



00361
5 lej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Factores de virulencia
asociados a cepas aisladas de
haemophilus influenzae
en niños lactantes y preescolares.**

TESIS EXPERIMENTAL
que para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
(**BIOLOGIA**)

presenta

Q. F. B. JOAQUIN GONZALEZ MONROY



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	4
GENERALIDADES.....	5
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
RESULTADOS.....	46
DISCUSION.....	54
CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	61

INTRODUCCIÓN:

Haemophilus influenzae es un cocobacilo gram negativo responsable de una gran variedad de enfermedades infecciosas principalmente en la población infantil (48). La virulencia ha sido correlacionada en primera instancia de este microorganismo con la presencia de un polisacárido capsular del cual existen seis tipos distintos antigénicamente y son comúnmente designados de la a, a la f -- (1). Infecciones sistémicas como meningitis y bacteriemia, en el grupo de edad infantil casi siempre son causadas por cepas capsuladas de Haemophilus influenzae, en su gran mayoría por el serotipo b y van en aumento las causadas por otros serotipos a, c, d, e, f, (2). Las infecciones invasivas también son causadas más frecuentemente por cepas que producen polisacárido capsular serotipo b, sin embargo infecciones localizadas como sinusitis y otitis media usualmente son causadas por cepas no capsuladas (3,4). La susceptibilidad a las infecciones sistémicas con Haemophilus influenzae serotipo b, ha sido correlacionado con la ausencia de anticuerpos humorales dirigidos contra la cápsula del serotipo b (5,6). A pesar de que Haemophilus influenzae es comúnmente asociado con infecciones del grupo pediátrico, también ha sido reportado como causa importante de enfermedades en adultos (7,8,9,10). En un estudio de 103 pacientes adultos con enfermedad sistémica debida a Haemophilus influenzae, Wallace y cols. (22) demostraron que 64% de estas infecciones fueron causadas por cepas no capsuladas. Los resultados de este reporte sugieren que existen otros factores de virulencia, que pueden ser responsables de la capacidad invasiva. En años recientes Kilian (18) describió un esquema bioquímico en el que H. in-

fluenzae puede ser dividido en seis biotipos. Varios estudios --- (13,14,15,16) han demostrado que H. influenzae biotipo I y biotipo II son recuperados principalmente de adultos o pacientes infantiles con enfermedad sistémica, en cambio los resultantes biotipos - son asociados comúnmente con infecciones localizadas o como comensales del tracto respiratorio superior. Estos hallazgos sugieren otra vez que existen otros factores de virulencia que adicionados a la presencia de cápsulas, son asociados con enfermedad invasiva debido a ciertos biotipos de H. influenzae. Sin embargo un número de investigadores (17,18,19,20,21) han estudiado la relación de -- biotipo a serotipo; origen de aislamiento o susceptibilidad antimicrobiana; y a pesar de estas investigaciones no existen reportes -- que evalúen la asociación de biotipo con todos estos parámetros. - Un análisis de este tipo podría identificar otros factores que son asociados con la invasividad de ciertos biotipos de H. influenzae. Otro aspecto importante para el estudio de H. influenzae es considerar la epidemiología de este organismo en nuestro país,

Calderón y cols en 1980 (48) reportan que la mayor prevalencia de bacterias capsuladas observada en niños menores de tres años y adultos sanos corresponde a H. influenzae y después a S. pneumoniae. En 1981, Guicafre y cols. (53) reportan que la frecuencia de resistencia a drogas antimicrobianas de cepas de H. influenzae y - S. pneumoniae aisladas de portadores sanos va en aumento. En 1982, Salas y cols. (48) determinaron la frecuencia de H. influenzae en - 823 niños sanos y enfermos provenientes de dos guarderías, una del Hospital Infantil y otra de un Centro de Salud, ambos de la Secretaría de Salud, demostrando un alto porcentaje de H. influenzae --

serotipo b tanto en población sana, así como enferma. Además de que constantemente aparecen otros biotipos y serotipos involucrados en este padecimiento.

OBJETIVOS:

- a) Determinar comparativamente la frecuencia del aislamiento de Haemophilus influenzae en población infantil de una guardería y un Hospital del Sector Salud.

- b) Establecer los biotipos y serotipos más frecuentes de H. influenzae en población infantil.

- c) Realizar susceptibilidad a los antibióticos usados más frecuentemente en el tratamiento de H. influenzae y conocer qué porcentaje de cepas produce beta lactamasas.

- d) Correlacionar cuales factores de virulencia son indicadores de la invasividad de H. influenzae, en las condiciones establecidas en este estudio.

GENERALIDADES:

- a) Morfología y bioquímica del Haemophilus influenzae.
- b) Patogenicidad de H. influenzae.
- c) Composición del material capsular de H. influenzae.
- d) Respuesta inmune a enfermedades por H. influenzae.
- e) Inmunoprotección inducida.
- f) Vacunas ribosomales.

GENERALIDADES:

a) Morfología y características bioquímicas de Haemophilus influenzae.

En cuanto a su morfología H. influenzae presenta diversas formas, tanto cocobacilares como filamentosas. Son Gram negativos, no acidófilos, inmóviles y no esporulados. Las cepas aisladas de infecciones invasivas son generalmente capsuladas (27). ... H. influenzae es anaerobio facultativo. Su crecimiento "in vitro" requiere de factores de crecimiento accesorios: Factor X (hemina) y factor V (NAD), H. influenzae requiere estos dos factores y algunas otras especies del género requieren sólo una de ellas. El desarrollo de colonias visibles en gelosa sangre sólo se produce alrededor de bacterias que secretan el factor V, como por ejemplo estafilococos; a este fenómeno se le conoce como satelitismo. Los medios de cultivo comúnmente empleados para el aislamiento de este organismo son gelosa chocolate, gelosa de Levinthal, gelosa BHI-Fildes. Casi todas las cepas crecen mejor en una atmósfera húmeda con 5 al 10% de CO₂ adicionado. El rango de temperatura óptima de crecimiento está entre 33 a 37°C.

Características bioquímicas.

Este organismo tiene la capacidad de utilizar varios hidratos de carbono como la glucosa, la lactosa y la gelactosa. Las cepas de algunas especies producen gas en medios de fermentación. Todas las cepas reducen nitratos. La mayoría de las -

cepas de H. influenzae son oxidasa y catalasa positivas. H. influenzae y H. parainfluenzae pueden subdividirse en numerosos biotipos sobre la base de tres reacciones bioquímicas: -- Producción de indol, actividad de ureasa y actividad de ornitina descarboxilasa. En particular los biotipos de H. influenzae han demostrado relación con la fuente de aislamiento (22). Se necesitan más estudios para establecer con mayor precisión la relación entre estos biotipos y sus capacidades de virulencia. Actualmente Kilian (19) describió un esquema bioquímico de H. influenzae que puede ser dividido de seis biotipos. -- Otros estudios (30,31) han demostrado que H. influenzae biotipo I o biotipo II fueron recuperados principalmente de adultos o pacientes infantiles con enfermedad sistémica, y los restantes biotipos fueron asociados más comúnmente con otras infecciones localizadas o como comensales en el tracto respiratorio superior.

b) Patogenicidad de Haemophilus influenzae.

