que se identifica a partir de infecciones como: “bacteriemias, endocarditis, meningitis, infecciones medulares óseas, rinitis atrófica, bronquitis, neumonía, conjuntivitis, otitis media y peritonitis” (p.434)

*A. ureae* forma parte de la flora bacteriana del tracto respiratorio, es decir que es inusual encontrarlo en reportes patológicos. Así mismo, se establece como consecuencia de enfermedades primarias, debido a que es causante de infecciones en procesos posquirúrgicos, diabetes, enfermedades periodontales, enfisemas, cirrosis alcohólica y puede ser identificada en pacientes inmunodeprimidos con infecciones por HIV (Washington et al., 2008).

De acuerdo con Nørskov-lauritsen (2014), *A. hominis* es reportado en enfermedades pulmonares crónicas, septicemia por una insuficiencia hepática y en empiema pleural. Se lo considera como un organismo con poca prevalencia epidemiológica y para lograr su identificación es necesario la recolección de esputo (Washington et al., 2008).

**Tabla 3.***Actinobacillus spp. Complicaciones y microbiota*

Bacteria	Tracto respiratorio superior	Complicaciones
<i>A. ureae</i>	x	Meningitis, bacteriemias, endocarditis, infecciones medulares óseas, rinitis atrófica, bronquitis neumonía, conjuntivitis, otitis media y peritonitis.
<i>A. hominis</i>	x	Enfermedades pulmonares crónicas, septicemia y empiema pleural

Nota. Datos obtenidos de Washington et al., (2008).

#### 1.1.4. Sitios de infección *Aggregatibacter spp.*

En sus clasificaciones bacterianas, la de mayor importancia clínica es *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, aquella se encuentra presente en la microbiota oral del ser humano, provoca algunos problemas como endocarditis infecciosa y periodontitis. Lo más característico de la especie es que forma parte del grupo HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*). (Murra, Lützen, Barut, Zbinden, Lund, Villesen, y Nørskov-lauritsen, (2018). En otra instancia, Nørskov-lauritsen (2014) menciona que existen otras bacterias que contienen la misma frecuencia clínica las cuales son: *Aggregatibacter aphrophilus* y *Aggregatibacter segnis*.

En *A. actinomycetemcomitans*, se lo encuentra en los surcos gingivales y supragingivales (Washington et al., 2008). Contiene un serotipo causal específico que afecta en este nivel al ser humano, que es el de tipo b también denominado clon JP2, tiene gran importancia médica debido a que provoca periodontitis agresiva en adolescentes. Este clon favorece significativamente la producción de leucotoxina (Nørskov-lauritsen, 2014). La leucotoxina en el paciente logra un aumento de la inflamación e inmunosupresión de forma localizada, atribuyendo a la formación de lesiones periodontales. Por otro lado, también ocasiona otro tipo de enfermedades como: infecciones actino micóticas, endocarditis, bacteriemias e infecciones por heridas (Washington et al., 2008).

Como se menciona, otra característica de *A. actinomycetemcomitans* que pertenece al grupo “HACEK”, es que provocar periodontitis de forma temprana o también denominada periodontitis juvenil localizada, entre sus complicaciones se halla el desgaste continuo del hueso donde se encuentra la infección. Las razones o causas de su invasión,

se encuentra en torno a una mala manipulación o práctica dental, lo que conlleva a complicaciones como endocarditis (Washington et al., 2008).

En cuanto a, *A. aphrophilus*, este tipo de bacterias se ubican en la placa supragingival de forma escasa y se las observan en la saliva, pueden provocar endocarditis infecciosa, abscesos cerebrales, abscesos epidurales e infecciones intervertebrales (Nørskov-lauritsen, 2014). Sin embargo, Jorgensen et al., (2015) manifiesta que *A. aphrophilus* se integran en enfermedades como espondilodiscitis, endocarditis y en patologías sistémicas que impliquen afecciones tanto en huesos como en articulaciones.

Con respecto *A. segnis*, su desarrollo entorno a la microbiota oral de la placa dental y la faringe (Staley et al., 2005). Por otro lado, de acuerdo con Washington et al. (2008), sus reportes indican que han existido aislamientos significativos en abscesos pancreáticos, apendicitis aguda y abscesos umbilicales cutáneos. Esta bacteria raramente puede ser aislada en endocarditis infecciosa (Nørskov-lauritsen & Kilian, 2006). En la tabla 4, se detalla cada *Aggregatibacter spp.* con sus complicaciones.

**Tabla 4.**

*Aggregatibacter spp. complicaciones.*

Bacteria	Microbiota- Ser humano					Complicaciones
	Surcos gingivales	Supragingivales	Microbiota oral	Placa dental	Faringe	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	x	x				Periodontitis agresiva en adolescentes, infecciones actinomicóticas, endocarditis, bacteriemias e infecciones por heridas
<i>A. aphrophilus</i>		x				Endocarditis infecciosa, abscesos cerebrales, abscesos epidurales, infecciones intervertebrales, enfermedades sistémicas tanto en huesos como en articulaciones y espondilodiscitis.
<i>A. segnis</i>			x	x	x	Abscesos pancreáticos, apendicitis aguda, abscesos umbilicales cutáneos y raramente causa endocarditis.

Nota. Datos obtenidos de Washington et al. (2008), Nørskov-lauritsen, (2014), Jorgensen et al., (2015), Staley et al., (2005).

## 1.2. Identificación de familia *Pasteurellaceae*

Sus características microscópicas se distinguen por tener una forma de cocobacilo Gram negativos y tienden a medir de 0,2  $\mu\text{m}$  a 0,4  $\mu\text{m}$  x 0,4  $\mu\text{m}$  a 2,0  $\mu\text{m}$ . Sus tamaños son variables conforme al crecimiento y al suplemento nutricional que adquieren las bacterias en los medios de cultivo. No forman esporas y son inmóviles. Se define a esta familia como anaerobia facultativa, contienen un metabolismo fermentativo, son capnofílicas y su temperatura de crecimiento es aproximadamente de 37°C (Staley et al., 2005, p.851).

Para su aislamiento, las bacterias necesitan suplementos nutricionales complejos que pueden ser extracto de levadura, suero lisado de sangre completa, nitrógeno orgánico, aminoácidos, vitaminas, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), hematina o protoporfirina. De igual manera, Forbes, Sahm, Weissfeld, & Trevino (2009) afirma que estas bacterias no se deben cultivar en medios como el agar MacConkey, ya que no contienen los nutrientes necesarios para su crecimiento.

### 1.2.1. Identificación de *Haemophilus spp.*

Este género se subdivide en varias especies de acuerdo a su función taxonómica, en el ser humano encontramos a *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus ducreyi* y *Haemophilus haemolyticus* (Nørskov-lauritsen, 2014). Cada una contiene su proceso de diferenciación bioquímica (Observar figura 1) y se presenta en distintos lugares del cuerpo.

La especie *H. influenzae* se diferencia por la necesidad nutricional de hemina o hematina (Factor X) y Nicotinamida adenina dinucleótido NAD (Factor V), todos estos suplementos se los incorpora en el medio de cultivo agar chocolate, el cual es uno de los más utilizados para su aislamiento; no obstante este medio no se debe utilizar para la visualización de las susceptibilidades en los antibióticos, debido a que autores como Courvalin (2010) comenta que un elevado grado de cisteína se encarga de alterar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) sea de imipenem como de penicilinas y de igual manera sucede con la hemoglobina bovina, dado que al contener demasiada timina inhibe la acción tanto de las sulfonamidas como de trimetoprima.

En los cultivos de agar chocolate, *H. influenzae* tienen una característica lisa, convexa, grisácea y translúcida (Courvalin, 2010). Conforme a su desarrollo, el ambiente propicio para el microorganismo, debe contar con el 5-10% de CO<sub>2</sub> y con un tiempo aproximado

de 24 horas de incubación, sin embargo, si no existe desarrollo alguno, el periodo de espera se extiende hasta 72 horas (Staley et al., 2005) y (Forbes et al., 2009).

Cabe decir que entre los medios más implementados hoy en día para observar el comportamiento antimicrobiano de *H. influenzae* y que son recomendados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad (EUCAST), es el agar medio de prueba para *Hemophilus* (HTM) y el agar Muller- Hinton complementado con sangre de caballo lisada y NAD (MH-LHB-NAD) (Courvalin, 2010).

*H. influenzae* encapsulado contiene 6 polisacáridos distintos distribuidos de la *a-f*, el polisacárido que más se presenta a nivel mundial es el de tipo *b* conjuntamente con los biotipos I y II, que ocasionan diversas infecciones en las vías respiratorias superiores como neumonías bacterianas, epiglotis y meningitis, pero desde que se implementaron programas de vacunación con el polisacárido *b* (Hib), se reduce considerablemente su incidencia (Jorgensen et al., 2015). Sin embargo, según Agrawal & Murphy (2011) indican que al disminuir el número de reportes por parte del serotipo *b*, la prevalencia de otros serotipos como el *a* y *f* aumentan, pero conforme con Staley et al. (2005) revelan que las cepas tipo *b* y *f* son las más frecuentes que las de tipo *c*.

Adicionalmente, *H. influenzae* como se cita, se subdivide en 8 biotipos (I-VIII) que se determinan por pruebas bioquímicas como el indol, ureasa y actividad de ornitina descarboxilasa, observar Figura 2. Cabe decir que, conforme con Nørskov-lauritsen (2014) el punto clave para la clasificación en *H. influenzae*, es que casi el 90% de sus aislados producen ureasa. De igual manera, la importancia de cada método, va en función a los estudios epidemiológicos que refiera a las especies (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

La especie *H. aegyptius* fermenta xilosa, produce indol y puede aglutinar los hematíes (Nørskov-lauritsen, 2014). Su crecimiento es lento y se observa colonias en un periodo de 48 horas. En el agar chocolate se las identifica por su forma convexa, lisa, con una tonalidad grisácea y translúcida. De igual manera que el *H. influenzae*, crecen en el agar chocolate y producen proteasas de inmunoglobulina IgA1. Se puede distinguir de *H. influenzae* por su crecimiento más retardado y la susceptibilidad a la troleandomicina (Courvalin, 2010). Para cultivar esta especie se debe realizar en una temperatura de 37°C tomando en cuenta que tiene que haber un 5% de CO<sub>2</sub>. (Pereira et al., 2019).

Según Nørskov-lauritsen (2014), *H. haemolyticus* tiene muy poca trascendencia médica, pero es muy importante su identificación, a causa de que se puede confundir con otras cepas de *Haemophilus* como son las de biotipo IV de *H. influenzae* (*H.quentini*) y *H. intermedius*. Estas cepas tienen una relación genética estrecha, pero integran diferentes fenotipos, lugares de afección y forma de colonización. En pruebas como espectrofotometría de masas (MALDI-TOF) se observa pequeñas diferencias que logran especificar cada especie.

El crecimiento de *H. haemolyticus* se da manera propicia en agar chocolate con formas convexas, color grisáceo, lisas y translúcidas. Se las puede observar después de 24 horas de incubación en una temperatura de 37°C. En agar base sangre de bovino u ovino se visualiza su hemólisis (Staley et al., 2005).

A su vez, en especies como *H. parainfluenzae*, tiene relación con *H. influenzae* pero difieren en sus factores de crecimiento, ya que la bacteria solo depende del factor V en su desarrollo y puede sintetizar el grupo hemo o factor X de forma in vitro, mientras que *H. influenzae* depende de los dos factores para su desarrollo. Existen otras especies parecidas a *H. parainfluenzae* como: *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. pittmaniae* y *H. sputorum*, puesto a que tienen una similitud en ciertos factores de crecimiento como la no dependencia del factor X (Nørskov-lauritsen, 2014). Sin embargo, difieren en ciertos aspectos fenotípicos que en la figura 3 se los especifica.

La bacteria *H. parainfluenzae* se divide al igual que *H. influenzae* en 8 biotipos, los cuales se observan dentro de la figura 2. Su importancia de una correcta identificación fenotípica infiere en la confusión existente entre distintos biotipos de la especie con otras cepas nombradas anteriormente, a consecuencia de que el biotipo III de *H. parainfluenzae* pueden ser mal interpretado con *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus* y *H. sputorum*. En cuanto al biotipo V de *H. parainfluenzae*, se puede confundir con *H. pittmaniae* o cepas que solo deban crecer bajo el factor V, pero que no necesiten del factor X como es el caso de las especies de *Aggregatibacter* (Nørskov-lauritsen, 2014). Por ello al realizar las pruebas fenotípicas se debe incluir un proceso detallado que logre diferenciar de forma propicia las especies y evitar así una caracterización bacteriana errada.

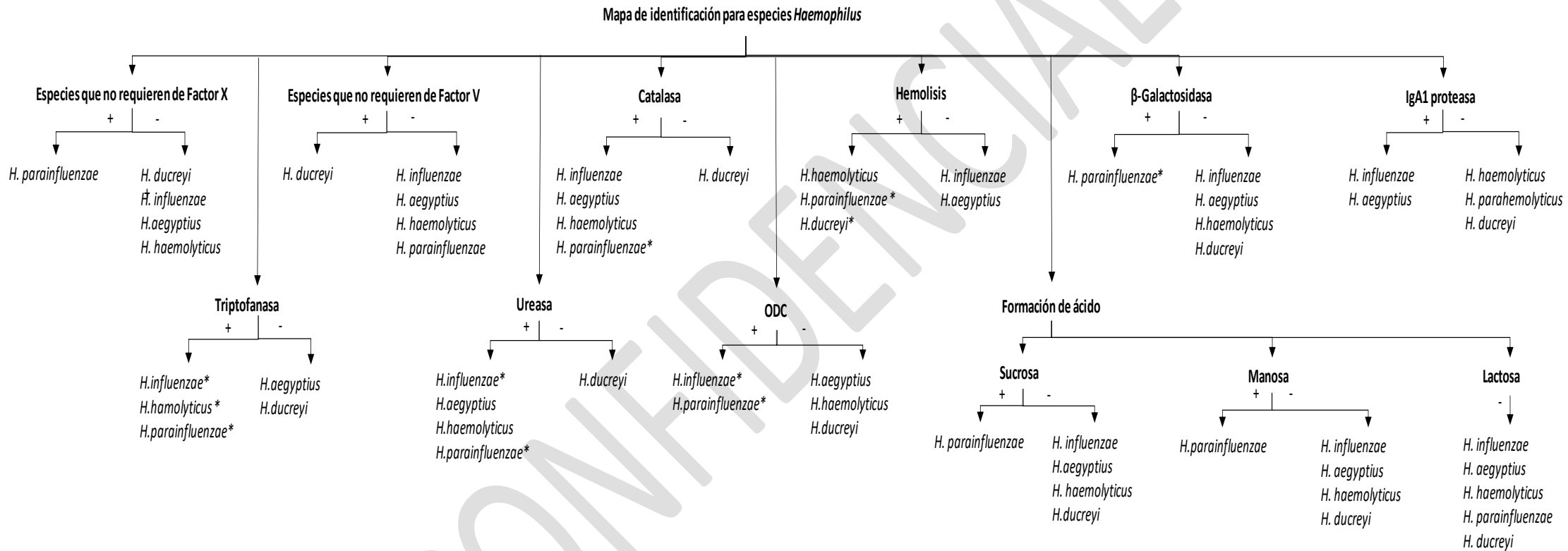
*H. parainfluenzae* se la cultiva en agar chocolate, tiene una forma arrugada, pero al pasar el tiempo se convierten en colonias lisas con una tonalidad blanquecina, grisea o

amarillenta (Staley et al., 2005). La temperatura de crecimiento es aproximadamente 37°C y se las observa en un periodo de 24 horas. Staley et al. (2005) revela que *H. parainfluenzae* puede producir una hemólisis, pero esto varía ya que, según Nørskov-lauritsen (2014) las cepas tienden a originar hemolisina, la misma que interfiere en pruebas como ureasa y ornitina descarboxilasa (ODC), dando un resultado positivo.

Conforme con *H. ducreyi*, no produce cápsula, dentro de su cultivo necesita como componente nutricional el factor X mas no el factor V. Su crecimiento puede dar una coloración amarillenta o grisácea y se estima que su desarrollo en el agar chocolate se obtiene en un tiempo de 72 horas, de igual manera su estructura es pequeña y lisa (Staley et al., 2005). La temperatura óptima de crecimiento puede oscilar entre un 30°C a 33°C y se acompaña de un ambiente que mantenga un 5% de CO<sub>2</sub>. Esta especie al igual que *H. aegyptius*, puede demorar en su crecimiento hasta 5 días dependiendo si se obtiene un requerimiento nutricional adecuado (Jorgensen et al., 2015).