La meningitis bacteriana debida a H. influenzae es una de las enfermedades que son de un alto riesgo para la población pediátrica y se requiere por lo tanto elevada vigilancia epidemiológica. El uso de antibióticos ha reducido la mortalidad de la enfermedad en más del 90% (32). Sin embargo del 30 al 50% de los pacientes que se recuperan de la enfermedad sufren de secuelas neurológicas permanentes entre las que tenemos ceguera, sordera, retraso mental e hidrocefalia. Actualmente H. influenzae serotipo b es la causa principal de meningitis epidémica en los Estados Unidos de Norteamérica, ocurriendo -

principalmente en niños entre los 3 meses a 4 años de edad -- (33). Durante los últimos 30 años la mortalidad ha disminuido debido al uso de agentes quimioterapéuticos como las cefalosporinas, ampicilina y cloranfenicol. La resistencia a los antibióticos está mediada por enzimas y específicamente en el caso de la ampicilina y cefalosporinas es debida a la producción de beta lactamasas. La información genética para la producción de la enzima es transportada en un plásmido que es -- transferido a otras cepas por conjugación. La mortalidad debida a H. influenzae y la resistencia a los antibióticos indica la necesidad de un control más efectivo de las enfermedades causadas por H. influenzae. Otro factor de virulencia que ha sido propuesto (34) es una toxina de H. influenzae que produce síntomas en animales de laboratorio similares a los observados en el humano. Otros investigadores (35) han observado que las cepas aisladas de las meninges fueron virulentas - en ratones, en referencia a las aisladas del tracto respiratorio, las cuales fueron avirulentas. Las cepas de H. influenzae virulentas recuperadas de animales de laboratorio en un medio de cultivo como la gelosa BHI-Fildes son de aspecto liso (s) y en general son grandes, agranulares e iridiscentes. Cuando se subcultivaron en medios artificiales, las colonias lisas aparecen pequeñas, granulares, más discretas e iridiscentes, estas se denominan colonias rugosas (R) y son avirulentas para los animales de laboratorio. Para explicar la patogenicidad y las diferencias antigénicas entre organismos S y R, Pittman (36) postuló que la presencia de una cápsula -

en organismos S la cual indica la virulencia de estos organismos. Seis tipos antigénicos de cápsula han sido demostrados y designados con las letras de la "a" a la "f". Después que Pittman postuló la existencia de una cápsula, otros investigadores identificaron y caracterizaron el material capsular. Dingle y Fothergill (10) aislaron el material capsular de los organismos del serotipo b y determinaron que se trataba de un polisacárido. Ellos diferenciaron tres variedades de colonias del serotipo b: Una cepa mucóide larga, opaca e iridiscente y fue elevadamente virulenta. Esta fue equivalente a la cepa S de Pittman. Y colonias lisas y rugosas equivalentes a la cepa R de Pittman. Estas colonias fueron virulentas para el hombre. Las colonias M aisladas de pacientes con meningitis y/o bacteriemia. Las colonias M no fueron estables después del aislamiento primario convirtiéndose a cepas S. Las cepas S son encontradas en el tracto respiratorio superior y producen infecciones respiratorias agudas y graves en el hombre y en el ratón. Las cepas R se obtienen de H. influenzae que han sido mantenidos en medios de cultivo artificiales por un prolongado tiempo y son completamente avirulentas en el modelo animal. Haciendo un pase a ratón, las cepas R pueden cambiar a una forma S pero no a la forma M. Estudios recientes (38) han revelado que las cepas M tienen 78 ng/mg de material capsular, las cepas S contienen 20 ng/mg y las colonias R contienen poco material capsular 4 ng/mg.

c) Composición del material capsular de H. influenzae.

Los materiales capsulares de los serotipos a,b,c,d,e, y f han

sido aislados e identificados como polisacáridos, todos tienen una hexosa excepto el serotipo b (39). La sustancia capsular del serotipo b, el más frecuente encontrado en las meningitis por H influenzae da reacción positiva al orcinol, indicando que contiene ribosa. Las unidades de ribosa unidas por puentes de éster 3.5 de ácido fosfórico, formando una cadena de poliribosilribitolfosfato (PRP). Pares de cadenas de PRP fueron unidas por uniones glicosídicas 1,1: Esta estructura es similar al ácido ribonucleico, donde el PRP se parece al ARN, que es degradado por ribonucleasa. En los serotipos a, c, y f se encontró que tienen poliglucosfosfato, polilactofosfato y fosfato de polilactosamina respectivamente. La sustancia capsular del tipo d tiene una hexosa pero no tiene fosfato. Todas las formas capsuladas fueron virulentas para los ratones. La razón para la predominancia del serotipo b en varias infecciones en el hombre queda aún sin resolver, aunque se plantean algunas hipótesis entre las que se encuentran las siguientes: PRP es el material capsular de H. influenzae que contiene una pentosa en lugar de una hexosa. El reconocimiento del PRP por el huésped como una sustancia extraña es posible se vea retardada debida a la similitud que existe entre PRP y ARN. Otra posibilidad es que los organismos del serotipo b sean capaces de desplazar cepas de otros serotipos en el tracto respiratorio de portadores. Se propone otra hipótesis en que las células del serotipo b producen una sustancia bactericida para los serotipos a,c,d,e, y f como también para las cepas no capsuladas. Además en la actualidad algunos ---

otros antígenos no capsulares del serotipo b ya han sido identificados, los cuales participan como factores importantes de la invasividad. Recientemente Argaman y cols. (4) han reportado varias especies de bacterias que contienen poliribitol--folfato el cual cruza serológicamente con PRP. Esta observación ha permitido un análisis de la composición de la sustancia capsular del serotipo b por Crisel (40), él encontró ribosa, ribitol y fosfato en cantidades equimoleculares y propuso que el material capsular del serotipo b es un poliribosilribi tolfosfato.

d) Respuesta inmune a enfermedades por H. influenzae.

Las principales enfermedades en las cuales debe darse atención a la respuesta inmune a H. influenzae son:

- a) Meningitis.
- b) Otitis.
- c) Enfermedades respiratorias.
- d) Celulitis.

a) Meningitis.

La protección de la meningitis por H. influenzae ha sido asociado principalmente con inmunidad humoral. El papel de inmunidad mediada por anticuerpos fue establecido por protección pasiva en animales de experimentación y seroterapia sucesiva en el hombre. Personas deficientes en inmunoglobulinas, como por ejemplo agammaglobulinemia, tienen infecciones repetidas (41). Precipitinas, aglutininas, opsoninas y anticuerpos bacteri-

cidas anti-H. influenzae han sido identificados (22).- Aglutininas son dirigidas contra el PRP, el cual es el componente esencial del material capsular del serotipo b que causa virtualmente meningitis. Este anticuerpo fué inicialmente detectado por la técnica de precipitación usando células lavadas del serotipo b o por aglutinación directa de las células del serotipo b (42). - Los exámenes de aglutinación en placa o laminilla son usadas para serotipificar organismos directamente cultivados del líquido cefalorraquídeo. Varias precauciones deben de tomarse para asegurar la especificidad de la reacción. El suero debe ser preparado usando animales vírgenes inmunológicamente. Los conejos son buenas especies para estimular la producción de anticuerpos anti-PRP. Organismos muertos capsulados son comunmente usados como inmunógenos. Los organismos usados para inducir la respuesta inmune y para tipificar deberán ser desarrollados en medios de cultivo sólido, en lugar de medios de cultivo líquido, ya que en éstos -- pierden su material capsular (43). Los organismos usados como inmunógenos deben ser aislados recientemente de animales infectados ya que aquéllos mantenidos en medios artificiales promoverán su transformación de fase S a R, resultando con pérdida de su material capsular. La reacción de aglutinación es rápida a temperatura ambiente pero no debe realizarse a 37°C porque se pierde especificidad de la misma. Otra reacción inmu-

nológica denominada hinchazón de la cápsula involucra una reacción de precipitación. Esta prueba es generalmente usada para rápida identificación de organismos - en el líquido cefalorraquídeo (LCR). La presencia de PRP o anticuerpos anti-PRP también pueden ser determinados por varios métodos: hemaglutinación pasiva, inmunoelectroforesis y radioinmunoensayo. En la hemaglutinación pasiva, eritrocitos cubiertos con PRP son aglutinados por anticuerpos anti-H influenzae serotipo b - (44). En la reacción de inhibición de la hemaglutinación pasiva, los títulos de aglutinación por el anticuerpo son reducidos por preincubación con PRP (45). - Esta prueba se usa rutinariamente en el laboratorio para detectar PRP en el líquido cefalorraquídeo. Si el PRP está presente en el LCR entonces este antígeno se combina con el anticuerpo y como consecuencia el título de hemaglutinación pasiva disminuye. Este método simplificado y extendido posteriormente por Turck y Grein (46). Radioinmunoensayo es el método más sensible para detectar anticuerpos anti-PRP (47). Existe otra prueba conocida la cual mide la unión del PRP marcado radiactivamente a sulfato de amonio; por lo tanto se precipitan las inmunoglobulinas. Empleando 100 ml. de suero, este exámen resulta ser 30 veces más sensible que la hemaglutinación pasiva a 4°C y está sujeta a un menor número de reacciones inespecíficas. La inmunodifusión radial es más sensible que la inhibición-

de la hemaglutinación pasiva, pero menos sensible que radioinmunoanálisis. En general la actividad opsonizante de un antisuero facilita la fagocitosis de organismos por los leucocitos. Es difícil separar el efecto de anticuerpos opsonizantes del de anticuerpos bactericidas, en donde ambos son unidos por la adición -- del complemento. La activación de opsonización por -- complemento puede ocurrir por la ruta alterna C3, además se ha observado que la deficiencia en C2 (28) conserva niveles normales de actividad opsonizante, sin embargo deficiencias en C3 pierden en esta actividad-- (47). La presencia de PRP en la superficie bacteriana estimula la producción de anticuerpos opsonizantes, pero la absorción de antisuero con PRP no elimina toda la actividad opsonizante (48).

Esta observación indica la presencia de un mínimo de dos tipos de anticuerpos opsonizantes. Donde la absorción con PRP no puede eliminar toda actividad opsonizante, un tipo de anticuerpo debe estar dirigido contra un antígeno no capsular (49). La actividad de opsonización en suero de individuos inmunizados con PRP estuvo presente en la fracción IgG, pero no en la fracción IgM. Esto al parecer significa que los anticuerpos opsonizantes requieren de la actividad de peptidasa que se manifiesta con la unión del factor C3 del complemento, para lograr una fagocitosis óptima (5). Sin embargo es difícil de separar las actividades bactericidas y opsonizantes de un suero, por ejemplo bajo condiciones de un desarrollo bacteriano, donde el suero inmune promueve actividad fagocítica el cual elimina la actividad bactericida (51). El papel del anticuerpo bactericida en infecciones por H. influenzae queda aún todavía sin resolverse. Wight y Ward (52) encontraron que la inyección intratecal del suero inmune no fue suficiente para controlar la meningitis. Las reacciones antígeno-anticuerpo requieren la medición más precisa empleando complemento. La actividad bactericida del suero contra una cepa acapsulada fue inhibida por un filtrado del cultivo del organismo homólogo de una cepa acapsulada. Parece ser que el material capsular protege al organismo contra la acción bactericida, es por esto que los organismos capsulados son relativamente resistentes al anticuerpo bactericida (53). Paralelamente el PRP previene la penetración del anticuerpo bactericida dirigido al sitio susceptible. Gump y cols. (54) reportaron que los anticuerpos bactericidas fueron específicos de la cepa. Tonevall (55) encontró un antígeno somático específico de especie

que fija complemento. Este autor propone la hipótesis de que los anticuerpos bactericidas son dirigidos contra antígenos somáticos. Smith y cols. (3) reportaron que de 49 sueros absorbidos con PRP, la actividad bactericida fué eliminada en solamente un suero y reducido en otros ocho sueros. Sin embargo cuando absorbieron estos mismos sueros con una cepa no capsulada, la actividad fue reducida en 48 de 49 sueros. Norden (57) encontró que la absorción con PRP redujo marcadamente la actividad bactericida en solamente uno de tres sueros. Estos resultados indican la presencia de más de un anticuerpo bactericida. El antisuero producido contra H. influenzae serotipo b en el caballo no fija complemento como el antisuero de conejo (58). Cuando un suero fresco de humano, conejo o caballo sirve como una fuente de complemento, puede matar organismos del serotipo b (59). Cepas del serotipo b difieren en susceptibilidad al anticuerpo bactericida presente de un suero particular. El efecto de absorción con PRP sobre la actividad bactericida también difiere entre cepas y el suero utilizado. Varios factores influyen sobre la evaluación de los anticuerpos bactericidas por ejemplo el calor puede inactivar o destruir la actividad bactericida y ésta no es restaurada por la adición de complemento. Entonces algunos anticuerpos bactericidas o bien complemento pueden ser lábiles al calor (60). Investigadores en estudios recientes (20,21) han notado que la meningitis por H. influenzae ocurre preferentemente en niños lactantes, de 193 casos reportados en Estados Unidos de Norteamérica; 152 fueron niños menores de dos años, de los cuales 41 tenían más de dos años. La meningitis en el primer grupo fué asociado con un porcentaje del 97% de mortalidad y

en el grupo de mayor de edad 29% de mortalidad. Cooke (12) observó que el suero de niños mayores de dos años de edad, y adultos -- contienen anticuerpos anti H. influenzae que fijan complemento, -- más frecuentemente que sueros de niños de uno a cinco años, pero -- la relación entre la incidencia de la enfermedad y nivel de anticuerpos de anti H. influenzae no fue estudiada, Fothergill y Wright (10) asociaron la protección tardía con anticuerpos bactericidas; estos autores encontraron que la sangre de niños recién nacidos -- era bactericida para una cepa capsulada de H. influenzae. Niños -- entre dos meses a tres años perdieron los anticuerpos bactericidas, sin embargo sangre de niños mayores usualmente tiene algún grado de actividad. Todas las muestras sanguíneas de personas de más de diez años, nueve niños y 16 adultos contenían este tipo de anticuerpos. Estos resultados correlacionaron bien con aquéllos -- observados por Rivera (1) encontrándose que aproximadamente 80% -- de casos de meningitis ocurrieron entre dos meses y tres años de edad. Fothergill y Wright propusieron que los recién nacidos estuvieron protegidos por anticuerpos bactericidas adquiridos pasivamente a través de la placenta. Después de dos meses estos anticuerpos desaparecen gradualmente y los niños son susceptibles a -- la infección. La inmunidad activa fue adquirida después de dos a tres años de edad, y todos los adultos fueron inmunes a la enfermedad. Entonces la correlación entre la inmunidad con los niveles de anticuerpos bactericidas, fue así confirmada. Mpairwe -- (58,59) encontró que existían anticuerpos bactericidas en todas -- las muestras sanguíneas de recién nacidos y niños de más de 5 -- años, pero no tomó muestras de niños entre 2 meses a 3 años. --