**Figura 1.**

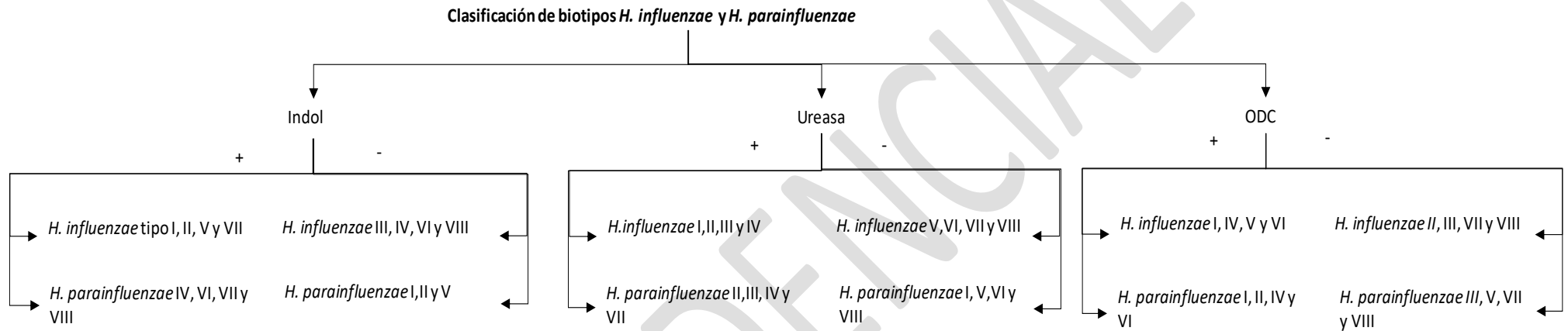
*Mapa de identificación para Hamophilus spp.*



*Nota:* \* significa variable; Datos obtenidos de Washington et al. (2008), Nørskov-lauritsen (2014), Elaborado por Calero (2021)

**Figura 2.**

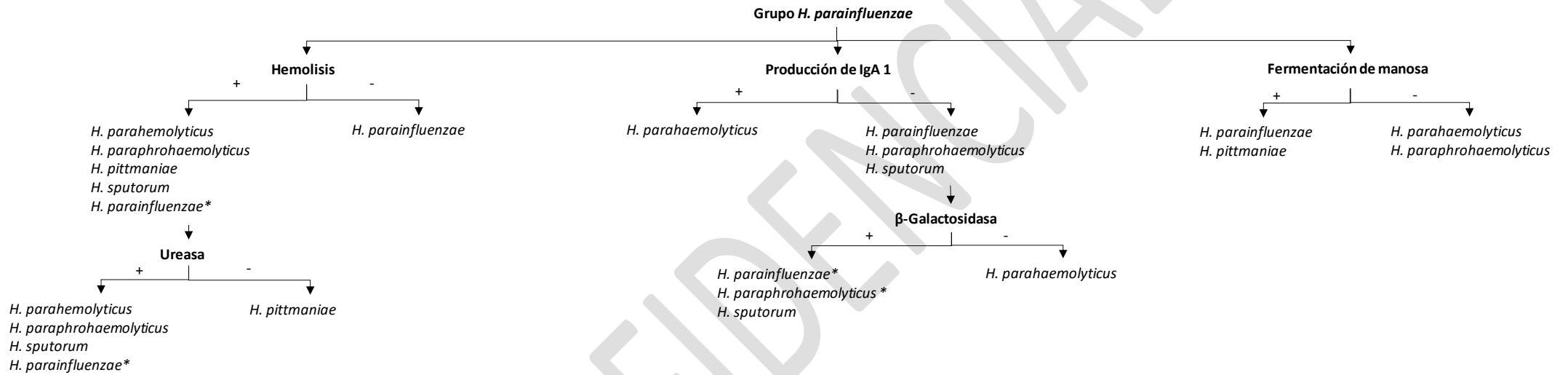
*Clasificación de biotipos para H. influenzae y H. parainfluenzae.*



*Nota:* Datos obtenidos de Washington et al. (2008), Nørskov-lauritsen (2014), Elaborado por Calero (2021)

**Figura 3.**

*Clasificación del grupo H. parainfluenzae.* Elaborado por: (Calero, 2021)



*Nota: \* significa variable; Datos obtenidos de Washington et al. (2008), Nørskov-lauritsen (2014), Elaborado por Calero (2021)*

### 1.2.2. Identificación de *Pasteurella* spp.

Son bacterias cocobacilares pleomórficas, gram negativas, no forman esporas y tampoco son motiles. Mantiene un proceso anaerobio facultativo, no dependen de factores V y X a excepción de algunas cepas. Su crecimiento puede observarse en una temperatura de 35°C a 37°C, en lapsos de 48 horas. Pueden crecer en agar sangre o agar chocolate (Staley et al., 2005).

Una de las bacterias pertenecientes a este grupo es *P. multocida*, se caracteriza por ser capsular y contener 5 tipos A, B, D, E y F. Además, se subdivide en 16 serotipos específicos y puede ser más patógena en los seres humanos cuando contiene cápsulas tipo A y D. Las mismas que pueden estimular la producción de toxinas como *toxA*, causante de rinitis atrófica agresiva en el ser humano (Staley et al., 2005). De igual manera, *P. multocida* contiene subespecies denominadas *multocida*, *séptica* y *callicida*, que se las diferencian por pruebas fenotípicas y se las especifica en la figura 5.

En cuanto al crecimiento de *P. multocida* se da en un periodo de 24 horas, habitualmente en agar chocolate y agar sangre de oveja, necesitan de un ambiente con CO<sub>2</sub> y no crecen en medios selectivos u entéricos como agar MacConkey. Al ser una bacteria capsular, puede observarse con aspecto mucoide en especial si la muestra es parte del aparato respiratorio (Washington et al., 2008). Su temperatura de crecimiento es de 25°C a 42 °C (Staley et al., 2005).

Por lo que se refiere a *P. canis*, son cepas independientes del factor V, crecen en una temperatura de 36°C (Staley et al., 2005). Akahane, Nagata, Matsumoto, Murayama, Isaka, Kameda y Kawakami (2011) en sus reportes señalan que la bacteria puede ser incorporada en medios como agar base sangre de oveja, agar chocolate y agar Drigalski por 24 horas en un ambiente aeróbico o también puede ser incubada en un periodo de 72 horas en un ambiente anaeróbico. En su crecimiento, se obtiene colonias de color blanco grisáceo y con una característica lisa. Sus pruebas bioquímicas son indispensables para detallar la diferencia entre las especies por lo que se las puede observar en la figura 5.

Tomando en cuenta las investigaciones de Akahane et al. (2011), a *P. dagmatis* la definen como a una bacteria con un crecimiento anaerobio facultativo, con crecimiento a una temperatura de 35 °C en un periodo de 72 horas. Desarrolla colonias así mismo en de agares tanto de tipo chocolate como de base sangre de oveja.

Acorde a *P. stomatis*, crecen en medios como agar base sangre, con una temperatura de 36°C, no es hemolítica y es totalmente independiente del factor V (Staley et al., 2005). Se la puede diferenciar por diversas pruebas bioquímicas que se las especifica en la figura 5.

### **1.2.3. Identificación de *Actinobacillus spp.***

Se definen como bacterias cocobacilares que pueden medir hasta 6 µm en los medios que incorporen glucosa y maltosa. Son anaerobias facultativas, crecen en un tiempo aproximado de 24 horas en agar base sangre y su temperatura óptima de desarrollo es de 37°C (Staley et al., 2005). Los agares recomendados para su crecimiento por parte de Forbes, et al (2009) son el agar sangre de oveja al 5%, agar chocolate y en poca proporción el agar MacConkey puesto que se evidencia un crecimiento leve, sin embargo, se debe tomar en cuenta que tanto *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Actinobacillus ureae* no muestran ningún desarrollo en el agar MacConkey.

*A. ureae*, se caracteriza por ser una bacteria pleomórfica, su crecimiento se da en un periodo de 24 horas, tienden a obtener mejores resultados de crecimiento en agares base sangre y se mantienen en una atmósfera con CO<sub>2</sub>. Sus formas en los medios de cultivo sólidos son lisas, no se observan reacciones hemolíticas en el agar base sangre, puede que tenga un aspecto mucoide y no exista ningún crecimiento dentro del agar MacConkey. Las pruebas bioquímicas se las especifica en la Tabla 2, sin embargo, lo que más llama la atención de esta especie es que produce acidificación por medio de hidratos de carbono incorporados en el medio (Washington et al., 2008).

Referente a *hominis*, es una bacteria polimórfica, pueden tener cápsulas y se observa su crecimiento en agares como agar chocolate. Si se quiere verificar la existencia de cepas capsuladas como no capsuladas, los dos tipos crecen en agar nutritivo y agar base sangre al 5%, no contienen ninguna hemólisis y su tiempo de crecimiento es de 24 horas conjuntamente con una temperatura de 35°C. Se puede decir que la bacteria no necesita de aspectos atmosféricos como un porcentaje específico de CO<sub>2</sub> (Staley et al., 2005). Sus pruebas bioquímicas específicas se las observa en la Tabla 5.

**Tabla 5***Pruebas complementarias para identificación de A. hominis y A. ureae*

<b>Pruebas complementarias</b>	<i>A. hominis</i>	<i>A. ureae</i>
<b>Dependencia del factor X</b>	-	-
<b>Dependencia del factor V</b>	-	-
<b>Catalasa</b>	-	+
<b>Oxidasa</b>	+	+
<b>Hemolisis</b>	-	-
<b>Ureasa</b>	+	+
<b>Indol</b>	-	-
<b>Orto-nitrofenil-β-galactósido</b>	+	-
<b>Producción de ácido:</b>		
<i>Lactosa</i>	+	-
<i>Galactosa</i>	+	-
<i>D-Manitol</i>	+	+
<i>Rafinosa</i>	+	-
<i>Salicin</i>	+	-
<i>D-Sorbitol</i>	-	+
<i>Sacarosa</i>	+	+
<i>Trehalosa</i>	+	-
<i>D-Xyloso</i>	+	-
<b>β-Galactosidasa</b>	+	-
<b>Triptofanasa</b>	-	-
<b>Ornitina descarboxilasa</b>	-	-
<b>IgA1 proteasa</b>	-	-
<b>Reducción de nitrato a nitrito</b>	+	+

Nota. Datos obtenidos de Staley et al., (2005) y Washington et al., (2008).

#### 1.2.4. Identificación de *Aggregatibacter spp.*

Nørskov-lauritsen (2014) indica que a mediados del 2006 se agrupan diversas bacterias como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* y *Haemophilus segnis*. Cabe mencionar que, estas cepas no solo se encuentran en los humanos sino también en animales y en la actualidad son denominadas como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Aggregatibacter paraphrophilus* y *Aggregatibacter segnis*.

Se caracterizan por obtener un crecimiento capnofílico y no son hemolíticas, a excepción de *A. actinomycetemcomitans* ya que, puede realizar un poco de hemólisis al obtener una gran cantidad de leucotoxina, sin embargo, esto dependerá mucho de su producción (Nørskov-lauritsen, 2014). Su crecimiento se obtiene en agar chocolate con una temperatura de 35°C y en una atmósfera que contenga 5% de CO<sub>2</sub>. Las bacterias usualmente sintetizan porfirina, por lo que no requieren de factor X para su crecimiento, mientras que la dependencia del factor V se observa de forma variable (Murra et al., 2018).

Por ello *A. actinomycetemcomitans* tiende a obtener buenos resultados con agar chocolate en un periodo de 24 horas y su diámetro puede aumentar si la incubación se extiende a un periodo de 48 horas con una temperatura óptima de 37°C. Posee una característica rugosa y puede formar biofilm, también cambiar a un aspecto liso si es que contiene mutaciones específicas en gen promotor *ftp* (Nørskov-lauritsen, 2014). Esta bacteria no es hemolítica, adquiere una incubación prolongada de 5 a 7 días y como todo miembro de la familia *Pasteurellaceae*, en su Gram se observa cocobacilos gram negativos y no crecen en agar MacConkey (Washington et al., 2008).

Como aspecto fundamental de *A. actinomycetemcomitans* se puede decir que contiene varios serotipos, los cuales se distribuyen de la a-f y se las identifican por medio de O-polisacáridos, puesto que los serotipos son clasificados de acuerdo a los lipopolisacáridos que se encuentran en su superficie celular (Washington et al., 2008). Asimismo, sus factores fenotípicos son claves para diferenciarlo de otras especies como *A. aphrophilus*, por lo que entre las pruebas más relevantes en su clasificación según Nørskov-lauritsen (2014) son la de catalasa, la o-nitrofenil-β- galactopiranosido (ONPG) fermentación de azúcares como la lactasa y sacarosa (Nørskov-lauritsen, 2014), todas estas pruebas se las especifica en la figura 4.

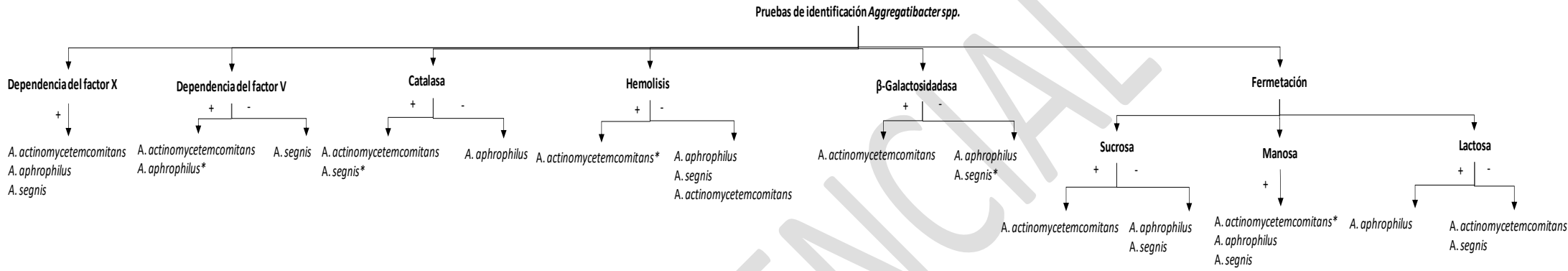
En relación con *A. aphrophilus* se define como una bacteria que unifica tanto a *H. paraphrophilus* como *H. aphrophilus*, ya que tienen una gran similitud fenotípica y solo difieren en su aspecto de dependencia hacia el factor V, es por ello que se la considera como una bacteria dependiente e independiente del factor V (Nørskov-lauritsen, 2014). Del mismo modo, para diferenciarlo de los géneros correspondientes como *A. actinomycetemcomitans* y *A. segnis* se debe integrar pruebas fenotípicas específicas, las cuales se las detalla en la figura 4.

*H. aphrophilus* es decir el género de *A. aphrophilus* que no depende del factor V, crece en agar chocolate en un ambiente con 10% de CO<sub>2</sub> durante un periodo de 24 horas; si su requerimiento de CO<sub>2</sub> no está presente, se da un crecimiento de colonias tanto pequeñas como grandes. De igual manera, *H. paraphrophilus* es decir el género de *A. aphrophilus* que depende del factor V, tiene los mismos requerimientos nutricionales para su crecimiento y las dos cepas no dependen del factor X (Staley et al., 2005).

Por otra parte, *A. segnis* anteriormente denominada *Haemophilus segnis*, crece en agar chocolate y tiene un desarrollo demasiado lento, se la observa en un periodo de 48 horas, su fermentación es retardada por lo que se reportan como levemente positivas o incluso negativas (Staley et al., 2005). Adicionalmente, dependen del factor V y se le debe incorporar un cierto porcentaje de CO<sub>2</sub>. Esta bacteria se suele confundir continuamente con *H. parainfluenzae* biotipo V y su identificación fenotípica suele ser problemática (Nørskov-lauritsen & Kilian, 2006), cada prueba se las indica en la figura 4.

**Figura 4.**

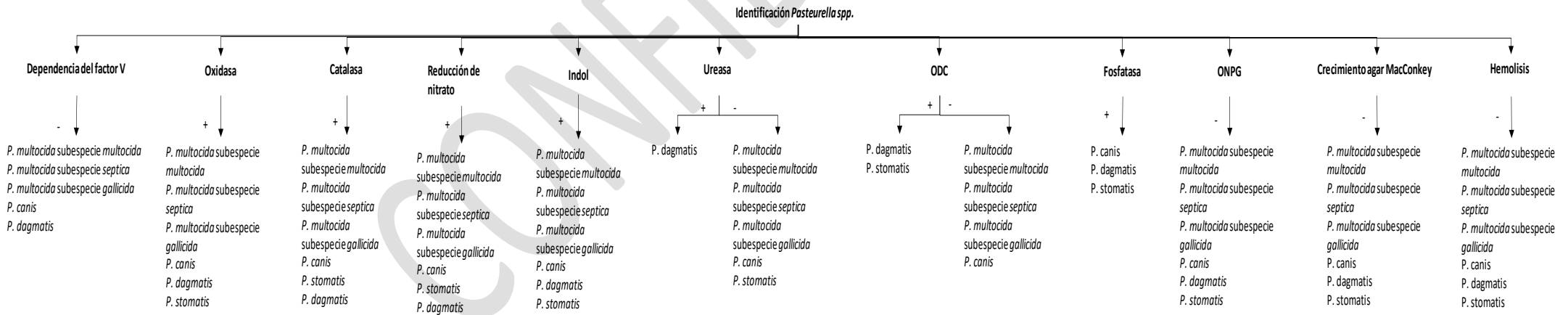
*Pruebas de identificación Aggregatibacter spp.*



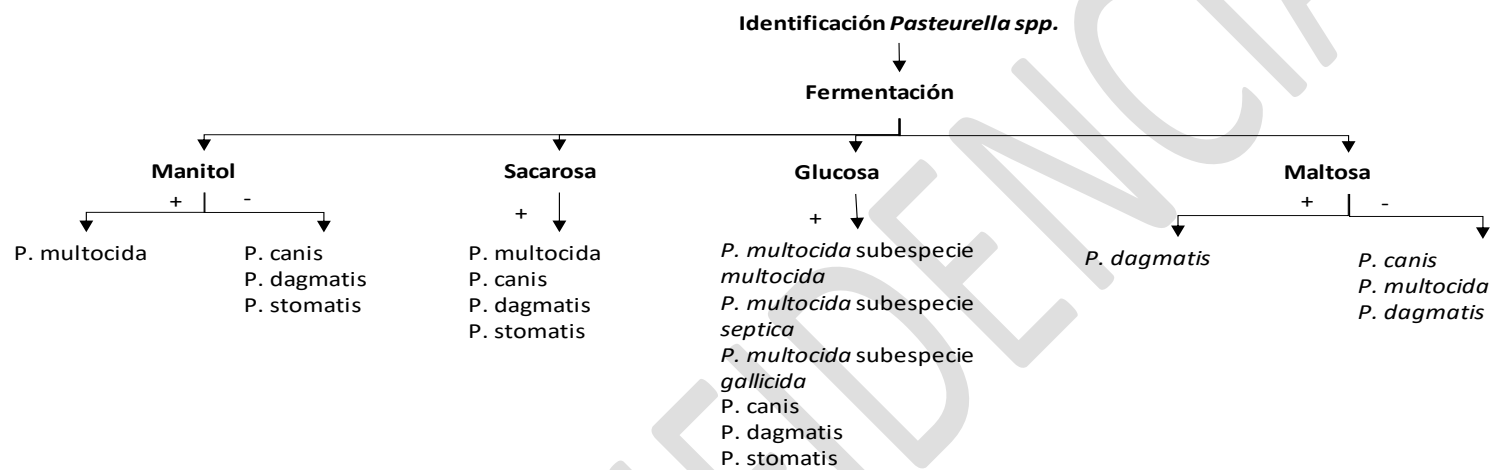
Nota: \* significa variable; Datos obtenidos de Staley et al., (2005) y Washington et al., (2008). Elaborado por Calero (2021)

**Figura 5.**

*Pruebas de identificación Pasteurella spp.*



Continua...



Nota: Datos obtenidos de Staley et al., (2005) y Washington et al., (2008). Elaborado por Calero (2021)

### 1.3. Resistencias intrínsecas de *H. influenzae*

La bacteria contiene algunas alteraciones que logran ser evidentes al disminuir la sensibilidad de los antibióticos, se los clasifica en resistencias intrínsecas y adquiridas, entre las resistencias intrínsecas encontramos a las lincosamidas, glucopéptidos, lipoglucopeptidos, oxazolidionas, ácido fusídico, macrólidos que contengan 16 átomos de carbono, cepas con sensibilidad disminuida hacia las cefalosporinas de primera generación, cetólidos, macrólidos de 14 a 15 carbonos y estreptograminas. En cuanto a las resistencias adquiridas, se dan en torno a antibióticos como los betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas, rifampicina, quinolonas y trimetoprim (Calvo, Cantón, Fernández, Mirelis, & Navarro, 2011) y (EUCAST, 2022). Su distribución se explica detalladamente en la tabla 6.

**Tabla 6.**  
*Resistencia intrínseca y adquirida en H. influenzae.*

Tipo de resistencia	Antibiótico
Resistencia intrínseca	Resistencia de alto nivel: Oxacilina, mecillinam, cefsulodin, lipoglucopeptidos y glucopéptidos, lincosamidas y macrólidos, ácido fusídico, linezolid, nitroimidazoles y bacitracina
	Resistencia de bajo nivel: macrólidos, cetólidos y estreptograminas.
Resistencia adquirida	Betalactámicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, tetraciclinas, gliciliclinas, sulfonamidas, trimetoprim, cloranfenicol, rifampicina, aminoglucósidos y fosfomicina

Nota. Datos obtenidos de Courvalin (2010) Elaborado por: (Calero, 2022)

### 1.4. Epidemiología de la familia *Pasteurellaceae* a nivel mundial

En la actualidad existen muchos microorganismos que presentan alteraciones en su sensibilidad y resistencia, que no solo es a nivel hospitalario sino también comunitario. La Organización Mundial de la Salud (OMS), menciona que este proceso resulta ser una de las tres amenazas más importantes de mortalidad, por ende, el aumento constante de las resistencias antibióticas disminuye las posibilidades de una terapia efectiva. Además, las infecciones que contengan bacterias multirresistentes, obtienen una mayor incidencia que otros microorganismos con una sensibilidad leve y como consecuencia existen sistemas económicos afectados a nivel mundial, puesto que se estima una pérdida aproximadamente de USD 100 billones (Munita & Arias, 2016).

En torno a aquello, es significativo entender los procesos de resistencia y aparición epidemiológica de las bacterias que pueden o no ser oportunistas, como es el caso de la familia *Pasteurellaceae*, donde uno de sus principales microorganismos es *H. influenzae*, visto que se ha observado aún registros sobre su presencia en poblaciones no vacunadas y en menores de edad, a pesar de que existe un gran uso de su vacuna Hib a nivel mundial (Courvalin, 2010). Es trascendental mencionar que, al disminuir la incidencia de *H. influenzae* tipo b en la población, se tiende a manifestar mayor cantidad de procesos patológicos por *H. influenzae* no capsulados (Murray et al., 2013). De la misma forma, Jorgensen et al. (2015) afirma que las cepas *H. influenzae* tipo b puede encontrarse tanto en niños como en adultos que sufren traumatismos craneoencefálicos, derrames de líquido cefalorraquídeo (LCR) o posterior a un procedimiento neuroquirúrgico.

Murray et al. (2013) afirma que los pacientes que presentan meningitis por la cepa *H. influenzae* tipo b se asocia su causa a la producción de PRP, de allí la importancia de adquirir una inmunidad que mantenga la presencia de anti-PRP, sea por medio de vacunación, adquisición materna o infección natural. Además, las cepas de *H. influenzae* productoras o no de cápsulas, suelen obtener otro factor de virulencia que es la producción de proteasas de inmunoglobulina IgA1, la cual confiere al microorganismo una mejor colonización de las superficies mucosas y disminuye la inmunidad humoral del paciente. De igual manera, *H. influenzae* contiene un lipooligosacárido lípido A, que se encarga de producir inflamación meníngea en los animales, aquello es importante debido a que se presume que este factor puede ser reproducible en el ser humano.

Según Pardo (2008), *H. influenzae* obtienen un alto grado de resistencia hacia ampicilina o amoxicilina, debido a que los datos asociados en el programa de vigilancia antimicrobiana de SENTRY realizado en los años 1997 a 2001, describe a Latinoamérica con un porcentaje de resistencia hacia *H. influenzae* de 16,3%. Donde los países con mayor prevalencia son Ecuador, El Salvador y Nicaragua.

Conforme con aquello, también se encuentra *H. ducreyi*, causante de infecciones por transmisión sexual y enfermedades cutáneas no sexuales en niños. Aquella cepa usualmente se aísla en patologías que contengan úlceras genitales en lugares como América Latina, África, Este y Sudeste Asiático (Washington et al., 2008). Su diagnóstico clínico es muy complicado, debido a que el examen clínico en sí puede ser confundido con otras enfermedades de transmisión sexual como el herpes genital y gonorrea. El

cultivo de esta bacteria, es complejo y se prefiere realizar sus reportes con pruebas de amplificación de ácido nucleico (PCR).

En la época de 1988 a 2010 se informan reportes de niños y adultos con lesiones cutáneas a causa de consecuencias no sexuales que son similares al chancro, en los extremos inferiores de las piernas y ninguna en los genitales por *H. ducreyi* (González-beiras, Marks, Chen, Roberts, & Mitjà, 2016). Sin embargo, *H. ducreyi* no es considerada la razón más común de ulceración en la piel por motivos no sexuales, debido a que posiblemente su aislamiento es complicado y las pruebas serológicas no se implementan en muchos aspectos. De acuerdo a esta información, existen reportes en Papúa Nueva Guinea, que notifican la formación de pian en niños con rangos de edad de 5-15 años del año 2013, donde informa que más del 7% de los niños padecen una infección cutánea y a su vez también se notifica la presencia de *Treponema pallidum subespecie pertenue* y una aparente coinfección de ambos organismos (Mitjà, Lukehart, Pokowas, Moses, Kapa, Godornes y Bassat, 2014).

Respecto a la formación de chancros blandos de *H. ducreyi*, existe una cierta confusión a la hora de diagnosticarlo, dado que en enfermedades como sífilis tiene lesiones primarias similares con bordes totalmente irregulares y plegados con poca demarcación. Por otro lado, en países subdesarrollados se evidencia que la bacteria tiene una asociación directa con el virus de la inmunodeficiencia humana sea de tipo 1 como 2 (Washington et al., 2008).

En base a aquella información, de acuerdo con estudios como González-beiras et al. (2016), señalan que la presencia de *H. ducreyi* ha disminuido en los años 1991 a 2000, a causa de que la OMS promovió el correcto manejo de su tratamiento e implementación de anticonceptivos tipo barrera, por ello en sitios como África, Asia y América Latina disminuyeron su prevalencia al manejar programas de cuidado sexual. Sin embargo, a raíz de eso se prueba una mayor incidencia y prevalencia del virus herpes genital, pero a pesar de contar con toda esta información los reportes no exhortan la existencia de pacientes que contengan un reservorio de *H. ducreyi*.

En otra instancia, muchos artículos comparan la presencia de gonorrea y chancroide en la población adulta, puesto que en la última década *Neisseria gonorrhoeae* ha aumentado su incidencia en países de desarrollo, pero disminuye progresivamente en países

industrializados que a diferencia del chancro provocado por *H. ducreyi* contiene muy poca incidencia y se reporta pocos casos alrededor del mundo (Ison, Dillon, & Tapsall, 1998).

En cuanto a *H. parainfluenzae*, se sabe que se lo puede aislar en alteraciones como endocarditis y bacteriemia (Abotsi, Govinden, & Essack, 2017). Prescindiendo de esto, en Suiza se ha justificado lo contrario, pues en una investigación donde se incorporaron a 2 pacientes hombres homosexuales, reportaron este microorganismo como un causante patológico en su uretra (Tinguely, Seiffert, Furrer, Perreten, Droz y Endimiani, 2013).

Como punto aparte en base a las resistencias antibióticas, dentro los años 2017 al 2018, se da a conocer un estudio en Camerún África, donde reconocen que existen especies predominantes como *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*, sin embargo, también se incorporan cepas como *H. haemolyticus* que es considerado un microorganismo con algunas resistencias. La población de estudio son pacientes que contiene infecciones en el tracto respiratorio superior y allí se aíslan de forma molecular los microorganismos, encontrando así 73 bacterias de *H. influenzae*, 15 de *H. haemolyticus*, 6 de *H. parainfluenzae* y 1 de *Actiobacillus porcitonisillarum*. De las 15 cepas de *H. haemolyticus*, 14 son resistentes a ampicilina con una mutación en el gen *ftsI*, también presentan una enzima denominada cloranfenicol acetiltransferasa, la cual le confiere resistencia bacteriana. Por otro parte, en las quinolonas se observaba una resistencia ante una mutación en la porción S84L y finalmente 1 de sus aislados presenta resistencia en rifampicina sin ninguna mutación aparente (Tchatchouang, Nzouankeu, Hong, Terrade, Denizon, Deghmane y Taha, 2020). Es decir, puede que en la actualidad los antibióticos que deban ser estudiados con mayor importancia en *H. haemolyticus*, sea ampicilina, cloranfenicol, quinolonas y rifampicina.

Partiendo de aquello, otra especie de la familia *Pasteurellaceae* que afecta al ser humano es *Pasteurella spp.*, esta se presenta en la microbiota oral de los animales e ingresa como patógeno en el ser humano por lesiones o mordeduras. Una de sus principales infecciones sintomáticas es la pasteurelosis y su incidencia se encuentra en torno a las posibles complicaciones de heridas provocadas por animales. Es importante decir que, las cepas patógenas causantes de pasteurelosis con mayor prevalencia en el ser humano son *P. multocida* y *P. canis*, las mismas que mantiene un porcentaje de mortalidad del 25% al 30% a nivel mundial y su valor de bacteriemia en la población es del 40% al 63%, pero si existe afecciones neurológicas se establece un porcentaje del 17% al 29%. Agregando

a lo anterior, se hallan posibles casos de meningitis en neonatos, sin embargo, su trascendencia en estos pacientes no es por transmisión vertical, ya que es considerado como poco probable y su propagación principalmente ha sido de persona a persona (Wilson y Ho, 2013).

Para concluir, en *Aggregatibacter spp.*, se encuentran especies prevalentes como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, la cual provoca diversas enfermedades, como la periodontitis que con un largo avance forma endocarditis, es por ello que se la clasifica en el grupo HACEK. La bacteria consta de varios serotipos como a,b,c,d,e y f, entre estas un 3% al 8% puede que no sean de fácil identificación y el serotipo más característico es el de tipo b, forma una sintomatología totalmente agresiva al contener una leucotoxicidad elevada. Existen un gran número de pacientes que presentan este tipo de bacteria en países como Estados Unidos, Finlandia y Brasil. Además, se ha llegado a observar la presencia del serotipo c en países como China, Japón, Tailandia y Corea del Sur (Chávez y Campos, 2017).

## **2. LECTURA INTERPRETATIVA DEL ANTIBIOGRAMA**

### **2.1. *Haemophilus spp.***

#### **2.1.1. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos**

Las resistencias en *Haemophilus spp.* se basan en alteraciones puntuales que modifican la acción antibiótica de betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol entre otros y pueden ser observables o no, dentro de procesos fenotípicos como la prueba de difusión en disco.

Como se indica, la bacteria contiene diversos mecanismos de resistencia. Entre los betalactámicos se destacan 2 tipos: el primero presenta alteraciones enzimáticas que conllevan a la producción de betalactamasas de tipo TEM-1 y TEM-2 o ROB-1, mientras que la segunda es provocada por la modificación en el gen *ftsI*, el cual altera considerablemente a su PBP3 (Calvo et al., 2011). Es así que, de allí nacen resistencias conocidas como  $\beta$ -lactamasas positivas, resistentes a la ampicilina (BLPAR),  $\beta$ -lactamasas negativas, resistentes a ampicilina (BLNAR) y  $\beta$ -lactamasas positivas resistentes a amoxicilina-clavulanato (BLPACR). Además de aquello, la resistencia tipo TEM-1 es mucho más prevalente que la de ROB-1, ya que el último se encuentra mayoritariamente en Gram positivos que en Gram negativos (Courvalin, 2010).

La cepa BLNAR es muy rara de identificar, pero en Japón se informa una gran incidencia, debido al aumento de patrones específicos que contienen sustituciones en los aminoácidos de la proteína unión a penicilina 3 (PBP3), los cuales se subdividen en grupos como I, IIa, IIb, IIc, IId, III y III- like. Por lo tanto, los cambios en la susceptibilidad bacteriana de *H. influenzae* depende del sitio estratégico en el que se encuentren (Bae, Lee, Lee, Kim, Lee, Yu y Kang, 2010). Así mismo, Calvo et al. (2011) evidencian que en países como Japón, España y Francia obtienen una gran prevalencia de esta cepa, entre sus hipótesis que pueden justificar el aumento de las cepas BLNAR en Japón, es el gran uso de cefalosporinas como cefdinir y cefditoren en procesos que pueden ameritar solo antibióticos de menor complejidad.

Los BLNAR al contener una gran cantidad de modificaciones genéticas que alteran la función del PBP3 y aumentan considerablemente la carga de resistencia antibiótica prevista, forman motivos KTG y SSN que contiene ciertas sustituciones en sus aminoácidos, aquello se detalla en la tabla 7. De esta forma, sucede con los genes reguladores de la bomba AcrAB, su mutación es poco usual, pero al obtener una hiperexpresión, desarrolla un nivel de resistencia mucho más elevado hacia ampicilina a comparación de las cepas BLNAR que contienen PBP3 alterados. (Calvo et al., 2011).

Es conveniente destacar que, de acuerdo con Courvalin (2010), cuando una cepa contiene una resistencia de ampicilina  $> 1 \mu\text{g/mL}$  es de tipo BLNAR o low- BLNAR e indican resistencias hacia amoxicilina-clavulanato, ampicilina-sulbactam, cefalosporinas de primera y segunda generación. Cabe mencionar que, esta cepa contiene afinidades específicas dentro de sus niveles de acción pertenecientes a los PBPs, por lo que esto explica el tipo de sensibilidad que obtiene, ya que antibióticos como las cefalosporinas actúan en contra del PBP3 y la ampicilina ejerce su efecto en las porciones como PBP1 y PBP4. Conforme a los tipos de resistencias, cada variación es significativa, puesto que pueden llegar a formar un aumento extremo en las CMIs de cefalosporinas de tercera generación como: cefotaxima y cefixima (Calvo et al., 2011).

**Tabla 7.***Modificaciones en motivos KTG y SSN en cepas BLNAR.*

Motivos	Sustituciones de aminoácidos	Antibiótico alterado	Tipo de Fenotipo	Grupo	CMI de ampicilina
Ninguno	Ninguno	Ninguno	BLNAS	Ninguno	0,12 µg/mL
KTG	Asn526-Lys Arg517-His	Resistencia moderada hacia cefotaxima	Low-BLNAR	Grupo I y II	0,5 a 2,0 µg/mL
SSN	Met377-Ile Ser385-Thr Leu389-Phe	Resistencia 60 veces más elevada hacia cefotaxima	BLNAR	Grupo III	1 a 16 µg/mL

Nota. Datos tomados de Courvalin, (2010) y Calvo et al., (2011). Elaborado por Calero, (2022)

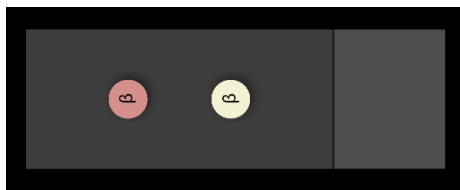
*\*BLNAS: Betalactamasa negativa, ampicilina sensible /Low-BLNAR: Bajo nivel de betalactamasa negativa, ampicilina resistente/ BLNAR: Betalactamasa negativa, ampicilina resistente*

Las resistencias por causa enzimática en *H. influenzae*, es decir la producción de betalactamasas contienen dos tipos prevalentes TEM-1 y ROB-1. La de tipo TEM-1, contiene alteraciones específicas en función a un promotor genético del ARN polimerasa, provocando que existan diferentes afinidades en su síntesis y cambios en el proceso de acción en antibióticos como amoxicilina- ácido clavulánico y cefalosporinas de segunda generación (Calvo et al., 2011). Conforme a su epidemiología, en Corea del Sur se informa que la existencia de TEM-1 se da un 94,7%, mientras que ROB-1 es de un 3,2%. De igual manera, la prevalencia hacia la producción de  $\beta$  – lactamasas en Alemania es del 3% mientras que en Corea del Sur se calcula su presencia en un 65% (Bae et al., 2010).

Las cepas BLPAR son pertenecientes a estas clases de alteraciones, por lo que evitan la acción tanto de amoxicilina como de penicilina y tienden a ser susceptibles ante inhibidores como ácido clavulánico y tazobactam, a su vez no manifiestan su inactivación en cefalosporinas de segunda y tampoco de tercera generación. Dentro de las recomendaciones de diagnóstico para este tipo de cepas, es que se corrobore su presencia con pruebas cromogénicas como de nitrocefina (Courvalin, 2010), en la figura 6 se puede apreciar el resultado de la prueba.

## Figura 6

### Prueba de nitrocefina



Nota: Positividad cuando el disco se tiñe rojizo, negativo cuando el disco no se tiñe.

Acerca de las cepas BLPACR, se han realizado búsquedas en Corea del Sur, dentro de los años 2005 y 2006, con un total de 544 pacientes que contienen la cepa y llegaron a concluir que los resultados de CMI en ampicilina son mucho más elevados que las de tipo BLNAR y BLNAS. Por lo tanto, para identificar y diferenciar las cepas BLPACR con las de tipo BLNAR, se debe visualizar una resistencia de ampicilina mucho más elevada. De igual manera, en la investigación se indica la presencia de cepas como *H. influenzae* no tipificables BLPAR con resistencia de tipo TEM-1, donde también residían un 7,4% de la población total con cepas encapsuladas de *H. influenzae*, de ellos 16 eran de tipo a, 2 de tipo b, 2 de tipo c, 8 de tipo d, 6 de tipo e, 6 de tipo f y el porcentaje restante es decir el 92,6% eran NTHi (Bae et al., 2010).