Smith y Anderson (5) encontraron actividad bactericida en varios sueros de adultos. Una distribución similar de anticuerpos fue reportado por Tunevall (54) para anticuerpos fijadores de complemento dirigidos contra un antígeno específico de especie de H. influenzae. Otros investigadores (46,47) están en desacuerdo con la conclusión de que los anticuerpos bactericidas son protectores. Sin embargo los anticuerpos bactericidas han sido correlacionados con inmunidad, la cual puede ser debida a la participación de este anticuerpo en el mismo suero. La susceptibilidad de ratas recién nacidas a H. influenzae serotipo b no correlaciona bien con los títulos de anticuerpos bactericidas en el suero (49). Otros autores reportan infecciones de H. influenzae en adultos y neonatos, quienes perdieron actividad bactericida en su suero (46,59). Aquellos quienes se suponen el papel protector de los anticuerpos bactericidas responden en favor de la respuesta inmune. La inactivación por calor del suero inmune puede destruir algunos factores bactericidas, los cuales se ponen en evidencia al adicionar complemento de cuyos, el cual es incapaz de activar el antisuero bactericida del humano (11). La baja incidencia de anticuerpos bactericidas en adultos da como consecuencia un incremento de enfermedades por H. influenzae no nada más en adultos, sino también en neonatos (26). La susceptibilidad de acuerdo a la edad del humano y del conejo a las infecciones por H. influenzae serotipo b, ha sido correlacionado con la presencia de anticuerpos anti-PRP, más que anticuerpos bactericidas (33). Los estudios de meningitis por H. influenzae en el humano, revelan que 80% de los casos ocurren entre dos meses y tres años de edad. La meningitis por H. influenzae es general-

mente de tipo endémica más que epidémica (31). La sola presencia de cepas acapsuladas en el tracto nasofaríngeo en "niños susceptibles" no indica una infección activa. Poblaciones cerradas de niños, como son los centros de atención de niños por ejemplo guarderías, permiten que existan portadores en más del 50% los cuales incrementan la incidencia de la enfermedad (12). También ambos factores genéticos y ambientales han sido implicados en la epidemiología de meningitis por H. influenzae. Una elevada incidencia de portadores de H. influenzae serotipo b ha sido reportado en familias, en las cuales hubo un caso de meningitis, los portadores tienden a aumentar en familias de tres o más niños enfermos y la infección del tracto respiratorio superior precede a las enfermedades meningíticas (20). Las cepas de H. influenzae del serotipo b pueden ser transferidas de una familia a otra sucesivamente de tal manera que se va incrementando su virulencia y suponiendo que exista un miembro susceptible de la familia, se ocasiona en este individuo enfermedad invasiva (22). Tres por ciento de las familias en las cuales hubo un caso de meningitis por H. influenzae serotipo b aún se encuentran en estudio (23). Recientemente una meningitis por H. influenzae del serotipo b ocurrió en una población de niños enfermos, en los que cinco casos ocurrieron de un total de 28 a 32 niños (54). Michaels y Schults (57) encontraron que las meningitis por H. influenzae son más frecuentes en familias de pocos ingresos económicos. La susceptibilidad a las enfermedades por H. influenzae ha sido atribuido a factores genéticos. Varios investigadores han encontrado que los individuos de raza negra presentan de dos a cuatro veces incidencias más altas y porcentajes -

mayores de muerte por meningitis con H. influenzae, y que los indios americanos tienen un porcentaje de muerte diez veces mayor -- que la que presentan los blancos (14,15,23). Estos resultados pueden ser atribuidos a diferencias raciales en susceptibilidad. -- Otros factores pueden ser la pobreza, el hacinamiento y el número de portadores en cada raza humana. También factores genéticos son envueltos en el hombre con deficiencias en la producción de inmunoglobulinas, lo que eleva el riesgo de adquirir enfermedades, incluyendo las causadas por el H. influenzae serotipo b (51,53). La importancia de los factores genéticos es sugerida debido a que en -- los portadores hermanos se descubre meningitis donde un tercer portador no es afectado (64). Wisnant y cols.(16) encontraron deficiencias en la distribución de ciertos antígenos de histocompatibilidad en linfocitos y antígenos MNS en eritrocitos de pacientes que tienen meningitis, epiglottitis comparados con los encontrados en sujetos control. Los mecanismos por el cual estos antígenos afectan la susceptibilidad a enfermedades por H. influenzae serotipo b no está definido. Las deficiencias son postuladas debido a deficiencias inmunológicas. Pacientes recuperados de meningitis por H. influenzae generalmente no tenían títulos elevados de anticuerpos. Anticuerpos bactericidas no eran detectables después de cuatro días sin embargo los títulos se elevan después de 16 días(23). Niños menores de dos años con meningitis no tienen incremento en anticuerpos bactericidas o hemaglutininas demostradas en muestras de sueros tomados durante los primeros cinco días, o determinados en sueros de sujetos convalescientes tomados 11 días después (29). Sin embargo un tercio de estos niños no responde desde los seis

hasta los 23 meses después. Niños mayores de edad tienden a incrementar sus títulos de anticuerpos. Estos mismos resultados han sido confirmados por otros autores (23,26,29,35). El uso de radioinmunoanálisis para detectar anticuerpos anti-PRP ha revelado niveles bajos en 60% de los niños menores de un año y convalescientes de meningitis (29). Norden y cols.(26) encontraron que en niños menores de dos años recuperados de meningitis, el 15% tenían anticuerpos bactericidas y el 30% de anticuerpos anti-PRP demostrados por radioinmunoanálisis entre 14 a 17 días. Estos resultados fueron contrastados con el obtenido en el 55% al 100% de los niños mayores de dos años quienes demostraron anticuerpos bactericidas determinados por radioinmunoanálisis contra PRP. Niños que se habían recuperado de meningitis no respondieron a la inoculación de PRP (16), pero la inoculación de un antígeno de H. influenzae en un -- adulto seis meses después de la infección, indujo un elevado título de anticuerpos bactericidas. Varias explicaciones han sido formuladas en relación al decremento del anticuerpo involucrado en la respuesta inmune de pacientes con meningitis por H. influenzae. -- Farrand (12) propuso que los pacientes deberán ser tratados con -- PRP al inicio de la respuesta de anticuerpos. Esta proposición no fue aceptada por Norden (50-51) él ha sugerido la idea de que la -- infección con H. influenzae serotipo b representa una sobredosis -- de antígeno produciendo una "parálisis inmune". Niños que sobrevi -- vieron a la meningitis generalmente no respondieron a una vacuna -- ción con PRP; sin embargo, personas sanas respondieron bien a esta -- misma vacuna. Estos resultados indican un tipo permanente de pará -- lisis inmune "pero no explican en realidad la reinfección. Una --