En Portugal, igualmente se ha estudiado la presencia de resistencias en *H. influenzae* tomando en cuenta un total de muestras de 240 entre los años 2001 y 2008, aquí se reporta posibles alteraciones tanto en la acción de cefotaxima como de cefepima y revelan que entre sus procesos de estudios, 2 aislados BLNAR mantenían un CMI de cefotaxima de 1 mg/dL y otros 6 donde 5 eran BLNAR y 1 BLPACR, contenían una CMI de cefepima con 1 mg/L, es decir estas cepas presentan resistencia en cefalosporinas tanto de tercera como de cuarta generación conforme a los puntos de corte de EUCAST (Barbosa, Giufrè, Cerquetti, & Bajanca-Lavado, 2011). Esto se explica con la existencia de procesos de afinidad hacia los PBP, por lo que la cepa al adquirir mutaciones elevadas hacia PBP3 puede que su reporte este en base a alteraciones en la acción de penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación como la cefotaxima y cefixima (Calvo et al., 2011).

Hay que resaltar que en *H. influenzae* no solo existe resistencia adquirida a nivel de los betalactámicos, sino también en otro tipo de antibióticos como los carbapenémicos,

fluoroquinolonas, tetraciclinas, glicilciclinas, sulfonamidas, cloranfenicol, macrólidos, cetólidos, estreptograminas, rifampicina, aminoglucósidos y fosfomicinas, que se los explica detalladamente más adelante en la sección sobre la identificación de los fenotipos de resistencia (Courvalin 2010).

En cuanto a *H. parainfluenzae*, de acuerdo a algunos reportes forma también parte del grupo HACEK, puesto que son bacterias consideradas como complicadas, exigentes y provocan enfermedades como endocarditis y bacteriemia. Este microorganismo también puede ocasionar otro tipo de enfermedades como celulitis, miositis, meningitis entre otras. Es por ello que se debe identificar los posibles mecanismos de resistencia en *Haemophilus spp.* que se definen en la tabla 8 (Abotsi et al., 2017).

**Tabla 8.**

*Mecanismos de resistencia bacteriana en Haemophilus spp.*

Mecanismo de resistencia	Mecanismos
<b>β- lactámicos</b>	Producción de enzimas
	Cambio de permeabilidad en la membrana externa por modificación de porinas
	Cambio de PBP's
	Bombas de eflujo
<b>Macrólidos</b>	Eflujo <i>mef</i> (A) y <i>msr</i> (D)
	Sustitución de Ala69Ser en la proteína L4
	Gen <i>ErmB</i> codificante de metilasas
	Sustituciones en proteína ribosómica L22 y rRNA 23S
<b>Tetraciclinas</b>	Producción enzimática
	Mutaciones en ARNr
	Bombas de eflujo
	Producción de proteínas protectoras ribosómicas como Tet (T), Tet (S), Tet (Q), Tet (B), Tet(W), Tet(O), Tet(M) y OtrA
<b>Quinolonas</b>	Sustituciones en aminoácidos de genes como <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> y <i>parE</i>
	Alteraciones causadas por plásmidos
<b>Cloranfenicol</b>	Producción de enzima acetiltransferasa CatS codificada por el gen <i>cat</i>
<b>Aminoglucósidos</b>	Eflujo activo
	Escasa en permeabilidad de membrana externa
	Mutaciones en moléculas diana
	Inactivación enzimática: fosfotransferasas, acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas

<b>Inhibidores del metabolismo del ácido fólico</b>	Vías metabólicas alternativas
	Impermeabilidad de pared celular
	Enzimas de origen cromosómico resistente y susceptible
	Enzimas resistentes a inhibidores de origen plasmático.

*Nota.* Datos tomados de Abotsi et al., (2017). Elaborado por: Calero, (2021).

*H. parainfluenzae* contiene diversas resistencias hacia los  $\beta$ -lactámicos, allí se encuentran la producción de enzimas como las  $\beta$ -lactamasas que se debe a la presencia de plásmidos alterados, entre ellas se halla las de tipo TEM-1, TEM-15, TEM-34 y TEM-182. Al igual que *H. influenzae*, la bacteria presenta algunas mutaciones que alteran los aminoácidos de su PBP3. En el caso de los macrólidos, *H. parainfluenzae* contiene resistencias causadas por eflujos *mef* (A) y *msr* (D), del mismo modo, se ha identificado mutaciones en su proteína L4 y codificaciones de metilasas por parte del gen *ErmB*, que no solo confiere resistencia hacia los macrólidos sino también a las azalidas y cetólidos (Abotsi et al., 2017).

Existen otros antibióticos como las tetraciclinas, que en *H. parainfluenzae* producen cierta resistencia a causa de la producción de proteínas protectoras ribosómicas como *Tet* (M), *Tet* (B), *Tet* (C) y *Tet* (D). En cuanto a las quinolonas, se da su alteración en ciertas sustituciones de aminoácidos en genes como *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, incluso se ha evidenciado que existen genes de resistencia que son incorporados por plásmidos que alteran la acción de este antibiótico como el gen *aac* (6')-*lb-cr*. El cloranfenicol, obtiene resistencia en la bacteria por parte del gen *cat*. Existen transposones específicos que confieren al microorganismo resistencia a través de plásmidos para sulfonamidas y trimetoprim, ya que, por parte de las sulfonamidas, se presenta con mayor intensidad el gen cromosómico *folP* que favorece una acción reducida antibacteriana (Abotsi et al., 2017).

Hay reportes de pacientes con infecciones causadas en uretra por *H. parainfluenzae*, lo interesante de estas cepas es que tienen un alto grado de resistencia, por lo que no fueron susceptibles a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefotazima, cefepima, meropenem, cefuroxima, azitromicina, ciprofloxacina, tetraciclina y cloranfenicol. En sus estudios moleculares se hallaron colonias con alteraciones en aminoácidos específicos, que provocaron mutaciones en el PBP3, L4, *gyrA*, *parC* y manifiestan resistencias de tipo

*mef* (A), *Tet* (M) y *CatS*. De igual manera, la investigación definió a las cepas como posibles bacterias multirresistentes a causa de su asociación entre quinolonas, macrólidos, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclinas y cloranfenicol (Tinguely et al., 2013).

En Polonia entre los años 2013 al 2015 se realizó un estudio de 87 pacientes, donde 61 formaban parte del control y 26 tenían enfermedades crónicas como cáncer de pulmón y leucemia linfocítica crónica. En su reporte se comparó, además, la efectividad tanto del CLSI como de EUCAST, con la finalidad de informar sobre los tipos de resistencia bacteriana hacia *H. parainfluenzae* y verificar nuevos mecanismos. Dentro de los puntos de corte EUCAST proponen aislados de tipo  $\beta$  lactamasas positivas, sensibles a ampicilina (BLPAS) con un total de 42,5%,  $\beta$  lactamasas negativas, sensibles a ampicilina BLNAS con un 20,7% y BLPACR con un 19,5%. Sin embargo, la CLSI propuso un nuevo fenotipo en esta población, denominado  $\beta$  lactamasa negativa, cefinasa negativa, ampicilina intermedia (BLNAI) que mantiene un porcentaje de 2,3% y también se añadió otro tipo denominado  $\beta$  lactamasa positiva, cefinasa negativa, ampicilina intermedia (BLPAI) con un valor de 3,4%. De igual manera, sucedió con el fenotipo  $\beta$  lactamasa positiva, cefinasa positivo, resistente a más de uno de los betalactámicos como bencilpenicilina, ampicilina, cefalosporinas y carbapenémicos (BLPBR) que se encuentra en un 2,3%, este fenotipo se incorporó por parte de los puntos de corte en EUCAST. Aparte de ello, de acuerdo con el CLSI, los pacientes con enfermedades crónicas de esta población contienen una alta prevalencia de alteraciones por parte de  $\beta$  - lactamasas, aquello es importante, ya que su control terapéutico en este nivel geográfico debe ser arduo hacia *H. parainfluenzae* (Kosikowska, Andrzejczuk, Grywalska, Chwiejczak, Winiarczyk, Pietras-Ożga y Stępień-Pyśniak, 2020).

Conforme a lo descrito, los cambios en los rangos de sensibilidad y resistencia por parte de las guías básicas como el CLSI y EUCAST pueden significar una cierta modificación en los reportes diagnósticos. El CLSI en los años 2016 al 2020, solo implementa una variación de su sensibilidad hacia la cefuroxima en *Haemophilus spp.*, pero por parte de EUCAST 2020 si existe cambios evidentes en su punto de corte, como de ampicilina y amoxicilina- ácido clavulánico, esto conlleva a que existan mayor número de reportes en bacterias como BLPACR, y cepas multirresistentes (Kosikowska et al., 2020).

Por esa razón, EUCAST al tener grandes diferencias con el CLSI se considera como una guía que obtiene puntos de corte más estrictos y por ello ya no incorpora puntos

intermedios, sino más bien lo define como cepas susceptibles con mayor exposición desde el año 2019. Es así que, estos cambios por parte del CLSI no obtuvieron relevancia significativa, pero sí una mejora en análisis que contengan cepas resistentes a cefuroxima, mientras que en EUCAST mejora la evidencia de cepas que mantengan una cierta relación hacia los betalactámicos sea con o sin inhibidores, lo mismo sucede con los macrólidos, cloranfenicol, trimetoprim- sulfametoxazol. Muchos llegan a determinar que los puntos de corte en EUCAST ante la incorporación de amoxicilina- clavulánico tienden a ser más predictivos en un fallo terapéutico que el CLSI (Kosikowska et al., 2020).

Por último *H. ducreyi*, se la considera como complicada de observar, dado que su proceso de cultivo es muy exigente. Los estudios actuales sobre esta bacteria son muy escasos, pero se han detectado valores de susceptibilidad e influencia de antibióticos prospectos para su tratamiento en especial del chancro. En investigaciones concretas se describe que *H. ducreyi* contiene una alta susceptibilidad en antibióticos como cefalosporinas, eritromicina, quinolonas, rifampicina y espectinomicina. No obstante, también se revela presuntas resistencias hacia trimetoprima, tetraciclina y cloranfenicol; en el caso del último antibiótico, su resistencia es consecuencia de la producción de una enzima denominada cloranfenicol acetiltransferasa, mientras que por parte de la tetraciclina se ha verificado la disminución de sensibilidad por transformaciones específicas que se transmiten sea por plásmidos grandes o de forma cromosómica proveniente de una mutación en la porción Tet M. Estas alteraciones puede que impliquen un desbalance en la sensibilidad entre la misma especie (Dangor, Ballard, Miller, & Koornhof, 1990).

Estudios realizados en países como Sudáfrica, se hallan gran cantidad de cepas tipo *H. ducreyi* y reportan que muchas de estas especies son resistentes a penicilina, tetraciclina, sulfametoxazol y trimetoprima. Con respecto a la disminución de su sensibilidad, entre las principales causas se encuentra la transmisión de genes alterados sea de forma plasmídica como cromosómica. Debido a esto, se tiene que observar la eficacia terapéutica sea única como combinada en los pacientes, puesto que las dosis únicas de ceftriaxona, ciprofloxacina, azitromicina estreptomina y rifabutina son de gran utilidad hoy en día. Por otra parte, la combinación entre medicamentos como ceftriaxona con estreptomina y sulfametoxazol con trimetoprim son de gran eficiencia, a causa de que mejoran en especial el tiempo de curación hacia las lesiones del chancro, pero su excesivo uso no solo presenta resistencia, sino que también se encuentra en alteraciones como

ototoxicidad y nefrotoxicidad, inducido principalmente por la estreptomina (Roy-leon, Lauzon, Toye, Singhal, & Cameron, 2005).

En torno a lo mencionado, en *H. ducreyi* también incluye reportes de resistencia hacia a sulfonamida, cloranfenicol, estreptomina, kanamicina y trimetoprima a causa de transmisión plasmídica. Por consiguiente, en estas posibles resistencias se piensa en alternativas terapéuticas con azitromicina, dado que suele originar una sensibilidad considerable (Ison, et al. 1998).

*H. ducreyi* no solo forma parte de una enfermedad de transmisión sexual, sino que también tiene una gran facilidad de formar una sinergia patológica con el VIH. En evaluaciones epidemiológicas se analizan resultados de cepas extraídas en Sudáfrica y se encuentra que en su gran mayoría son resistentes a penicilinas, tetraciclinas, sulfametaxol y trimetoprima, todas ellas son adquiridas de forma plasmática o cromosomal. Se debe destacar que, *H. ducreyi* no solo puede adquirir una resistencia bacteriana si no que, al obtener una sinergia con otra enfermedad como VIH, disminuye su efectividad terapéutica con un porcentaje superior al 20%, sea en medicamentos como ceftriaxona, azitromicina, fleroxacina, ciprofloxacina, eritromicina y trimetropim-sulfametoxazol (Roy-leon, Lauzon, et al., 2005).

Conforme a las terapias implementadas para *H. ducreyi*, en Tailandia se informan un gran porcentaje de resistencias hacia tetraciclina, sulfonamida, kanamicina y trimetropima, a comparación de otros países (Prachayasittikul, Ronald, Robert, & Ronald, 2000). Dicho esto, es importante entender que las posibles causas se encuentran muchas veces en alteraciones genéticas, las cuales se representan en la tabla 9.

**Tabla 9.**

*Resistencias Haemophilus ducreyi.*

<b>Antibiótico</b>	<b>Genes</b>
Tetraciclina	<i>tet (M) y tet (O)</i>
B- lactamasas	<i>bla TEM</i>
Kanamicina	<i>aphA1</i>
Estreptomina	<i>strA-strB</i>
Sulfonamidas	<i>sul2</i>

*Nota.* Datos tomados de Kehrenberg, Walker, Wu, & Schwarz, (2006). Elaborado por: Calero, (2021)

### 2.1.2. Selección y disposición de discos para estudios de susceptibilidad antimicrobiana por el método Kirby Bauer

Como primera instancia se diferencian medios de cultivos propicios para el crecimiento de *Haemophilus spp.* entre el más recomendado se encuentra el HTM, pues contiene nutrientes que ayudan a su desarrollo y es recomendado por la CLSI para pruebas de antibiograma en método Kirby Bauer. Al contrario de los medios como Muller Hinton, no pueden utilizarse para este estudio, en razón de que no disponen requerimientos nutricionales especiales que ayuden a la bacteria a crecer correctamente, de igual manera sucede con el agar chocolate que, si bien se lo puede utilizar como una alternativa para observar cepas que no crecen en medios como HTM, sus puntos de corte no están estandarizados dentro de la CLSI y EUCAST (Courvalin,2010).

Es importante decir que, el laboratorio debe incorporar cepas control que garanticen y aprueben el buen funcionamiento de los métodos, en la tabla 10 se detallan los controles. Sin embargo, a pesar de la existencia de tantos controles, de acuerdo con Courvalin (2010), al implementar un medio de tipo HTM se sugiere sembrar cepas de *H. influenzae* ATCC 10211, que son susceptibles a ampicilina y necesitan tanto de hematina como de hemina para su crecimiento y también las cepas de *H. influenzae* ATCC 35056 que permite detectar de forma propicia las  $\beta$ -lactamasas.

**Tabla 10.**

*Cepas control que se deben usar según la CLSI y EUCAST*

Guía	Cepa	Característica
CLSI	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	Cepa BLNAR, resistente a tetraciclina.
	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	Cepa tipo salvaje ideal para observar betalactámicos como cefaclor, cefuroxima, cefamandol, cefonicid, cefpodoxima y loracarbef
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Ideal para pruebas de amoxicilina- ácido clavulánico.
	<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	Cepa que permite evidenciar si el medio HTM favorece en el crecimiento de todas las cepas <i>H. influenzae</i> .
	<i>H. influenzae</i> ATCC 35056	Produce Betalactamasas, útil en pruebas cromogénicas.
EUCAST	<i>H. influenzae</i> ATCC 9334	Cepa susceptible a antibióticos betalactámicos.

*Nota.* Datos tomados de Courvalin (2010), y Calvo et al. (2011). Elaborado por Calero, (2022)

Entre otros aspectos de calidad que se deben tomar en cuenta a la hora de realizar los antibiogramas de todas las bacterias, es la inclusión de medidas y posición exacta de cada antimicrobiano. Entre los estándares con mayor concurrencia en la actualidad es que los discos tienen que ser dispensados y distribuidos de manera equidistante, es decir con una separación mínima  $< 24$  mm. En cuestión a el número máximo de discos a colocar, depende mucho del tamaño de placa, puesto que si su medida es de 150 mm, el total de antimicrobianos en disco a ubicar es de 12, mientras que si se debe solo colocar una cantidad menor a 5 discos, el tamaño de placa es de 100 mm (CLSI, 2022).

Nota: Cada antibiograma estructurado en el capítulo, puede que contenga una cantidad menor de 5 discos en placas con tamaños predispuestos a 150 mm, la razón de su estructura es debido a fines de aprendizaje, ya que en placas de 100 mm muchas de las zonas de inhibición eran poco evidentes.