proposición más atractiva envuelve una "parálisis inmune" temporal donde los anticuerpos después de la síntesis son unidos por un antígeno, permaneciendo estos complejos en el huésped. Prolongada estimulación con antígeno fué correlacionada con fiebre protectora, síntomas severos neurológicos y una pobre respuesta de anticuerpos dirigidos contra PRP. South (46) sugiere que la pérdida de respuesta inmune en niños, puede ser debida a la inmadurez del sistema inmune. Los niños pueden no responder a H. influenzae porque su sistema inmune no reconoce el antígeno de H. influenzae como extraño por lo tanto es incapaz de responder con la producción de anticuerpos. Esta explicación no parece ser para pacientes con meningitis de más de dos años quienes no responden a la inmunización, en donde los niños de la misma edad del grupo control sí respondieron. La permanencia de antígenos de H. influenzae en los tejidos de pacientes, ofrecen una mejor explicación, a la pérdida de producción de anticuerpos en pacientes con meningitis. La pregunta en cuanto a que los anticuerpos bactericidas o anticapsulares son protectores, queda aún sin resolverse. Fothergill y Wright -- (10) reportaron que los anticuerpos bactericidas están ausentes sólo en niños de dos meses a 3 años y que el 80% de los casos de meningitis por H. influenzae ocurren en esta parte de la población. Mpairwe (58,59) confirmó estos resultados y reportó que en niños mayores de 5 años el 30% tienen anticuerpos anticapsulares y en el 85% presentan anticuerpos bactericidas. Callier y cols (54) reportan que las madres de niños menores de 4 meses de edad, quienes tenían infecciones sistémicas por H. influenzae presentaron títulos bajos de anticuerpos bactericidas. De manera similar el suero de

un adulto con meningitis por H. influenzae no presentó anticuerpos bactericidas (57). Estos datos sugieren la formulación de una hipótesis sobre la necesidad de un anticuerpo bactericida que correlaciona con la resistencia a la infección. Por otra parte Norden (12) encontró niños susceptibles con títulos bajos de anticuerpos bactericidas, también varios adultos presentaron títulos bajos de anticuerpos bactericidas (58,59). En donde un decremento en la -- permanencia de anticuerpos bactericidas en este grupo no ha sido -- corroborada por un incremento de infecciones por H. influenzae. -- Surge de nuevo la pregunta sobre si los anticuerpos bactericidas -- son protectores (12). Smith y cols.(5) encontraron que la permanencia de anticuerpos bactericidas varía geográficamente en Africa, Europa y Latinoamérica en las diferentes poblaciones de adultos. -- Otros estudios han reportado la presencia de anticuerpos bactericidas en pacientes con meningitis en el momento de su admisión - - - (29,33) y en el laboratorio se ha demostrado que la presencia de -- anticuerpos bactericidas en ratas no correlaciona con la menor susceptibilidad a las infecciones por H. influenzae (7,11). Estos estudios demuestran que el PRP es un importante factor de virulencia y que los anticuerpos dirigidos contra este material capsular han sido propuestos como protectores. Mpairwe (58,59) reportó una baja incidencia de anticuerpos anti-PRP en niños de 5 años de edad, pero otros investigadores han observado títulos en casi todos los adultos y neonatos, también demostraron títulos bajos en niños de 4 meses a 3 años de edad (13,23,33). Schneerson y cols.(4) inmunizaron adultos con PRP y observaron títulos elevados de anticuerpos anti-PRP. El suero de estos adultos demostraron tener actividades protectoras en el ratón, contra el reto de H. influenzae serotipo-

b. La absorción de cada uno de estos sueros con PRP purificado, - abolió esta actividad. En donde esta prueba de protección fue rea-
lizada diluyendo el suero y protegió dos de diez ratones, el signi-
ficado de la protección está a discusión. Un alto grado de corre-
lación fue observado en conejos, entre la susceptibilidad a la sep-
ticemia por H. influenzae y el título de anticuerpos anti-PRP (12).
La inmunización pasiva con suero provee títulos elevados de anti-
cuerpos anticapsulares, los cuales confieren protección contra el-
reto de organismos vivos (29). Similarmente, suero de adultos in-
munizados con PRP protegió a ratas contra una dosis letal de orga-
nismos vivos (25). Ciertos investigadores han sugerido que 0.1 a-
0.2 mg. de anticuerpos anti-PRP/ml. de suero son requeridos para -
la protección significativa del hombre (6,13,58). Estos datos in-
dican que anticuerpos anticapsulares más que bactericidas son pro-
ectores. En donde los anticuerpos anticapsulares estimulados por
inmunización con PRP, también son bactericidas (62), por lo tanto
existe la posibilidad de que el anticuerpo protector puede ser si-
multáneamente anticapsular y bactericida.

Por otra parte algunos investigadores encontraron que el PRP -
estimula ambas células T y B (5) o células T pero con células B --
(5). La transformación de linfocitos humanos T por antígenos deri-
vados de H. influenzae incrementa la posibilidad de que la inmu-
nidad celular juegue un papel importante en las infecciones por H.in-
fluenzae. La importancia que tienen los anticuerpos opsonizantes-
y el complemento en el proceso de la infección sigue aún sin poder
determinarse con precisión. Alexander (2) notó que la administra-
ción sucesiva de suero inmune va acompañada por fagocitosis de or-

ganismos en el fluido espinal. Anticuerpos opsonizantes, dirigidos contra el PRP y los antígenos somáticos, están presentes en el suero de adultos normales (52,54,59). La circulación de H.influenzae en el torrente sanguíneo desencadena la fagocitosis influenciando que los anticuerpos bactericidas resulten inefectivos (13). Aún es desconocido si los anticuerpos opsonizantes son efectivos en clarificar organismos del huésped. La importancia del complemento se reconoció por Cooke (20) cuando una alta incidencia de anticuerpos fijadores de complemento fue hallada en adultos. El papel del complemento in vivo está relacionado a los anticuerpos bactericidas con los cuales el complemento actúa como un cofactor indispensable (23). Algunos sueros con títulos elevados de anticuerpos bactericidas no tuvieron actividad como el antisuero anti-PRP en el tratamiento de varias infecciones (10). Los anticuerpos bactericidas pueden ser importantes en los estados tempranos de la infección (30). Por lo que ha sido establecido que el complemento no elimina a los organismos en la ausencia de anticuerpos por la vía alterna de C3 (33).

b) Otitis Media.

H. influenzae está comúnmente asociado con otitis media en los recién nacidos y niños menores de tres años de edad. Hirsch (32) reconoce la importancia de H. influenzae en otitis media - demostrando que los organismos han sido aislados en 12 a 30% de los casos estudiados (27,29,31). H. influenzae puede ser aislado en el 40% de los casos que se presentaron en niños entre 1 y 6 años de edad (30,35). Bjuggren y Tunevall (19) aislaron 17 cepas capsuladas de H. influenzae serotipo b y 9 cepas acapsula

das de 178 niños, concluyendo que las cepas capsuladas son patógenos primarios mientras que las cepas acapsuladas son probablemente invasores secundarios. En subsecuentes estudios la mayoría de las cepas de H. influenzae acapsuladas causan otitis media (31,33,34,36). Una diferencia importante con las técnicas para la colección de muestras ha sido posiblemente la responsable de las diferencias encontradas en la proporción de cepas -- acapsuladas a capsuladas aisladas. Algunos investigadores (30, 32) usando hisopos nasales para muestrear, aislaron organismos capsulados. En estudios recientes se han usado hisopos para -- muestrear otitis medias, encontrándose un predominio de cepas - acapsuladas. La posibilidad de que organismos capsulados su- -fran transformación de S→R en cultivo fue investigado por - -- Schneerson y cols.(4). Cepas acapsuladas aisladas de exudados de oído medio fueron inoculadas en ratón para inducir la síntesis de cápsula tipo específico. Después de 8 pases, el material capsular tipo específico no fue detectado. La respuesta inmune a H. influenzae en otitis media no ha sido tan extensamente estudiado como en el caso de la meningitis. Bjuggren y Tunevall-(26) reportaron que la recurrencia de otitis media en niños, de bida a H. influenzae es importante. Cuando el suero fue examinado para medir su actividad de fijación de complemento, los ni ños y los adultos generalmente presentan un elevado título de - anticuerpos fijadores de complemento y no sufren infecciones re currentes (33). Branefors+Helander y cols.(20) describieron - una técnica para la fijación del complemento a los anticuerpos- presentes en el suero de niños sospechosos de tener otitis me--

dia, usando una mezcla de 20 cepas acapsuladas de H. influenzae. Una elevación en el título era indicativo de una infección con H. influenzae, una baja en el título es encontrado en pacientes con una respuesta inmune débil. No hubo diferencias en las inmunoglobulinas de los niños con otitis media por H. influenzae (27). Sloyer y cols. (20) encontraron que la mitad de los sueros y tres cuartas partes del suero de pacientes convalescientes de dos años de edad presentan inmunoglobulinas específicas de las clases de IgG, IgM e IgA, dirigidas contra H. influenzae.