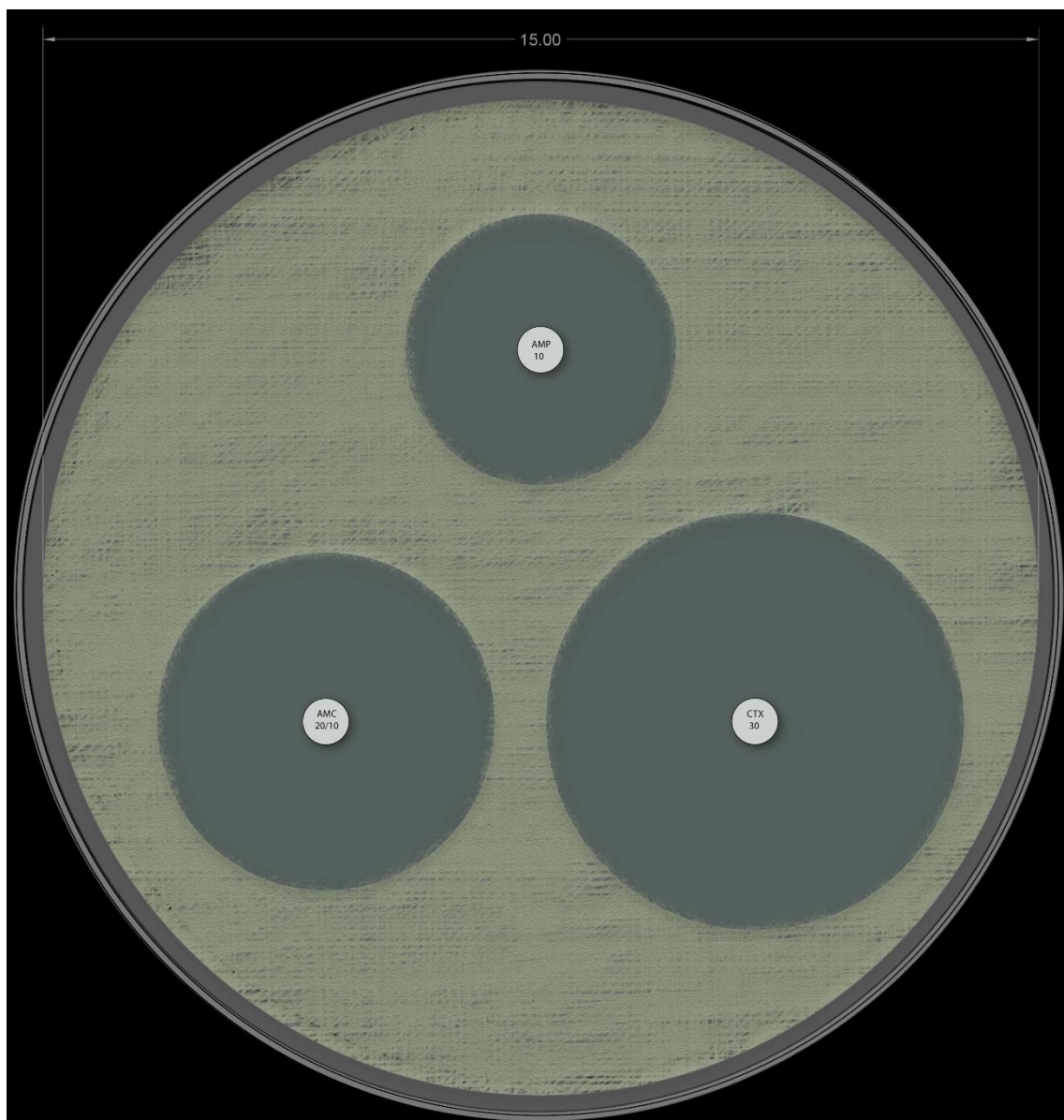
Teniendo en cuenta aquello, en cada especie de *Haemophilus spp.* se indica un fenotipo de resistencia específico que diferencia zonas de inhibición distintas y alteraciones determinadas. Entre las más mencionadas se encuentran:

a. *Resistencia BLPAR:*

Estas cepas obtienen una elevación en el CMI de ampicilina y en métodos como difusión en disco de acuerdo a los puntos de corte en el CLSI y EUCAST, su valor se observa como  $\leq 18$  mm. En cuanto a su sensibilidad, se encuentra en torno a los inhibidores y cefalosporinas tanto de segunda como de tercera generación. Sin embargo, si la cepa presenta modificaciones elevadas en resistencias tipo TEM-1, puede que sus resultados de inhibición varíen en aquellos antibióticos. De la misma manera, la cepa al contener un tipo de alteración ROB-1, el cefaclor puede observarse con un valor de resistencia mucho más elevado (Calvo et al., 2011). En base a la resistencia de ampicilina, la diferencia de cepas que son alteradas en el gen *ftsI* con las que producen  $\beta$  lactamasas, es que las últimas indican un nivel de resistencia a ampicilina de CMI  $\geq 4$ mg/L, mientras que las cepas que producen un gen *ftsI* modificado, contiene CMI de ampicilina  $\leq 2$  mg/L CLSI (Calvo et al., 2011). La correcta posición de los discos y su inhibición se encuentra en las figuras 7,8 y 9.

**Figura 7.**

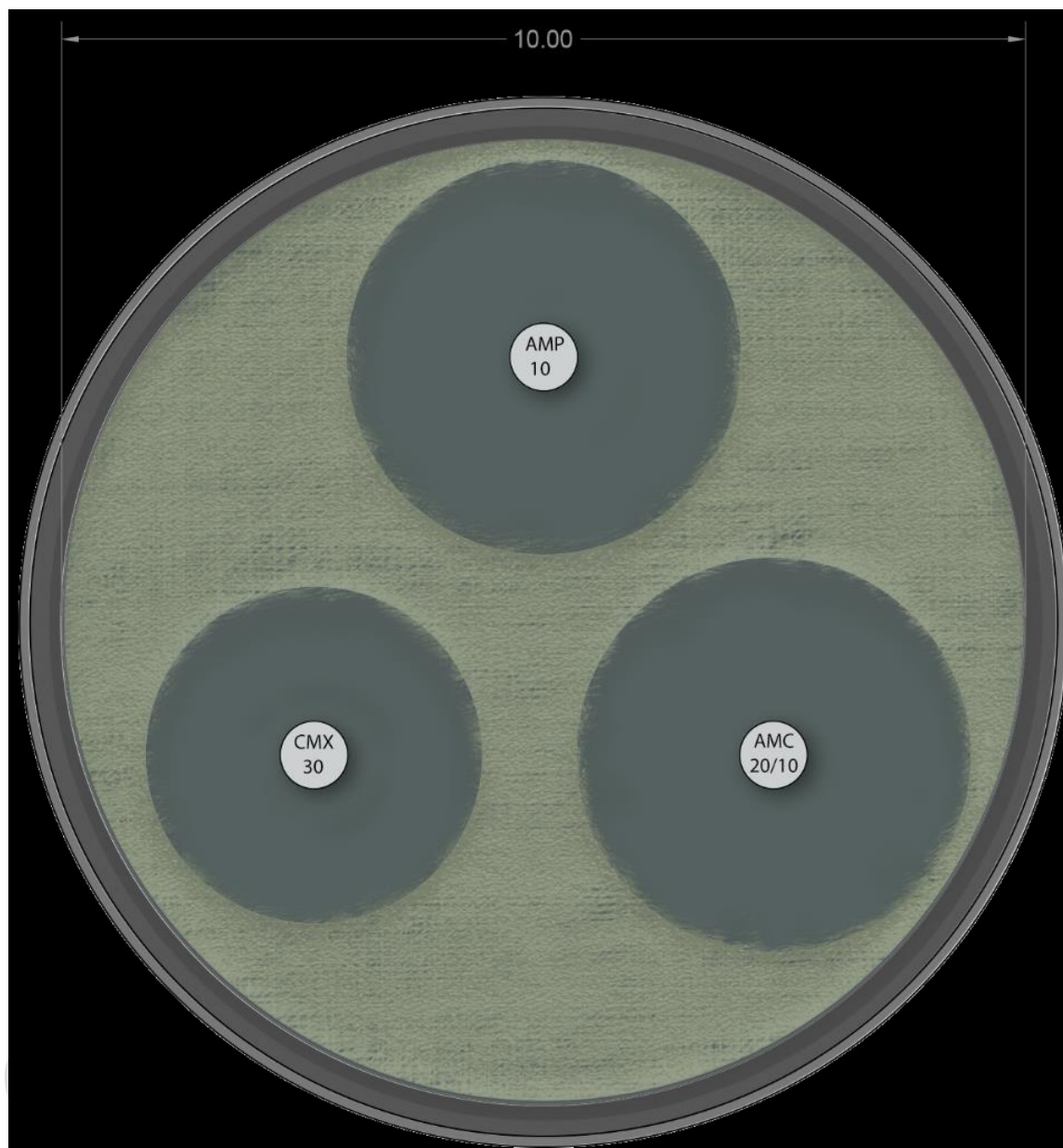
*Cepa BLPAR TEM-1*



Nota:AMP: Ampicilina de 10  $\mu$ g con 17 mm (Resistente); AMC: Amoxicilina-clavulanico de 20/10  $\mu$ g con 22 mm (Sensible); CTX:cefotaxima de 30  $\mu$ g con 28 mm (Sensible); tamaño de placa 100 mm

**Figura 8.**

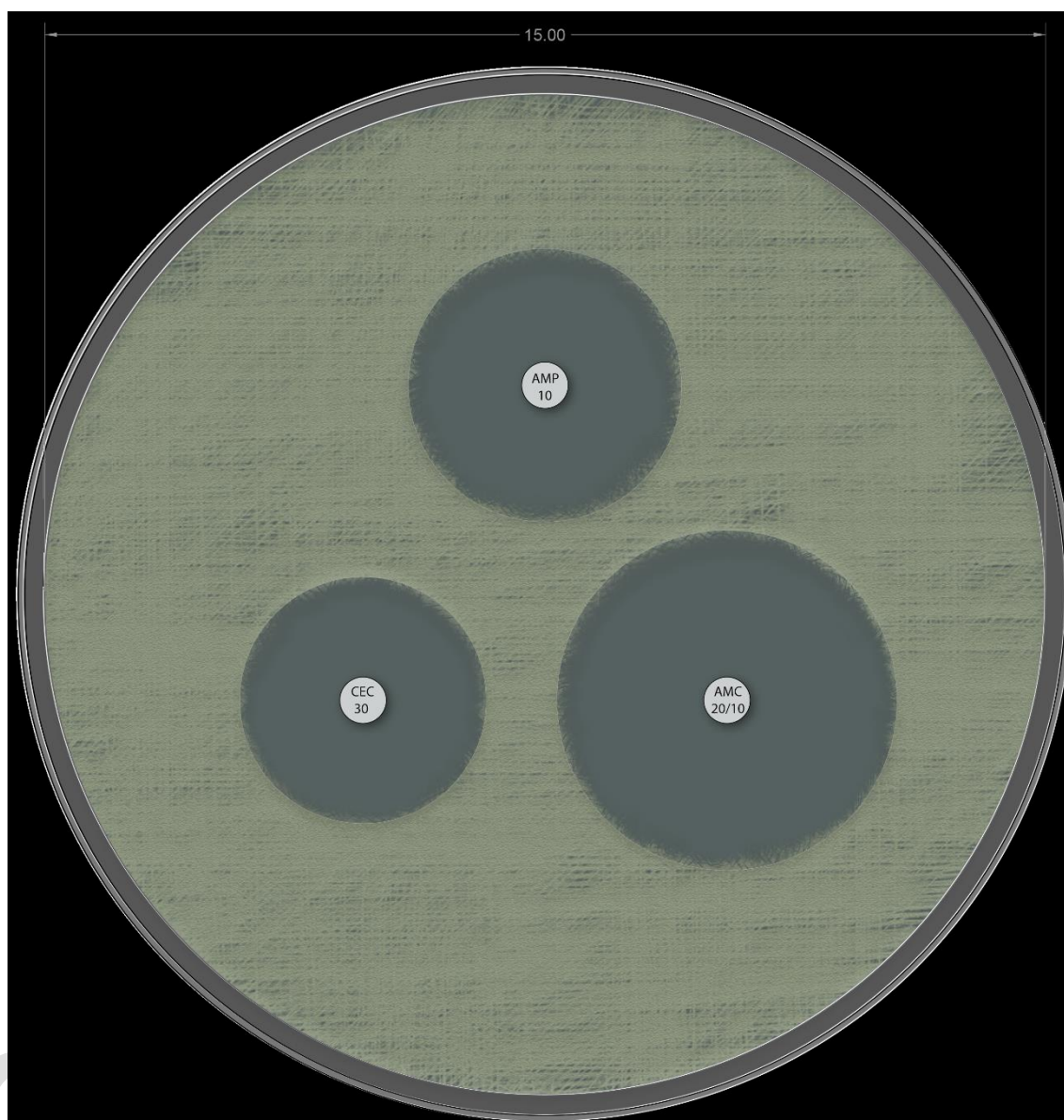
*Cepa BLPAR TEM-1 alterado8*



Nota: AMP: Ampicilina de 10  $\mu\text{g}$  con 17 mm (Resistente); AMC: Amoxicilina-clavulanico de 20/10  $\mu\text{g}$  con 17 mm (Resistente); CXM: Cefuroxima de 30  $\mu\text{g}$  con 14 mm (Resistente); Tamaño de la placa 100 mm.

## Figura 9.

Cepa *BLPAR ROB-1*



Nota:AMP: Ampicilina de 10  $\mu\text{g}$  con 17 mm (Resistente) ; AMC: Amoxicilina-Clavulanico de 20/10  $\mu\text{g}$  con 22 mm (Sensible) ; CEC: Cefaclor de 30  $\mu\text{g}$  con 14 mm (Resistente); Tamaño de la placa 100 mm

### b. Resistencia *BLNAR*

Se lo identifica cuando obtiene halos de inhibición disminuidos sobre todo hacia penicilinas y cefalosporinas tanto de primera como de segunda generación, es importante rescatar que *BLNAR* produce poca resistencia hacia los betalactámicos e inhibidores. En referencia a la disminución de sensibilidad en esta cepa, se aclara que puede observarse

resistencias a cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima y cefixima, al encontrar otras alteraciones en el gen *ftsI*. Ante la situación planteada, la cepa también puede conllevar alteraciones que demuestran la presencia de dos motivos KTG y SSN, el motivo KTG contiene mutaciones específicas y está conformado por grupos I y II; los mismos que integran sustituciones de aminoácidos definidos y son característicos de un bajo- BLNAR, el cual conlleva a una resistencia moderada hacia ampicilina y de igual forma presenta una mínima resistencia a cefotaxima. Adicionalmente, en el caso del motivo SSN a diferencia del KTG, obtiene una resistencia mucho más elevada hacia cefotaxima y ampicilina. (Courvalin, 2010).

Las cepas BLNAR que contengan un nivel de ampicilina  $> 1 \mu\text{g mL}$  se debe tomar en cuenta que puede ocasionar resistencia hacia amoxicilina-clavulanato, ampicilina-sulbactam y cefalosporinas tanto de primera como de segunda generación. En cambio, con respecto a una sobre expresión de resistencia hacia a la ampicilina, existen otras modificaciones que no son usualmente encontrarlas, pero puede que se presente y es la hiperexpresión de la bomba de expulsión activa (AcrAB) (Courvalin, 2010). Todas estas cepas se las observa en las figuras 10 y 11.

**Figura 10.**

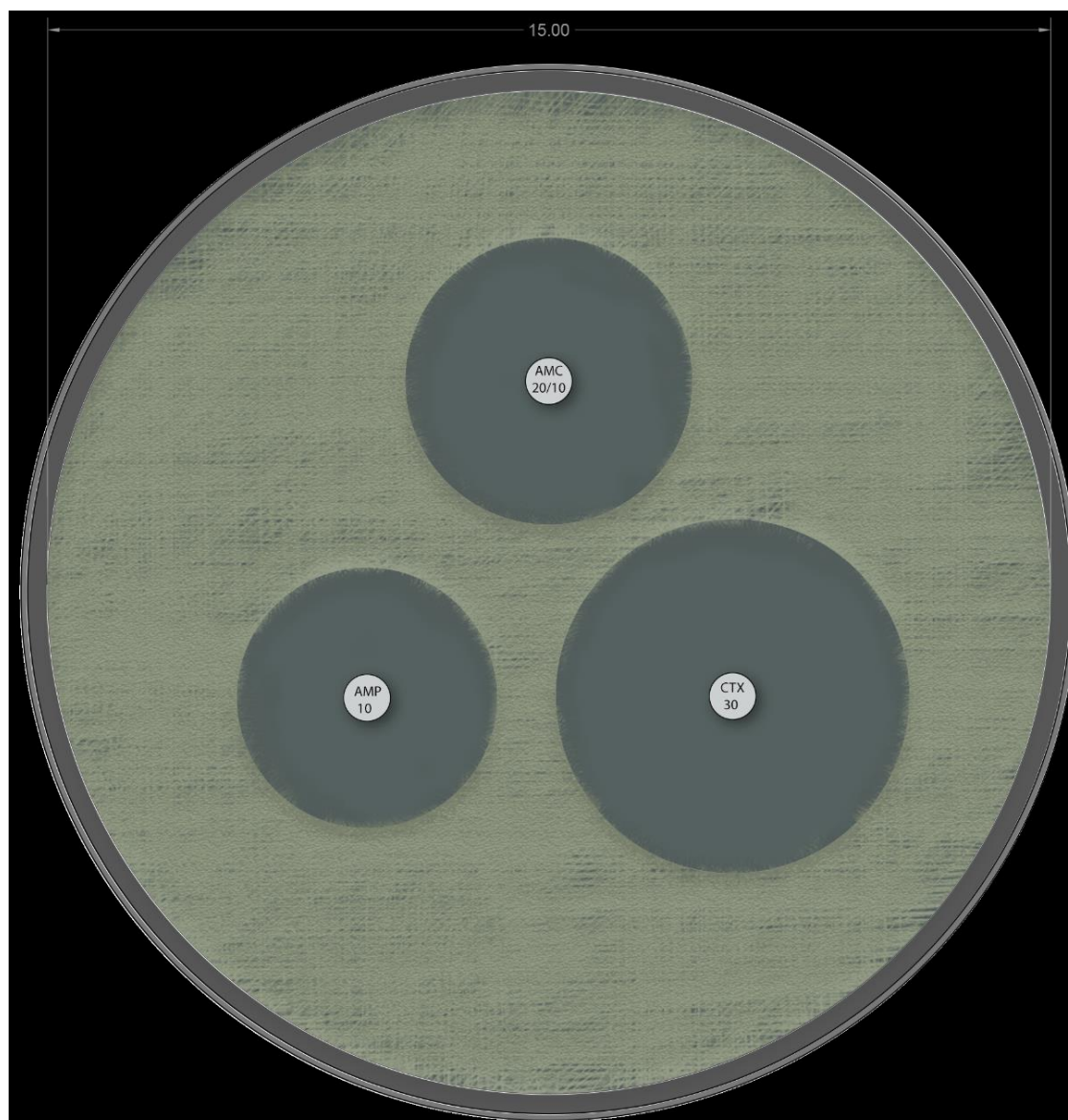
*Resistencia BLNAR motivo KTG*



Nota:AMP: Ampicilina de 10  $\mu$ g con 18 mm ( Resistente); CTX: Cefotaxima de 30  $\mu$ g con 25 mm (Resistente); Tamaño de placa 150 mm

**Figura 11.**

*Resistencia BLNAR motivo SSN*



Nota: AMP: Ampicilina de 10  $\mu$ g con 16 mm ( Resistente); AMC: Amoxicilina-Clavulanato de 20/10  $\mu$ g cpn 18 mm (Resistente); CTX: Cefotaxima de 30  $\mu$ g con 23 mm (Resistente); Tamaño de la placa 150 mm

c. *Resistencia BLPACR*

Esta cepa mantiene un nivel de resistencia a ampicilina mucho más elevado que BLNAR, pero se reporta con zonas de inhibición casi similares a las de amoxicilina- clavulanato y en caso de las cefalosporinas de tercera generación no contienen ninguna diferencia entre BLNAR (Calvo et al., 2011). Su proceso de inhibición se puede observar en la figura 12.