c) Enfermedades Respiratorias:

No existe en la actualidad área de investigación concerniente a la patogenicidad de H. influenzae que haya engendrado mayor controversia en años recientes, como la relación entre H. influenzae y enfermedades crónicas respiratorias. Lord (49) reportó que en las personas con bronquitis debida a H. influenzae este organismo puede ser aislado del 30% de los caeos. Luestcher (57) aisló H. influenzae en cultivo puro de 28.5% de los casos con infecciones del tracto respiratorio inferior. Otros investigadores han reportado el predominio de H. influenzae en el esputo de personas con bronquiectasis y bronquitis crónica (45,59). Está bien establecido en la literatura que la presencia de un organismo en el sitio de la infección no indica necesariamente que el organismo es la causa primaria de la enfermedad. El organismo puede actuar como un invasor secundario, si el agente etiológico primario responsable de la lesión no se desarrolla en los medios de cultivo rutinarios.

Cuando el organismo es cultivado del esputo, la muestra puede estar contaminada con la flora normal de la nasofaringe. Resulta claro que el H. influenzae no es contaminante cuando las muestras provienen de una broncoscopia (22). Hers (23) ha podido fotografiar este organismo en la mucosa bronquial y las cepas de organismos aislados han sido capsuladas (45), sin embargo Holdway y Turck (10) encontraron de 10 a 15 cepas de H. influenzae serotipo f aisladas de personas con bronquitis.

Virtue y cols. (44) quienes demostraron la transformación de linfocitos en pacientes asmáticos con el antígeno de H. influenzae en comparación a los linfocitos control, los cuales no son estimulados. Denny (44) encontró que H. influenzae produce una sustancia de efecto cilioestático que actúa sobre el epitelio ciliado respiratorio. Este mismo autor sugiere que esta sustancia puede determinar la virulencia de organismos en el sistema respiratorio. Pacientes con enfermedad pulmonar crónica poseen precipitinas contra H. influenzae, las cuales tienen una reacción obstructiva a la inhalación de células de H. influenzae (21). Las reacciones obstructivas se acompañan de los siguientes síntomas: Fiebre, malestar y leucocitosis, y esto puede proseguir hasta 8 horas después. La patogenicidad de H. influenzae en la enfermedad respiratoria crónica sigue sin resolverse. La presencia de este organismo en el esputo y la presencia de anticuerpos en pacientes no demuestra que H. influenzae sea el agente primario de estas enfermedades, sin embargo, es más probable el papel que juega H. influenzae como un invasor secundario.

OTRAS ENFERMEDADES

H. influenzae ha sido asociado con otras enfermedades. Este organismo fue asociado como causa de epiglotitis por Sinclair (54).- organismos del serotipo b fueron recuperados de cultivos sanguíneos durante exámenes in vivo y postmortem. Como en la meningitis, los organismos del serotipo b invaden la epiglotitis de niños y es asociado con bacteriemia (10,26). La susceptibilidad a la enfermedad se presenta en niños entre 2 y 7 años de edad (26,27). La epiglotitis tiene un curso más rápido que la meningitis (6,21). La meningitis por H. influenzae puede proceder de una infección respiratoria superior y los organismos ganan entrada a las meninges por vía hematogena, esto puede ser esperado en la epiglotitis que precede al descubrimiento de las meningitis (3,15) aunque estas enfermedades no ocurren simultáneamente en el mismo individuo (19). -- Whisnant y colaboradores (18,19) han reportado que la distribución del antígeno HLA de histocompatibilidad y antígenos de eritrocitos MNS son sustancialmente diferentes en pacientes con meningitis, pacientes con epiglotitis e individuos normales. Las diferencias en ambas enfermedades pueden ser debidas a diferencias genéticas en las estructuras de las células humanas (42).

H. influenzae serotipo b ha sido implicado en las áreas de los tejidos blandos y como causa de celulitis (37,41). H.influenzae puede ser aislado de sangre y nasofaringe, pero raramente de la lesión de tejido blando de pacientes entre 6 meses y dos años de edad. Solamente en un estudio de H. influenzae del serotipo b pudo ser aislado del borde de una lesión del tejido blando en una --

pierna (39). Los organismos probablemente entran a la sangre a partir de la nasofaringe e invaden áreas del tejido blando. Nelson y Yensburg (13) han reportado una correlación entre otitis media por H. influenzae del serotipo b y celulitis bucal. La otitis media se presenta en un 74% de los pacientes con celulitis bucal, Granoff y Nankervis (27) han reportado meningitis por H. influenzae en pacientes con celulitis por H. influenzae. Los pacientes convalescentes menores de 2 años de edad no exhiben niveles elevados de anticuerpos de H. influenzae serotipo b en su suero.

La artritis séptica por H. influenzae ocurre principalmente en niños menores de 2 años de edad; la incidencia de este padecimiento se ha incrementado en los últimos años (42,44).

e) Inmunoprotección inducida: PRP

La elevada incidencia de las enfermedades producidas por H. influenzae en todo el mundo resulta en una elevada mortalidad, morbilidad y resistencia a los antibióticos, lo cual indica la necesidad de un control por medio de la inmunoprofilaxis. El uso de cepas autólogas de H. influenzae para elaborar vacunas para el hombre con bronquitis crónica no permite la aminoración de síntomas (47). Las enfermedades más peligrosas causadas por H. influenzae están asociadas al serotipo b. El material capsular tipo específico es una elección lógica para el uso de un antígeno capaz de inducir una respuesta inmunoprotectora en el humano. De un grupo de investigadores Robbins y otros grupos como el de Smith han descrito una vacuna con PRP por precipitación con alcohol de extractos acuosos de

H. influenzae. El extracto precipitado de PRP fue purificado por cromatografía en dietilaminoetiléter. El PRP de diferentes cepas de H. influenzae serotipo b no demostró diferencia antigénica - cuando fue examinado contra un antisuero de conejo preparado en células de H. influenzae formalinizadas.

El peso molecular del PRP es aproximadamente de 200 000 daltones-determinado por filtración en gel y 152 000 daltones mediante cen-trifugación analítica. Este polímero resulta ser relativamente - no tóxico y no pirogénico para animales de laboratorio. Smith (5) preparó PRP en cantidades equimoleculares de ribosa y fósforo, p_e pequeñas cantidades de proteínas y ácidos nucleicos y encontró que-este polisacárido tenía un peso molecular de 150 000 daltones. - El PRP no fue pirogénico cuando fue inyectado intravenosamente en conejos. La inmunización de adultos con dosis de PRP entre 0.1 a 0.5 mg. indujo un incremento en el título de anticuerpos anti-PRP y de tipo bactericida (13,15,16). Como se observa en el cuadro - 3 los títulos de anticuerpos anti-PRP en el suero obtenido a las-tres semanas de postinmunización tuvo un título 30 veces más alto que los títulos observados cuando el nivel fue mantenido durante-tres años. El análisis del suero de personas inmunizadas reveló-que los anticuerpos hemaglutinantes PRP específicos eran de la -- clase IgM y los anticuerpos de la clase IgG eran responsables de-la actividad bactericida y de opsonización (16). La incubación - del suero inmune con PRP resultó con pérdida de los anticuerpos - hemaglutinantes (17). Robbins y cols.(11) reportaron que el PRP-estimula la incorporación de timidina radiactiva de los linfoci--tos B y T. Pero Alford (47) encontró que el PRP no transforma --

los linfocitos. La inyección de PRP durante seis a diez meses -- después de la inmunización no eleva los títulos de anticuerpos en adultos inmunizados (22). Un número significativo de voluntarios reaccionaron a la inmunización mediante el desarrollo de eritema en el sitio de la inyección, pero no se presentaron efectos colaterales (17,22). Robbins (11) estimó que el nivel mínimo de protección mediada por anticuerpos anti-PRP es de 0.06 a 0.1 mg. de anticuerpos /ml. de suero en base a la protección pasiva del humano que presenta infecciones de H. influenzae. Este mismo autor demostró que los niveles de anticuerpos anti-PRP mayores de 0.1 mg./ml. en adultos inmunizados confieren inmunoprotección.

El suero de adultos inmunizados con PRP de pacientes recuperados de meningitis, el suero "natural" de personas que no tienen enfermedades por H. influenzae y el suero de un conejo inmunizado con H. influenzae del serotipo b fueron examinados para demostrar protección pasiva en ratones (cuadro 4). Los siguientes sueros: hiperinmune de conejos, de adultos inmunizados y de pacientes recuperados de la infección pueden ser diluidos 1:2 a 1:50 y proteger a ratones contra una dosis mínima letal de H. influenzae del serotipo b. La absorción de suero con PRP abolió la actividad -- protectora (10). La "protección" fue determinada por la supervivencia de dos a diez ratones. Más convincentes fueron los resultados de Anderson y cols. (33) en los cuales 0.4 ml. de suero anti H. influenzae fallaron para proteger 5 ratas del reto y con la -- misma cantidad de suero de animales postinmunizados protegieron -- de 5 a 6 animales. Sin embargo, la inoculación de un amplio intervalo de dosis de PRP purificado, en animales de laboratorio, no --

estimularon una respuesta de anticuerpos o proveyeron inmunoprotección (47,49), Hasta la actualidad, la inmunoprotección activa inducida por PRP no ha sido posible demostrarla. Sin embargo PRP fué afectivo para incrementar títulos de anticuerpos en adultos con niveles de anticuerpos preexistentes. La utilidad del PRP como una vacuna efectiva es dependiente con la respuesta de cada individuo. La inoculación de 10 a 50 mg. de PRP intravenosamente o subcutáneamente en adultos jóvenes indujo un incremento en el título de anticuerpos desde las 3 semanas después de la inmunización (6,58).

C U A D R O 1

Respuesta de anticuerpos en el suero de adultos voluntarios recibiendo inoculaciones de 50 mg. de H. influenzae serotipo b.

Sujeto	Preinmune	Anticuerpo <u>H. influenzae</u> anti-serotipo b (mg/mL)		
		3 semanas	3 meses	3 años
1	0.04	1.4	2.0	6.0
2	0.07	1.3	1.5	2.8
3	0.08	3.2	2.8	3.2
4	0.10	0.4	1.1	1.1
5	0.11	1.2	1.2	1.2
6	0.12	22.0	20.0	20.0
7	0.15	1.7	1.8	2.2
8	0.20	30.0	30.0	30.0
9	0.20	1.8	1.8	0.9
10	0.25	40.0	41.8	39.2
11	0.40	0.7	0.8	2.3
12	0.58	18.0	32.0	5.4
13	0.58	9.3	21.8	39.0
14	0.68	0.8	0.8	1.3
15	0.80	15.0	15.0	5.4
16	0.80	50.0	50.0	41.8
17	0.90	1.5	4.0	N/
18	1.70	65.0	65.0	15.0
19	1.70	14.0	14.0	19.5
20	1.8	40.0	40.0	12.0
Promedio	0.56	15.8	17.37	12.43

NE: No se encontró

FUENTE: De Robbins, J.B.; Parke, J.C.; Schneerson, R. 1973. Pediatric Res. 7, 103-106.

C U A D R O 2Actividad protectora en el ratón del suero anti- H. influenzae

SUERO	Origen de Anticuerpo capsular	Dilución del Suero protector	Título de Hemaglutinina
1	Inmunización	1:10	1:128
2	Inmunización	1:5	1:128
3	Inmunización	1:5	1:64
4	Infeción	1:5	1:64
5	Infeción	1:5	1:64
6	Infeción	1:2	1:16
7	"Natural"	1:2	1:32
8	"Natural"	1:2	1:64
9	De conejo hiperimmune	1:5	1:1600

FUENTE: Schneerson, R.; Rodríguez, L.P.; Parke, J.C. Jr. y Robbins, J.B; 1971. J. Immunol., 107-108. The Williams and Wilkins - Baltimore.

En contraste, los títulos de anticuerpos en adultos descienden después de dos meses. La respuesta de anticuerpos a PRP fué dependiente de la edad. El 70% de los niños de 13 a 24 meses y 87% de los niños más grandes respondieron a la vacunación (23,30). Niños con títulos elevados previos a la inmunización respondieron pobremente a dosis bajas de PRP. Norden y cols (10) reportaron que uno de cada ocho niños menores de dos años de edad respondieron con un incremento en el título de anticuerpos después de la vacunación con PRP, el incremento observado fué 8 a 12 veces mayores que en niños de dos años de edad. Los niños recuperados de la epiglotitis respondieron a la vacunación, de los cuales solamente uno de diez niños recuperados de meningitis respondieron. La incorporación de PRP en la vacuna de la difteria-pertussis-tétanos (DPT), provocó que el PRP resultara ser poco inmunogénico(4).

Los estudios recientes han confirmado que niños de menos de dos años de edad, no han desarrollado una respuesta inmune importante al PRP o vacuna (4). El 70% de los casos de meningitis por H. -- Influenzae ocurre en niños de menos de dos años de edad, el PRP puede ser un hapteno, que requiere la participación de un acarreador, lo cual le confiere la propiedad de ser inmunogénico. Anderson y Smith (5) han acoplado un PRP a una molécula de peso, este complejo fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en conejos (46).

DISEÑO EXPERIMENTAL.

MATERIAL Y METODOS.

MEDIOS DE CULTIVO.