**Figura 12.**

*Resistencia BLPACR*



Nota: AMP: Ampicilina de 10  $\mu\text{g}$  con 4 mm (Resistente); Amoxicilina-Clavulanico de 20/10  $\mu\text{g}$  con 18 mm (Resistente); Tamaño de placa 10 mm

### 2.1.3. Identificación del fenotipo de resistencia

La influencia de cada resistencia contiene un fenotipo específico en *Haemophilus spp.*, esto se describe en las siguientes tablas 11 y 12.

**Tabla 11.**

*Fenotipos de resistencia en betalactámicos presentes en Haemophilus spp.*

Resistencias	Razón de resistencia	Características principales
BLPAR	Alteración enzimática tipo TEM-1 y TEM-2 o ROB-1 (clasificación molecular A)	Obtiene una CMI de ampicilina $\geq 4\text{mg/L}$ Identificación inmediata con pruebas cromogénicas que contienen nitrocefina ROB-1 contiene más resistencia hacia el cefalcor.
BLNAR	Alteración en el gen <i>ftsI</i> , produciendo un PBP3 modificado	Obtiene una CMI de ampicilina $\leq 2\text{ mg/L}$ Sensibilidad disminuida hacia los betalactámicos Mutaciones en el gen <i>ftsI</i> , aumentan la CMI de cefalosporinas de tercera generación (Variable). Difícil de detectar por difusión en disco
Low- BLNAR	Alteración en el gen <i>ftsI</i> , produciendo un PBP3 modificado	Obtiene valores mucho más bajos de CMI en ampicilina Se los detecta con herramientas moleculares El método de difusión en disco se considera deficiente para su detección.
BLPACR	Alteración enzimática y contiene alteraciones en su PBP3	Obtiene un alto grado de resistencia hacia la ampicilina y una disminuida sensibilidad hacia amoxicilina- ácido clavulánico con una CMI $\geq 2\text{mg/L}$

Nota. Datos tomados de Calvo et al., (2011)

**Tabla 12.***Otros antibióticos significativos para H. influenzae*

Antibiótico	Razón de resistencia	Característica
Carbapenémicos	Mutaciones específicas en el gen <i>ftsI</i>	Incluidos en cepas tipo BLNAR Se identifica con una elevada CMI de imipenem Puede observarse en la cepa una concentración de ampicilina ligeramente disminuida
Fluoroquinolonas	Presencia de su presunta resistencia en cepas hipermutables con genes alterados de <i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>gyrB</i> y <i>parE</i>	Útil en pacientes adultos mayores con problemas respiratorios crónicos y fibrosis quística. No existe muchos reportes de su resistencia Su resistencia se indica al colocar antibióticos como ácido nalidíxico en los medios. EUCAST propone que si el ácido nalidíxico contiene un diámetro $\geq 21$ mm existe sensibilidad.
Tetraciclinas	Presencia de su resistencia al alterar mecanismos Tet por mutaciones en el gen <i>tetB</i> .	Resistencia significativa en familia <i>Pasturellaceae</i> Su alteración puede disminuir la resistencia de doxiciclina y minociclina.
Glicilciclinas	Su posible resistencia se da por alteraciones mayoritarias en el gen <i>tetB</i>	Antibiótico con gran sensibilidad ya que tiene una gran afinidad hacia los ribosomas Para que sea funcional la bacteria debe tener genes como <i>tetB</i> , <i>tetK</i> o <i>tetM</i> . Se recomienda su uso en infecciones de piel, tejidos blandos e intraabdominales.
Sulfonamidas	Su resistencia se da por alteraciones en el gen <i>folP</i> encargado de sintetizar de manera adecuada la dihidropteroato sintetasa,	Su resistencia se evidencia con una CMI de 1,048 $\mu\text{g/mL}$

	sintetasa, enzima que permite una acción adecuada del antibiótico	Su resistencia se adquiere por plásmidos
Trimetopim	Su resistencia se debe por la presencia del gen <i>folH</i> alterado	Su resistencia afecta de igual manera la enzima dihidropteroato sintetasa
		Su resistencia se adquiere de forma cromosomal
Cloranfenicol	Presencia de enzima denominada cloranfenicol acetiltransferasa que usualmente está acompañada de enzimas betalactámicas	Se usa en procesos clínicos de meningitis
Macrólidos, cetólidos y estreptograminas	Su proceso de detección ante una posible alteración es en las proteínas ribosomales como L4 o L22	No existen gran cantidad de cepas que influyan gravemente su resistencia La administración de claritromicina es de mucha ayuda en procesos infecciosos que involucren cepas tipo BLNAR NTHI que contengan biopelículas. La resistencia de macrólidos se evidencia al incorporar en el medio eritromicina
Rinfampicina	Resistencia por alteraciones en el gen <i>rpoB</i>	Su resistencia puede causar problemas en infecciones invasivas
Aminoglucósidos	Resistencia evidente al contener enzima aminoglucósido 3'-O fosfotransferasa (APH (3')-1) que pueden estar acompañadas de betalactamasas tipo TEM-1	Su uso es poco recomendable
Fosfomicinas	No existe reportes exclusivos de su resistencia adquirida, pero se sospecha de una probable mutación al asociarse con tobramicina	Se recomienda su uso Su resistencia podría ocasionar complicaciones en enfermedades asociadas con fibrosis quística

*Nota.* Datos tomados de Courvalin, (2010)

#### **2.1.4. Pruebas de rutina**

Entre los mecanismos de resistencia de *H. influenzae* que no son muy distinguibles son entre las cepas BLNAR y bajo- BLNAR, puesto que aquellas contienen puntos de corte en el CLSI y EUCAST muy bajos. Por lo tanto, lo más recomendable es incluir pruebas de rutina como métodos moleculares en PCR, secuenciación del gen *ftsI* y ser corroboradas con métodos que impliquen CMI. Las técnicas de diferenciación manuales recomendables en este tipo de mutaciones, son las comprobaciones cromogénicas de nitrocefina que logran distinguir cepas productoras de betalactamasas BLPAR con BLNAR (Calvo et al., 2011).

#### **2.1.5. Pruebas complementarias**

La cepa BLNAR tiene varias alternativas de diagnóstico en pruebas como microdilución, que no es muy recomendable debido a que sus valores sugeridos no son estandarizados, pero pueden ser útiles en estudios futuros. Entre estos se encuentra la implementación de puntos de corte con una CMI de ampicilina o amoxicilina de 1mg/L para identificar las BLNAR y contrarrestarlo con una sensibilidad 0,25 mg/L (Calvo et al., 2011).

Conforme con Calvo et al., (2011) que citan a García-Cobos et al. (2008), insinúan la posibilidad de identificar cepas tipo BLNAR, al acoplar una CMI de amoxicilina de 0,5 mg/L, e indican cepas que no contienen ninguna mutación en los genes *ftsI*. Sin embargo, si el resultado de ampicilina obtiene una CMI de 0,5 mg/L en procesos como E-test o microdilución, puede que sean cepas de tipo BLNAR. De acuerdo con esta idea, si el cultivo confiere una CMI 0,5 mg/L o una zona de inhibición 29 mm en cefixima, es muy probable que la cepa indique alteraciones elevadas hacia las cefalosporinas de tercera generación y contengan motivos SSN.

En cuanto a la cepa BLPACR, puede que se identifique sin problema alguno con sus zonas de inhibición a 2 mg/L en amoxicilina- ácido clavulánico, pero también existen alternativas de diagnóstico donde se recomienda la aplicación de métodos E-test con un rango de 0,5 a 1 mg/L en amoxicilina- ácido clavulánico y si obtiene un valor <0,5 mg/L, los microorganismos no presentan alteraciones en el gen *ftsI* (Calvo et al., 2011).

Tomando en cuenta aquellas indicaciones, otra prueba complementaria que es primordial informarla es la de difusión en disco, este método no es de uso conveniente para la

identificación de cepas como BLNAR o BLPACR, pero contiene puntos con concentraciones alternativas que forman zonas de inhibición características y logran una presunta detección hacia BLNAR, entre los antibióticos se encuentra la ampicilina, que al ser agregada con 2 g puede formar una zona de inhibición  $< 16$  mm, el cefaclor con 30 g ante un punto de  $< 19$  mm y por último el fenoxi-metil- penicilina con 10 g, creando un punto de corte  $< 15$  mm (Calvo et al., 2011).

Para recalcar, en las cepas BLNAR es importante distinguir si existe resistencia en cefalosporinas sean de primera como de segunda generación, por ello se plantea el uso de cefaclor y cefuroxima, debido a que sus inhibiciones son referentes a una BLNAR y en guías como el CLSI y EUCAST mantienen puntos de corte diferentes hacia estos medicamentos que pueden variar en su reporte. De acuerdo con Calvo et al., (2011), los valores de sensibilidad y resistencia en el CLSI de aquellos antibióticos no son útiles para implementar un buen tratamiento, a causa de que proponen puntos de corte muy elevados, al contrario de EUCAST que integra valores por debajo de sus puntos de cortes epidemiológicos, como cefaclor con una sensibilidad 0,5mg/L y resistencia  $> 0,5$  mg/L, esto sucede de igual manera con en cefuroxima oral que obtiene una sensibilidad 0,125 mg/L y resistencia  $> 1$  mg/L. Por ello, estos puntos de corte en procedimientos como difusión en disco, indica sensibilidad con valores 50 mm, pero si se coloca un cefaclor de 30 $\mu$ g se observa una resistencia con diámetros  $< 19$  mm.

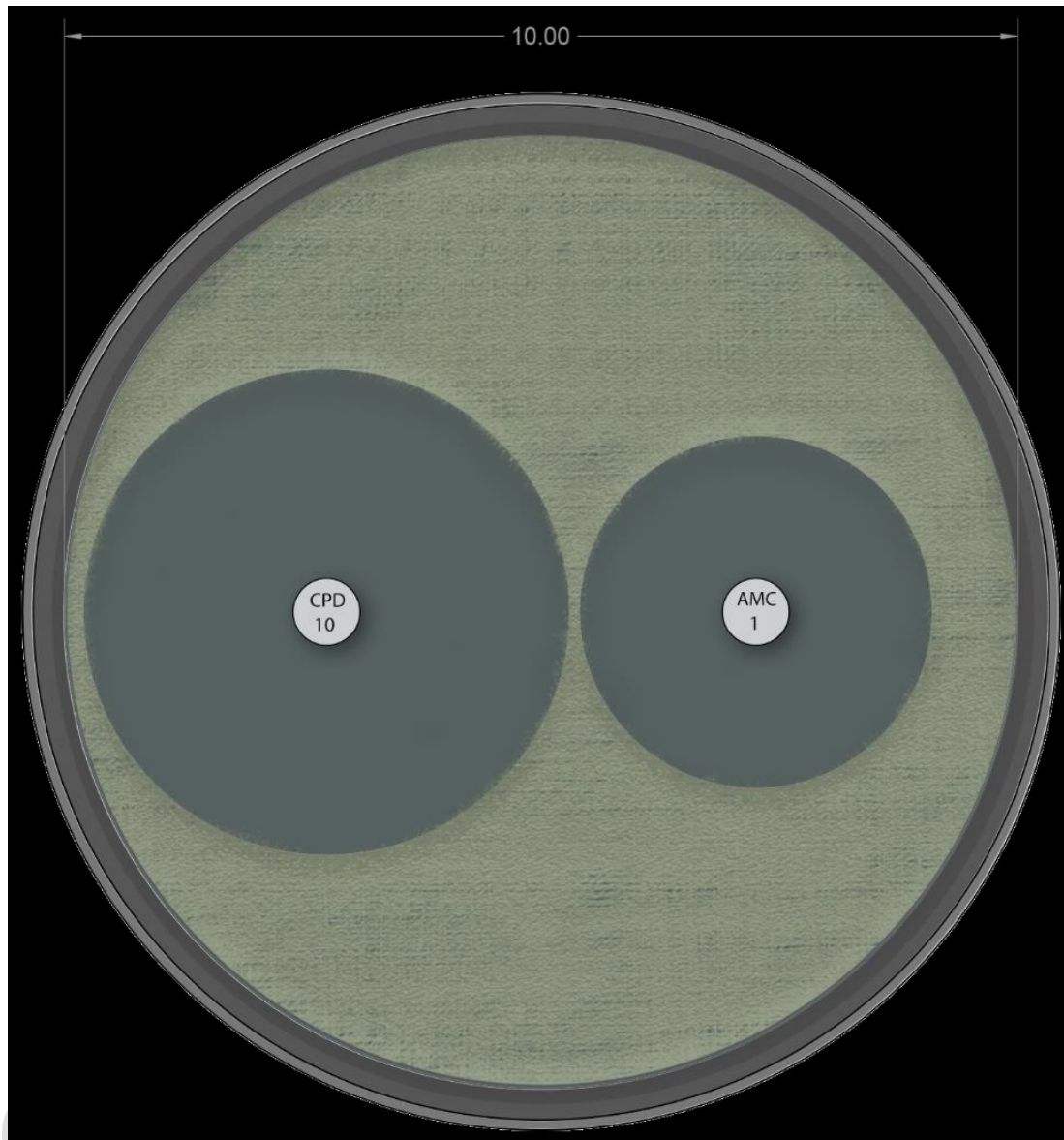
Por otra parte, lo característico de las bacterias Gram negativas es encontrar resistencias de cepas tipo TEM con betalactamasas de espectro extendido (BLEE) o resistentes hacia los inhibidores (IRTs). Sin embargo, en *H. influenzae* es difícil hallar este tipo de alteraciones, una de las posibles razones es la falta de puntos de corte estandarizados que permitan identificar de manera confiable las cepas tipo TEM-BLEE, primero por sus presuntas variaciones enzimáticas que son observadas sólo al incorporar concentraciones disminuidas de antibióticos como cefotaxima, y segundo por alteraciones genéticas hacia el gen *ftsI*. Es preciso señalar que, la segunda razón es mucho más fácil de identificar, debido a que presentan CMIs de cefotaxima que superan las sensibilidades en los puntos de corte estandarizados propuestos por organizaciones como EUCAST y CLSI (Calvo et al., 2011).

De acuerdo con, Courvalin (2010) que cita a Tristram, Bozdogan y Appelbaum (2005), sugieren utilizar como método alternativo para identificar las cepas BLEE en *H. influenzae*, la incorporación en los medios antibióticos como cefpodoxima en 10 µg con clavulanato de 1 µg o cefotaxima de 30 µg con clavulanato de 10 µg, con la finalidad de que actúen conjuntamente con las cefalosporinas simples y logren de esta manera verificar su existencia con el aumento de su diámetro en  $\geq 5\text{mm}$ . Aquello se lo representa en la figura 13.

CONFIDENCIAL

**Figura 13.**

*Resistencia BLEE en Haemophilus ssp.*



Nota: CPD: Cefpodoxima de 10  $\mu\text{g}$  con 20 mm; AMC: Amoxicilina-Clavulanato de 1  $\mu\text{g}$  con 15 mm; diferencia entre los dos de  $\geq 5$  mm posible BLEE; Tamaño de la placa 100 mm

Si se habla de fluoroquinolonas en *H. influenzae*, según el EUCAST (2022), se implementan pruebas como el ácido nalidíxico, en vista de que si es susceptible indica que existe susceptibilidad hacia las fluoroquinolonas. Pero si la prueba resulta ser resistente, revela la presencia de resistencia hacia ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina, puesto que al observar los niveles de inhibición de cada uno y si se

informa de alguna sensibilidad, seguramente a lo largo del tiempo forme alguna resistencia. Así mismo, existen mutaciones específicas en las topoisomerasas que ocasionan un nivel de resistencia leve hacia las fluoroquinolonas, aquello se puede observar con CMI's de 0,125 mg/L a 1 mg/L en la prueba de ácido nalidíxico.

#### **2.1.6. Comentarios de reporte**

Tanto el CLSI como EUCAST proponen valores específicos hacia los antibióticos administrados para *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*. Como primer punto el CLSI (2022), indica estándares de calidad previo a su reporte, una de sus recomendaciones es realizar la prueba de difusión en disco en placas de 100 mm con 4 discos máximo, mientras que, en placas de 150 mm, se puede insertar tan solo 9 discos. En la lectura, su zona de inhibición no debe existir crecimiento alguno, sin embargo, en el caso de trimetoprim y sulfonamidas, la CLSI declara que si hay algún leve crecimiento se lo debe descartar a la hora de determinar su zona de inhibición. Por otro lado, de existir muestras como LCR, el informe tiene que incorporar apropiadamente si existe resistencia a ampicilina, cefalosporinas de tercera generación, cloranfenicol y meropenem.

El CLSI además sugiere que en pacientes ingresados recientemente por problemas respiratorios y con sospecha de infecciones bacterianas por *H. influenzae*, deben iniciar una terapia empírica con amoxicilina- clavulánico, azitromicina, cefaclor, cefdinir, cefixima, cefpodoxima, cefprozil, cefuroxima y claritromicina. Por tanto, en *H. influenzae* al formar diferentes cepas de resistencia puede que su terapia empírica falle, por lo que en cepas como BLNAR se aconseja reportarlo con resistencia hacia amoxicilina-clavulanato, ampicilina- sulbactam, cefaclor, cefamandol, cefetamet, cefonicid, cefprozil, cefuroxima, loracarbef y piperacilina- tazobactam (CLSI, 2022)

#### **NOTA:**

La CLSI menciona que, si los resultados de ampicilina son resistentes, también los de amoxicilina y esto a su vez produce  $\beta$ - lactamasas de tipo TEM. Por otro lado, los medicamentos como cloranfenicol, muchas veces no se reporta de forma rutinaria en muestras de tracto urinario, lo mismo sucede con rifampin que se lo puede recomendar en procesos profilácticos, pero los puntos de corte del CLSI no son funcionales en procesos invasivos procedentes de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* (CLSI, 2022)

En el caso de BLPAR como se ha mencionado, esta cepa contiene alta resistencia hacia la amoxicilina y ampicilina por la producción de  $\beta$ -lactamasas, su reporte de resistencia elevada hacia cefaclor, puede estar relacionada en alteraciones como ROB-1, al igual que de TEM-1. En su informe se debe reportar sensibilidad hacia los inhibidores como ácido clavulánico y tazobactam, lo mismo sucede con las cefalosporinas de segunda y tercera generación (Calvo et al., 2011).

Referente a las recomendaciones de EUCAST, detalla que la prueba de bencilpenicilina, puede indicar la susceptibilidad hacia los  $\beta$  lactámicos, sea por alteración enzimática o por PBP3. Es decir que, en el caso de que la prueba de bencilpenicilina o penicilina G obtenga un diámetro  $\geq 12$ mm es probable que no exista ninguna alteración en contra de los betalactámicos y su reporte deba integrar la susceptibilidad de la mayoría de  $\beta$  lactámicos, salvo a antibióticos como amoxicilina, amoxicilina- ácido clavulánico y cefuroxima, ya que aquellos se los reporta como susceptibles a mayor exposición. Sin embargo, en caso de que exista un valor  $< 12$ mm, revela alteraciones de betalactamasas o mutaciones en la PBP3, conllevando a que pacientes con meningitis, se tenga en cuenta los valores de CMI ante los posibles profilácticos administrados y a su vez se deba reportar como resistente a ampicilina, amoxicilina y piperacilina (EUCAST, 2022).

Es muy útil saber que, también debe existir pruebas que corroboren de cierta manera el diagnóstico de bencilpenicilina, entre ellas se encuentra la administración de amoxicilina- ácido clavulánico con una concentración de 1 a 2 g. De acuerdo con los resultados, si la prueba de amoxicilina con ácido clavulánico obtiene un diámetro  $\geq 15$ mm en cepas con diámetros  $< 12$  mm en bencilpenicilina y positivos para  $\beta$  lactamasas, su reporte debe indicar la sensibilidad para todos los antibióticos excepto para ampicilina, amoxicilina y piperacilina, dentro de las razones de su resultado es que la cepa contiene alteraciones solo enzimáticas, dado que antibióticos como amoxicilina- ácido clavulánico y cefuroxima, son susceptibles ante una mayor exposición. En segundo lugar, si la prueba obtiene un halo  $< 15$ mm en cepas con diámetros  $< 12$  mm en bencilpenicilina y positivos para betalactamasas, puede que posean betalactamasas y alteraciones en su PBP3, haciendo así que su reporte este acorde a los puntos de sensibilidad en cefepima, cefpodoxima e imipenem. Para culminar, si la prueba de bencilpenicilina contiene un diámetro  $< 12$ mm y resultó ser betalactamasa negativa, su mecanismo de resistencia más probable es una alteración en la PBP3, por lo tanto, su reporte se debe investigar

exhaustivamente la sensibilidad de los antibióticos determinados para cepas como BLNAR (EUCAST, 2022).

Conforme a las tetraciclinas en *H. influenzae* indican sensibilidad si obtiene un valor de 25mm en doxiciclina y minociclina, mientras si contiene un punto de corte < 25 mm se reporta resistencia hacia doxiciclina y minociclina (EUCAST, 2022).

#### NOTA:

Las cepas BLNAR ocasionan una sensibilidad leve hacia los betalactámicos como las cefalosporinas y son resistentes a ampicilina. Con respecto a EUCAST, en cepas BLNAR y BLPACR además de ser reportadas como resistentes a los medicamentos recomendados por la CLSI también se implementan a piperacilina y piperacilina- tazobactam (Calvo et al., 2011).

Es necesario resaltar en *Haemophilus spp.* se hallan otras especies que no se nombraran en gran medida dentro del capítulo, pero están presentes y se encuentran en el grupo HACEK, aquellas mantienen puntos de resistencia y sensibilidad en guías como la CLSI. El proceso más usado para su antibiograma y reporte es la microdilución, pero el aislamiento de algunas de sus bacterias se puede complicar, por lo que la determinación de su susceptibilidad debe ser minuciosa (CLSI, 2006).

De ello parte que las cepas *Haemophilus spp.* pertenecientes a este grupo, mantienen una cierta similitud en la interpretación hacia la búsqueda de resistencia con *H. influenzae*, excepto que, en los puntos de corte con cloranfenicol, debido a que se observa zonas de inhibición adaptadas en base a *Streptococcus spp.* Cabe decir, que todas las bacterias pueden producir  $\beta$ - lactamasas, pero su reporte tiene que ser comprobado de forma in vitro (CLSI, 2006).

## 2.2. *Pasteurella spp.*

### 2.2.1. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos

Las resistencias antibióticas en *Pasteurella spp.*, son transmitidas primordialmente por plásmidos y confieren alteraciones en la acción de  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomycin y sulfonamidas. Como punto primordial, es que los plásmidos de *Pasteurella spp.*, pueden ser transferibles hacia otras especies de la familia

*Pasteurellaceae* y también hacia otras bacterias Gram negativas. La eritromicina, lincosamidas y algunos  $\beta$ -lactámicos, tiende a no ser muy funcionales para este microorganismo, a causa de que generan sensibilidad disminuida y por ello se aconseja implementar terapias combinadas con amoxicilina más algún inhibidor de  $\beta$ -lactamasa, lo mismo sucede con doxiciclina y metronidazol, clindamicina con fluoroquinolona, trimetoprima con sulfametoxazol o ceftriaxona que son recomendables en pacientes embarazadas (Wilson y Ho, 2013).

En otra instancia, se hallan estudios de Wilson y Ho, (2013), donde de igual manera notifican el aumento en la resistencia hacia algunos medicamentos como tetraciclina, betalactámicos y eritromicina en *P. multocida*, que originan patologías como meningitis y sepsis. Se dice que, los procesos de resistencia adquirida en  $\beta$ -lactámicos son provocados por la transmisión de cepas respiratorias productoras de betalactamasas en *H. influenzae* (Citron, Warren, Fernandez, Goldstein, Tyrrell y Goldstein, 2005).

La CLSI consideran que los agentes primarios a verificar en la bacteria son los puntos de sensibilidad en penicilinas,  $\beta$ -lactámicos, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos y trimetoprim-sulfametoxazol. El guía así mismo alega, que es inusual observar betalactamasas en estos microorganismos con CMI<sub>s</sub> en antibióticos de amoxicilina, ampicilina y penicilina  $> 0,5$  g/mL. Por ello, también señalan que, en caso de mordedura la identificación de sensibilidad en *Pasteurella spp.* no es necesaria, puesto que la terapia empírica usualmente es funcional y sustentable, a pesar de esto, en muestras como cultivos de sangre, respiratorios, tejido profundo y dispositivos protésicos implantados provenientes de pacientes inmunodeficientes, si se sugiere realizar pruebas de rutina. En cuanto al uso de pruebas, para obtener una mayor sensibilidad en su identificación, es factible implementar métodos cromogénicos de cefalosporinas al verificar la producción de  $\beta$ -Lactamasas en muestras respiratorias o estériles (CLSI, 2006).

En contraste con Courvalin (2010), asegura que los antibióticos rara vez adquieren resistencia. Sin embargo, también afirma que los betalactámicos son muy eficaces al igual que con el cloranfenicol, tetraciclinas, quinolonas, sulfamidas, trimetoprima y cotrimoxazol, aunque en algunas cefalosporinas de primera generación puede que no sean de gran utilidad.

### 2.2.2. Selección y disposición de discos para estudios de susceptibilidad antimicrobiana por el método de Kirby Bauer

Dentro de las cepas control, que recomienda la CLSI (2006) y EUCAST (2022), son las siguientes de la tabla 13.

**Tabla 13.**

*Cepas control implementadas para Pasteurella spp.*

Guía	Cepa	Característica
CLSI	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Cepa con resistencia intermedia a penicilina por causa de la alteración en la proteína de unión para penicilina.
		Indispensable dentro de la prueba de CMI de resistencia inducible a clindamicina
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	La cepa incluye plásmidos de TEM-1 betalactamasa no BLEE
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Es una cepa -lactamasa negativa, mecA negativo y contiene una gran sensibilidad a la mayoría de las drogas.
		Es esencial dentro de la prueba difusión en disco de resistencia hacia mupirocina de alto nivel y en prueba de difusión en disco para observar la resistencia inducible a clindamicina
EUCAST	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766	Capa ampicilina susceptible

*Nota.* Datos tomados de CLSI (2006) y EUCAST (2022).

Las técnicas de cultivo aconsejadas por Courvalin (2010) son la implementación de microdilución en caldo, en agares de Muller Hinton con sangre de caballo lisada en 2,5 a 5%, con un estándar de 0,5 McFarland, su tiempo de incubación debe ser entre 18 a 24 horas con una temperatura de 35°C. Por otro lado, en procesos como antibiograma por difusión en disco se debe considerar el uso del agar Muller Hinton con sangre de carnero en un 5%, o también el agar Muller Hinton con sangre de caballo lisada y NAD.

Entre los medicamentos principales que la CLSI (2006) y EUCAST (2022) recomienda y que se deben tomar en cuenta para revisión de resistencia son los siguientes:

**NOTA:**

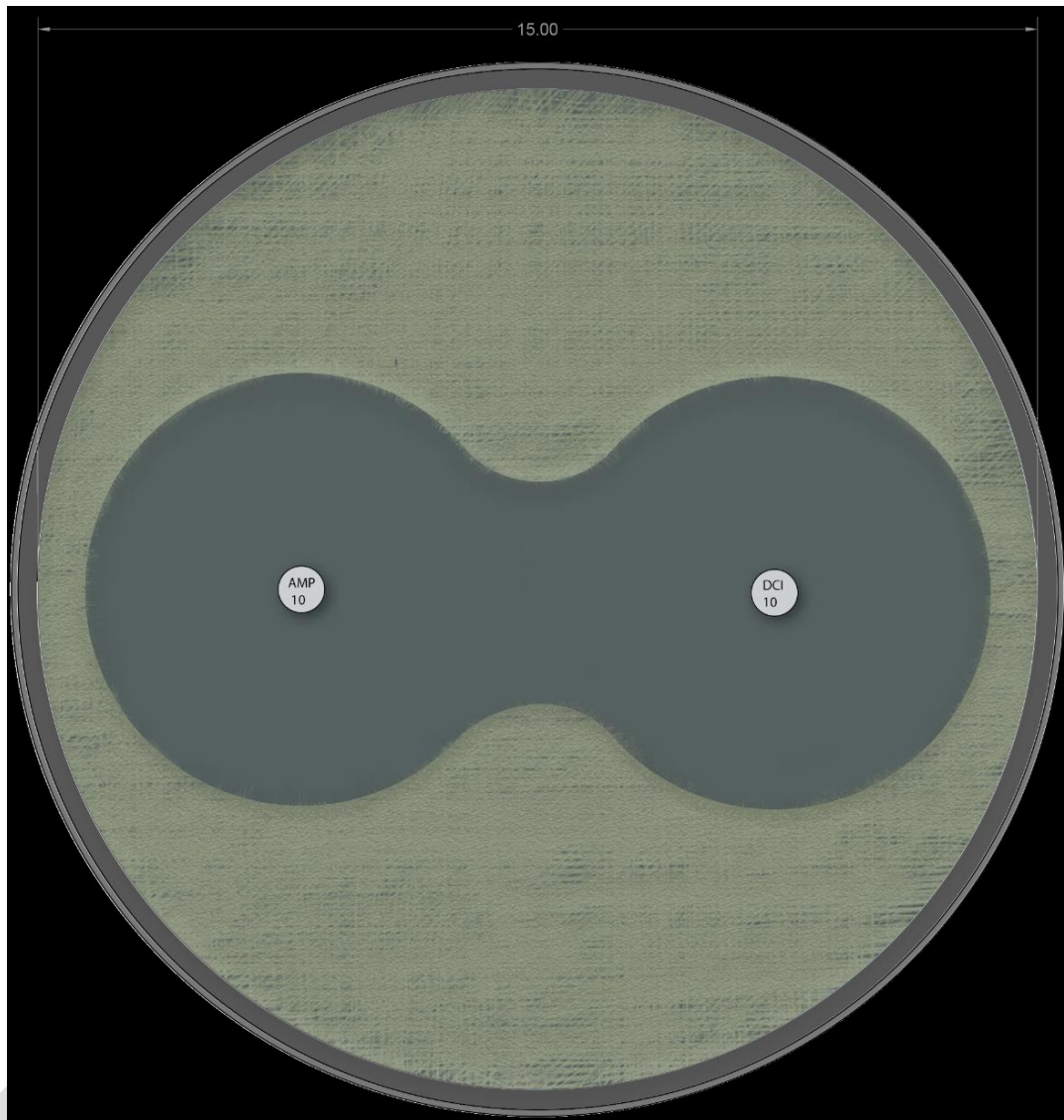
Cabe decir que los puntos de corte por parte de la CLSI y EUCAST solo se interponen a su sensibilidad mas no su resistencia

*a. Betalactámicos:*

Sus principales puntos de corte son basados en torno a penicilina, amoxicilina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico y ceftriaxona. Según, Courvalin (2010), existen sinergias leves entre aminopenicilinas e inhibidores de betalactamasas que son el resultado de resistencia hacia los betalactámicos de tipo ROB-1, aquello se lo observa en la figura 14. Así mismo, la CLSI recomienda insertar 10 µg de ampicilina, 10 unidades de penicilina y 20/10 µg de amoxicilina con ácido clavulánico para observar los puntos de corte en disco (CLSI, 2006). Cabe decir que, en el caso de *Pasteurella multocida*, se encuentra menos actividad en medicamentos como cloxacilina y cefalosporinas de primera generación orales (Sheff, 2002)

**Figura 14.**

*Aminopenicilinas - ácido clavulánico*



Nota: AMX Amoxicilina de 10  $\mu$ g con 29 mm ; DCI: Ácido clavulánico de 10  $\mu$ g con 29 mm; tamaño de la placa 150 mm

**NOTA:**

Se recomienda identificación de betalactamasas por medio de pruebas cromogénicas como nitrocefina.

*b. Quinolonas*

Entre las quinolonas más características para el CLSI (2006) son moxifloxacina y levofloxacina, mientras que para el EUCAST (2022) encontramos a levofloxacina, ciprofloxacina y ácido nalidíxico. En cuanto a Courvalin (2010), la prueba del ácido

nalidíxico puede que obtenga un nivel de resistencia elevado pero los valores de las fluoroquinolonas sean disminuidos, por ello se debe verificar los CMI de cada antibiótico en el caso de que exista alguna mutación poco evidente. En su identificación se sugiere el uso de moxifloxacino y levofloxacino a 5g. La posición de cada antibiótico se señala en la siguiente figura 15.

**Figura 15.**  
*Moxifloxacino y levofloxacino*



Nota: MOX: Moxifloxacino de 5  $\mu$ g con 30 mm (Sensible); LEV: Levofloxacino de 5  $\mu$ g con 30 mm (Sensible); Tamaño de la placa 150 mm

c. *Tetraciclinas*

Tanto el CLSI (2006) como en el EUCAST (2022) implementan antibióticos como tetraciclina y doxiciclina en una concentración de 30 g. Por otro lado, EUCAST (2022) señala que la susceptibilidad de doxiciclina puede ser interferida por la de tetraciclina. La posición de cada antibiótico se indica en la siguiente figura 16.

**Figura 16.**  
*Tetraciclina y doxiciclina*



Nota: TET: Tetraciclina de 30  $\mu$ g con 25 mm (Sensible); DOX: Doxiciclina de 30  $\mu$ g con 25 mm (Sensible). Tamaño de la placa 150 mm

d. *Macrólidos*

Aquí los puntos de corte solo se encuentran en el CLSI (2006) y el proceso debe ser siempre demostrado en cuanto se dude de su sensibilidad. De acuerdo con Kehrenberg, et al. (2006), este tipo de antibióticos suele implementar una disminución de sensibilidad a causa de que gran cantidad de las bacterias Gram-negativas son innatamente resistentes por su permeabilidad o bombas de eflujo multidrogas. La posición de cada antibiótico se indica en la siguiente figura 17.

**Figura 17.**  
*Macrólidos*



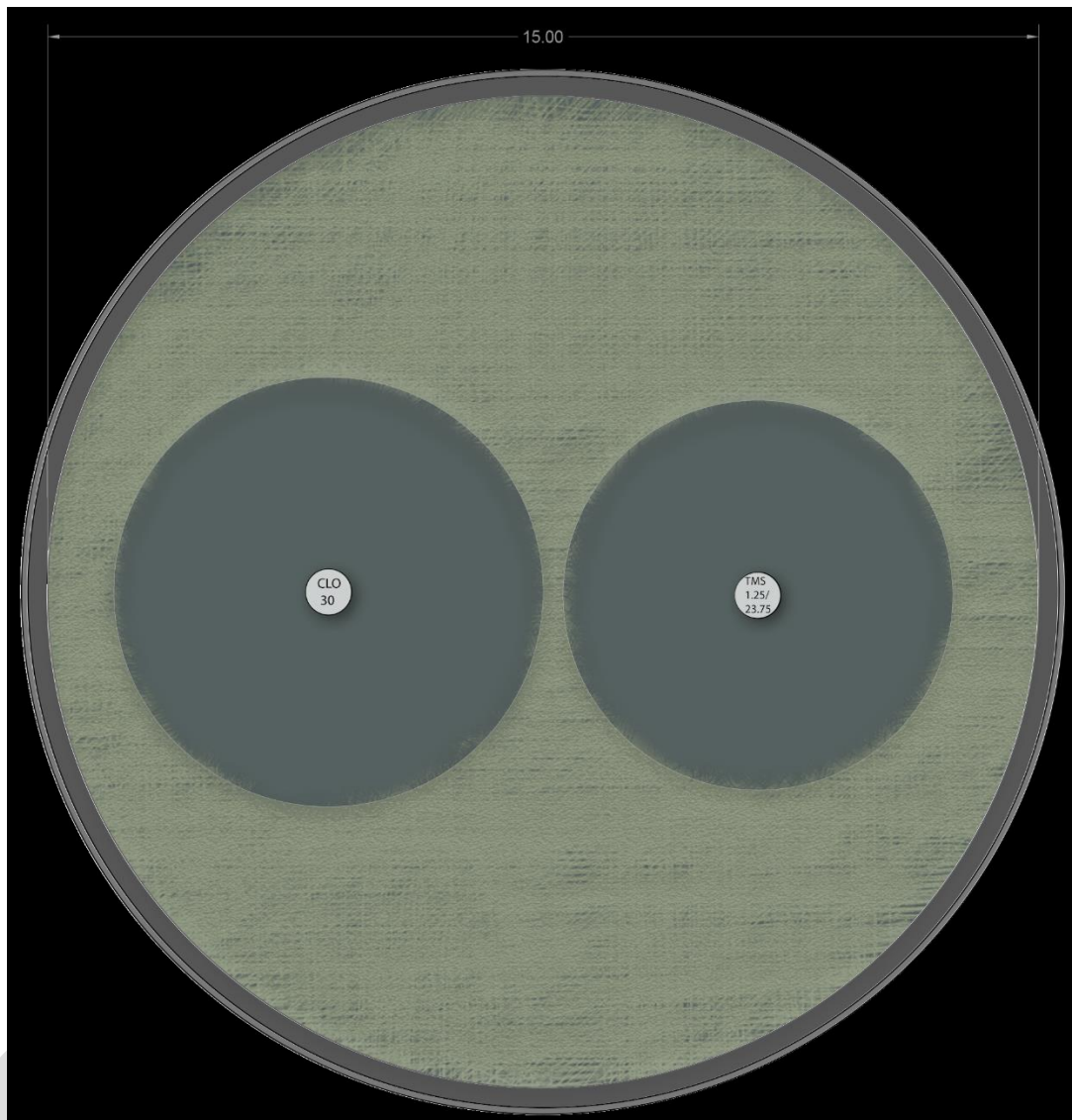
Nota: ERI: Eritrocimina de 15 µg con 29 mm (Sensible); AZT: de 15 µg con 22 mm (Sensible); Tamaño de placa 150 mm

*e. Otros antibióticos*

En el CLSI (2006) se integran además otros puntos de corte de antibióticos como cloranfenicol y trimetoprim con sulfametoxazol, mientras que en EUCAST (2022) solo se incorpora trimetoprim con sulfametoxazol. Referente a las sulfonamidas su resistencia está interpuesta por la presencia de dihidropteroato sintetasa tipo 2 (DHPS), en cuanto a trimetoprima se basa en la formación de dihidrofolato resistente a la trimetoprima reductasa (DHFR), los cuales se transmiten por plásmidos y transposones. Finalmente, el cloranfenicol adquiere resistencia en estas bacterias por la producción de cloranfenicol acetil transferasas o exportadores de cloranfenicol que son integrados por plásmidos, transposones o cassettes de genes Kehrenberg, et al. (2006). La posición de cada antibiótico se indica en la siguiente figura 18.

CONFIDENCIAL

**Figura 18.**  
*Cloranfenicol, trimetoprim con sulfametoxazol*



Nota: CLO: Cloranfenicol de 30  $\mu\text{g}$  con 29 mm (Sensible); TMS: Trimetoprim-Sulfametoxazol de 1.25/23.75  $\mu\text{g}$  con 26 mm (Sensible); Tamaño de placa 150 mm

### 2.2.3. Identificación de fenotipo de resistencia

Como se menciona, la resistencia en este tipo de bacterias es muy rara, pero se puede encontrar alteraciones a nivel de plásmidos que modifican la acción del antibiótico. Entre las posibles resistencias según, Courvalin (2010) se encuentra en la tabla 14:

**Tabla 14***Resistencias Pasteurella spp.*

<b>Antibiótico</b>	<b>Razón de resistencia</b>
Betalactámico	Resistencia proveniente de la producción de tipo ROB-1 en <i>P. multocida</i> pero es muy extraño encontrarlo en humanos.
	La producción de ROB-1 y TEM-1 es muy complicado de diferenciarlo de forma fenotípica
Quinolonas	Se produce por mutaciones en genes estructurales pertenecientes a las topoisomerasas tipo II, <i>gyrA</i> y <i>parC</i>
Tetraciclinas	Resistencia evidente por el gen <i>tet H</i> , puede estar presente en plásmidos y cromosomas
	Puede que se den también por genes <i>tet (B)</i> , <i>tet (D)</i> , <i>tet (G)</i> y <i>tet (L)</i> o <i>tet (M)</i> .

*Nota.* Datos recuperados de Courvalin (2010)

#### **2.2.4. Comentarios de reporte**

*Pasteurella spp.* al no tener gran incidencia de resistencia adquirida, muchas bibliografías afirman que puede estar alterada la acción de antibióticos como betalactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomycin y sulfonamidas, puesto que la bacteria adquiere modificaciones en sus plásmidos (Wilson y Ho, 2013).

Al sospechar de la producción de una  $\beta$ -lactamasas, se debe implementar pruebas complementarias además del antibiograma, como las cromogénicas. En el reporte de estos medicamentos, se sugiere verificar la terapia empírica en pacientes que mantengan procesos como meningitis y sepsis. Courvalin (2010), señala la existencia de una aparente ineficiencia en las cefalosporinas de primera generación, no obstante, el CLSI (2006) incorpora puntos de corte para ceftriaxona que es una cefalosporina de tercera generación con una concentración de 30  $\mu$ g a una sensibilidad  $\geq$  de 34 mm.

Los tratamientos empíricos son de gran ayuda para esta bacteria, a pesar de aquello se tiene que indagar sobre los reportes que han existido a lo largo de estos años, ya que de acuerdo con lo citado por Citron et al. (2005) según Goldstein, Citron y Richwald (1988),

la eritromicina tiende a obtener una elevada resistencia hacia *P. multocida*, pero sus puntos de corte para este antibiótico no han sido estandarizados en guías como el CLSI (2006) y EUCAST (2022). En cuanto a la azitromicina, el presente estudio evidencia que hay concentraciones disminuidas en procesos de dilución, a comparación de la eritromicina. Por lo tanto, en los reportes de estos antibióticos, tiene que existir necesariamente una corroboración de su resistencia.

Así mismo, Courvalin (2010) recalca que los glucósidos en esta bacteria tienen una susceptibilidad variable, ya que el 80% son cepas sensibles a gentamicina y en su totalidad son resistentes o intermedias hacia amikacina, igualmente *Pasteurella spp.* puede que obtengan susceptibilidad intermedia hacia macrólidos y sean resistentes a lincosamidas. Al contrario de su resistencia adquirida, es muy poco usual, pero puede que esté presente reportes de resistencia en tetraciclinas y quinolonas.

### **2.3. *Aggregatibacter spp.* y *Actinobacillus spp.***

#### **2.3.1. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos**

Basado en estudios epidemiológicos, *Aggregatibacter spp.* contiene una especie prevalente denominada *A. actinomycetemcomitans* tipo b, que se la asocia con periodontitis agresiva localizada en un 90% y generalizada en un 30% al 50%. Este tipo de bacteria presenta una cierta susceptibilidad a las fluroquinolonas, ampicilina-sulbactam, doxicilina y una leve susceptibilidad hacia la azitromicina, en cuanto a su resistencia encontramos antibióticos como el metronidazol y roxitromicina. Por el contrario, se hallan investigaciones en Ecuador del año 2017, donde se presentan a 72 pacientes en los cuales 22 contienen *A. actinomycetemcomitans* y además evidencian que el metronidazol con amoxicilina puede dar una cierta sensibilidad, pero el uso de metronidazol con doxiciclina no resulta de gran efectividad (Chávez y Campos, 2017).

Acorde a los reportes de Heredia (2016) en *A. actinomycetemcomitans* existen un cierto grado de susceptibilidad de otro antibiótico denominado amoxicilina, su reporte se basa en una población de 24 pacientes que se encuentran en Guayaquil - Ecuador dentro del año 2016, donde demuestran que la amoxicilina contiene un porcentaje de sensibilidad del 86% y resistencia del 14%, por lo que recomiendan que este antibiótico sea aplicado para el tratamiento, al igual que la clindamicina, metronidazol, doxicilina, ciprifloxacina,

azitromicina y antibióticos combinados con metronidazol sea con amoxicilina o ciprofloxacina.

Sin embargo, dentro de los medicamentos recomendados, existe una evaluación realizada por parte de Vega (2021) en Ecuador, en los años 2020 al 2021, el cual añade que existe cierta sensibilidad antimicrobiana en cepas control de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC ® 29522<sup>TM</sup>) ante medicamentos como doxiciclina, ciprofloxacina, azitromicina y una resistencia hacia amoxicilina con ácido clavulánico, amoxicilina y metronidazol. Estos datos son completamente distintos en comparación a los previos estudios mencionados, ya que, también se señala que, en ciudades como Filadelfia, en la que según Rams, Degener y Winkelhoff (2014) citado por Vega (2021), obtienen resistencia a doxiciclina y una cierta sensibilidad considerable hacia metronidazol y amoxicilina. Es decir, las resistencias y sensibilidades hacia algún antibiótico en los microorganismos pueden ser diferida por varias causas, entre ellas es el proceso de control en la ingesta de los medicamentos dependiendo de su zona geográfica y la prevalencia temporal de alguna cepa mutante que se halle en las investigaciones.

Finalmente, en cuestión a *Actinobacillus spp.* las especies que predominan en el ser humano tienen poca trascendencia investigativa, pese a aquello, por parte de *A. hominis* se obtiene una sensibilidad hacia penicilina, ampicilina, eritromicina, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacina y polimixina (Friis-Møller et al., 2001). Al contrario de *A. ureae*, que indican sensibilidad hacia una gran cantidad de antibióticos y entre ellos se encuentra penicilina, ampicilina, cefalotina, cefoxitina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos (Washington et al., 2008).

### **2.3.2. Comentarios de reporte**

Tomando en cuenta a la especie *A. actinomycetemcomitans*, su tratamiento referido es la administración de amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, tetraciclina, azitromicina, clindamicina, moxifloxacina y metronidazol, en casos como procesos sistémicos se sugiere recetar doxiciclina, cefazolina, cefuroxima, cefotaxima y ceftriaxona. Sin embargo, como se menciona, muchos de estos antibióticos pueden ser poco efectivos y adquirir una resistencia o sensibilidad disminuida. Cada resistencia y sensibilidad debe ser analizada y verificada conforme a su población, ya que, en muchos casos, la bacteria reporta resistencia hacia metronidazol, con leves sensibilidades hacia azitromicina y clindamicina, pero en cuanto a su sensibilidad logran una efectividad en amoxicilina,

amoxicilina- clavulanato y doxiciclina. Por parte de las cefalosporinas puede que sean sensibles pero su acción debe ser investigada (Ardila & Bedoya-García, 2020).

### 3. REFERENCIAS

- Abotsi, R. E., Govinden, U., & Essack, S. (2017). Mechanisms of antibiotic resistance in *Haemophilus parainfluenzae*. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, 0053, 1–4. <https://doi.org/10.1080/23120053.2017.1320853>
- Agrawal, A., & Murphy, T. F. (2011). *Haemophilus influenzae* infections in the H. influenzae type b conjugate vaccine era. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11), 3728–3732. <https://doi.org/10.1128/JCM.05476-11>
- Akahane, T., Nagata, M., Matsumoto, T., Murayama, N., Isaka, A., Kameda, T., ... Kawakami, Y. (2011). A case of wound dual infection with *Pasteurella dagmatis* and *Pasteurella canis* resulting from a dog bite- limitations of vitek- 2 system in exact identification of *Pasteurella* species. *European Journal of Medical Research*, 16, 531–536. <https://doi.org/10.1186 / 2047-783X-16-12-531>
- Ardila, C. M., & Bedoya-García, J. A. (2020). Antimicrobial resistance of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in periodontitis patients. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.024>
- Bae, S., Lee, J., Lee, J., Kim, E., Lee, S., Yu, J., & Kang, Y. (2010). Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Korea: Results of a nationwide acute respiratory infections surveillance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 65–71. <https://doi.org/10.1128/AAC.00966-09>
- Barbosa, A. R., Giufrè, M., Cerquetti, M., & Bajanca-Lavado, M. P. (2011). Polymorphism in *ftsI* gene and  $\beta$ -lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of  $\beta$ -lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(4), 788–796. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq533>
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos, SEIMC. Seimc.*

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>

Chávez, F. M., & Campos, O. (2017). Susceptibilidad antibiótica del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por medio del test de difusión y dilución. *Dominio de Las Ciencias*, 3(2), 348–374.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.23857/dom.cien.pocaip.2017.3.2.348-3748>

<URL:http://dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/index>

Citron, D. M., Warren, Y. A., Fernandez, H. T., Goldstein, M. A., Tyrrell, K. L., & Goldstein, E. J. C. (2005). Broth Microdilution and Disk Diffusion Tests for Susceptibility Testing of *Pasteurella* Species Isolated from Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2485–2488.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2485>

CLSI. (2022). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100* (32nd ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. (2006). *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria: approved guideline* (Vol. 26). Clinical and Laboratory Standards Institute.

Courvalin, P. (2010). Antibiogram\_Courvalin. In *Haemophilus influenzae* (pp. 427–436).

Dangor, Y., Ballard, R. C., Miller, S. D., & Koornhof, H. J. (1990). Antimicrobial Susceptibility of *Haemophilus ducreyi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(7), 1303–1307.

EUCAST. (2022). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters* (Version 12.0).

Friis-Møller, A., Christensen, J. J., Fussing, V., Hesselbjerg, A., Christiansen, J., & Bruun, B. (2001). Clinical significance and taxonomy of *Actinobacillus hominis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3), 930–935.

Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A., & Trevino, E. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico* (Doceava ed).

González-beiras, C., Marks, M., Chen, C. Y., Roberts, S., & Mitjà, O. (2016).

- Epidemiology of *Haemophilus ducreyi* Infections. *Medscape Education*, 22(1), 1–8. <https://doi.org/10.3201/eid2201.150425>
- Heredia, E. (2016). *Susceptibilidad antibiótica del Aggregatibacter actinomycetencomitans a la amoxicilina*. Universidad de Guayaquil. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/18080>
- Ison, A., Dillon, J. R., & Tapsall, J. W. (1998). The epidemiology of global antibiotic resistance gonorrhoeae and *Haemophilus ducreyi* among *Neisseria*. *The Lancet*, 351, 8–11. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)90003-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)90003-4)
- Jorgensen, J., Carroll, K., Funke, G., Pfaller, M., Landry, M., Richter, S., & Warnock, D. (2015). *Manual of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>
- Kehrenberg, C., Walker, R. D., Wu, C. C., & Schwarz, S. (2006). Antimicrobial Resistance in Members of the Family Pasteurellaceae. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin* (pp. 167–186).
- Kosikowska, U., Andrzejczuk, S., Grywalska, E., Chwiejczak, E., Winiarczyk, S., Pietras-Ożga, D., & Stępień-Pyśniak, D. (2020). Prevalence of susceptibility patterns of opportunistic bacteria in line with CLSI or EUCAST among *Haemophilus parainfluenzae* isolated from respiratory microbiota. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68161-5>
- Michael, G. B., Bossé, J. T., & Schwarz, S. (2017). Antimicrobial Resistance in Pasteurellaceae of Veterinary Origin. *Microbiology Spectrum*, 6(3), 1–27. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Mitjà, O., Lukehart, S. A., Pokowas, G., Moses, P., Kapa, A., Godornes, C., ... Bassat, Q. (2014). *Haemophilus ducreyi* as a cause of skin ulcers in children from a yaws-endemic area of Papua New Guinea: A prospective cohort study. *The Lancet Global Health*, 2(4), 235–241. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70019-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70019-1)
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 1–37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms>
- Murra, M., Lützen, L., Barut, A., Zbinden, R., Lund, M., Villesen, P., & Nørskov-

- lauritsen, N. (2018). Whole-Genome Sequencing of *Aggregatibacter* Species Isolated from Human Clinical Specimens and Description of *Aggregatibacter kilianii* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 528(7), 1–10.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JCM.00053-18>.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2013). *Haemophilus* y bacterias relacionadas. In *Microbiologia Medica* (Septima Ed, pp. 296–303).
- Nørskov-lauritsen, N. (2014). and *Aggregatibacter* Species with Host Specificity for Humans. *Journals ASM*, 27(2), 214–240. <https://doi.org/10.1128/CMR.00103-13>
- Nørskov-lauritsen, N., & Kilian, M. (2006). Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2135–2146.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64207-0>
- Pardo, P. (2008). *Magnitud e impacto de la resistencia a los antibioticos en Latinoamérica*. Universidad complutense de Madrid.
- Pereira, R. F. C., Mofatto, L. S., Silva, A. C. A., Alves, D. A., Machado, D., Theizen, T. H., ... Carazzolle, M. F. (2019). Draft Whole-Genome Sequences of *Haemophilus influenzae* Biogroup *aegyptius* Strains Isolated from Five Brazilian Purpuric Fever Cases and One Conjunctivitis Case. *American Society for Microbiology*, 8(30), 1–3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/MRA.00642-19>
- Prachayasittikul, V., Ronald, A., Robert, M., & Ronald, A. (2000). Episome profiles and mobilizable beta-lactamase plasmid in *Haemophilus ducreyi* Related papers. *Academia*, 31(1), 80–83.
- Roy-leon, E., Lauzon, W. D., Toye, B., Singhal, N., & Cameron, D. W. (2005). In vitro and in vivo activity of combination antimicrobial agents on *Haemophilus ducreyi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 552–558.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dki270>
- Sheff, B. (2002). *Pasteurella multocida*. *Nursing*, 32(11), 72. <https://doi.org/10.1097/00152193-200211000-00050>

- Staley, J. T., Boone, D. R., Chairman, V., Brenner, D. J., Vos, P., Garrity, G. M., ... Schleifer, K. H. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Second Edi).
- Tchatchouang, S., Nzouankeu, A., Hong, E., Terrade, A., Denizon, M., Deghmane, A., ... Taha, M. (2020). Analysis of Haemophilus species in patients with respiratory tract infections in Yaoundé , Cameroon. *International Journal of Infectious Diseases*, 100, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.040>
- Tinguely, R., Seiffert, S. N., Furrer, H., Perreten, V., Droz, S., & Endimiani, A. (2013). Emergence of Extensively Drug-Resistant Haemophilus parainfluenzae in Switzerland. *American Society for Microbiology*, 1, 1–3. <https://doi.org/10.1128/AAC.00221-13>
- Vega, V. (2021). *Sensibilidad antimicrobiana del aggregatibacter actinomycetemcomitans, estudio in vitro*. Universidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/23892>
- Washington, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Shreckenberger, P., & Woods, G. (2008). Otros bacilos gramnegativos con requerimientos nutricionales especiales. In *Koneman Diagnóstico microbiológico* (Sixth Edit, pp. 409–444).
- Wilson, B. A., & Ho, M. (2013). Pasteurella multocida : from Zoonosis to Cellular Microbiology. *CMR Journals*, 26(3), 631–635. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-13>