- 1) Medio de transporte de Stuart (Bioxon).
- 2) Medios para el primoaislamiento y conservación:
 - a) Gelosa Chocolate: Base de agar GC (Bioxon); Hemoglobina al 2% (Bioxon); polienriquecimiento al 1% (Bioxon); Bacitracina- 21,000 U./l. (0.3 g/l) (Russell S.A.).
 - b) Gelosa sangre de caballo al 5%: Base de agar soya tripticasa- (Bioxon) + 50 ml. de sangre desfibrinada de caballo.
 - c) Infusión cerebro corazón (Bioxon) + Glicerol al 15% (Merck).
- 3) Medios para la identificación de Biotipos.
 - a) Gelosa Soya tripticasa (Bioxon) para prueba de requerimiento de los factores X y V.
 - b) Prueba de porfirinas: Preparación de solución amortiguadora - pH=6.9. Solución A: Fosfato monobásico de sodio $\text{NaHPO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (J.T.Baker) 27.8 g/1000 ml. de H_2O . Solución B: Fosfato dibásico de sodio (J.T. Baker) 53.65 g. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en - - 1000 ml. de H_2O . Poner 45 ml. de solución A + 55 ml. de solución B se aforan a un total de 200 ml., ajustar el pH a 6.9.- Pesar 0.03352 grs. de ácido delta aminolevulínico (Sigma A) y 0.01972 grs. de sulfato de magnesio; disolver en 100 ml. de solución amortiguadora de fosfatos.
 - c) Descarboxilación de la ornitina: 1 gr. de base de Möller - - (Bioxon) + Ornitina al 1% (Merck) + 60 ml. de líquido de Fil-

des al 5% para cada tubo.

- d) Caldo triptofano: Base de Möler 1 gr. + Triptofano al 1% + 60 ml. de líquido de Fildes al 5%.
- e) Prueba de la ureasa: Solución reguladora de fosfatos pH 7.4 + urea al 1% (J.T. Baker) esterilizada por filtración + 60 ml. de líquido de Fildes al 5%.
- f) Gelosa Chocolate + Polienriquecimiento al 1% + antibiótico en varias concentraciones de 0.25 mg./ml. a 128 mg./ml.

Preparación de reactivos.

- a) Oxidasa: N, N, dimetil parafenilendiamina al 1% (Merck).
- b) Catalasa: H_2O_2 al 30% (Merck).
- c) Gram: A. Cristal Violeta de Hucker.

Solución A.

Cristal violeta (J.T. Baker) 2 gr.
Alcohol etílico al 95% (Merck) 20 ml.

Solución B.

Oxalato de amonio (Merck). 0.8 gr.
Agua destilada 80 ml.

Mezclar soluciones A y B. Guardar 24 horas antes de usar. Filtrar a través de papel.

- a) Yodo de Gram.

Yodo Merck 1 gr.
Yoduro de Potasio Merck 2 gr.
Agua destilada 300 ml.

b) Decolorantes.

Alcohol al 95% (Merck) 100 ml.
Acetona (Merck) 200 ml.

c) Colorante de Contraste.

Solución estandar (Merck)
Safranina O (Merck) 2.5 grs.
Alcohol etílico (Merck) 100 ml.
Solución estandar de
Safranina. 10 ml.
Agua destilada 90 ml.

d) Reactivo de Fildes (34)

50 ml. de sangre de borrego.
6 ml. de HCl concentrado (Merck).
150 ml. de solución salina estéril
1 gr. de Pepsina (Sigma).

e) Antibióticos: Penicilina G. (Upjohn).

Ampicilina (Bristol).

Cefalosporinas (Lilly).

Cloranfenicol (Parke-Davis).

f) Reactivos para determinar beta-lactamasas.

Método Yodométrico.

Disolver penicilina G. a pH 6.0 en amortiguador de fosfatos hasta una concentración de 6000 mg./ml. Añadir 1 gr. de almidón soluble a 100 ml. de agua destilada y calentar hasta que se disuelva. Disolver 2.03 gr. de Yodo y 53.2 gr. de Yoduro de potasio -

en un pequeño volumen de agua destilada y luego diluir hasta 100 ml. Guardar en un frasco ambar de vidrio. Las soluciones de penicilina y almidón deben ser recién preparadas. La solución de Yoduro debe reemplazarse cuando forma exceso de precipitado. Colocar 0.1 ml. de solución de penicilina al pozo de una placa de microdilución. Preparar una suspensión densa de microorganismos y mezclarla con el sustrato. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Agregar dos gotas a la solución de almidón y mezclar. Agregar 1 gota del reactivo de yodo. Aparece inmediatamente color azul a consecuencia de la reacción de yodo y el almidón. Agitar la mezcla 1 minuto a temperatura ambiente. - La decolorización en menos de 10 minutos indica la producción de beta-lactamasa.

g) Carbón activado, para impregnar hisopos.

FIGURA 1 Proyecto: Meningitis bacteriana aguda (UAM-X-SSA).

Protocolo para recolección de información.

Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Servicio: Pediatría o
Guardería.

NOMBRE: _____

EDAD: _____

DIRECCION: _____

Nº DE MIEMBROS POR FAMILIA: _____ EDADES: _____

TOMA DE MUESTRA: _____

DIAGNOSTICO CLINICO: _____

FECHA DE DIAGNOSTICO: _____

OBSERVACIONES CLINICAS: _____

EXAMEN MICROBIOLOGICO: _____

PRUEBAS QUE USO PARA LA IDENTIFICACION DE LA BACTERIA: _____

ANTIBIOGRAMA (Técnica) RESULTADO: _____

M E T O D O S.

1. Toma de muestra: Se tomó una muestra de exudado faríngeo, empleando un hisopo impregnado con carbón activado, a cada uno de 56 niños de la guardería y a 38 niños del Hospital, la información clínica de estos niños se evaluó mediante el empleo de una hoja de protocolo que se muestra en la figura 1.
2. Transporte de la muestra: Se utilizó el medio de transporte de Stuart y el hisopo conteniendo cada muestra de exudado faríngeo, se depositó introduciéndolo dentro del medio de transporte y éste se envió inmediatamente al laboratorio para procesarse antes de dos horas de haberse realizado la toma.
3. Aislamiento: El primoaislamiento de H. influenzae se realizó sembrando cada muestra faríngea por estría cruzada en medios de gelosa chocolate + polienriquecimiento al 1% + Bacitracina 21,000-UI. Y en gelosa sangre de borrego al 5%.
4. Identificación presuntiva de H. influenzae: Se basó en el reconocimiento preliminar de su morfología colonial macroscópica y microscópica mediante la coloración de Gram, en su requerimiento de los factores X (hemina) y V (NAD), por su incapacidad de incorporar el ácido delta amino levulínico empleando la prueba de porfirinas, por la reacción de la oxidasa positiva usando N,N dimetil parafenilendiamina y por la reacción de la catalasa positiva utilizando H₂O₂ al 30%.
5. Las cepas identificadas como H. influenzae se siembran en tubos inclinados de gelosa chocolate + polienriquecimiento y se incu-

ban a 37°C por 24 horas. El crecimiento es resuspendido con BHI-glicerol al 15% para conservarse mediante congelación a -70°C.

6. Biotipificación:

A partir de una cepa aislada de H. influenzae, se inocula una asada en tres tubos de 13x100 mm. conteniendo cada tubo ornitina para observar la reacción de la ornitina descarboxilasa, -- caldo triptofano para valorar la reacción de indol y caldo -- urea para la actividad de la ureasa. Se incuban 24 horas a -- 37°C y se observa el vire de los indicadores.

CUADRO N° 3 DIFERENCIACION DE LOS BIOTIPOS DE H. INFLUENZAE

BIOTIPO	INDOL	UREASA	ORNITINA DESCARBOXILASA
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
VI	+	-	-

Tomado de: Kilian M. 1980, (34)

7. Serotipificación: Se hizo a partir de los cultivos congelados, se realizó por el método de aglutinación en placa. Los sueros específicos fueron de origen comercial teniendo sueros específicos de H. influenzae para cada serotipo a,b,c,d,e y f. De las cepas de H. influenzae confirmadas por las pruebas presuntivas se pone en contacto en un portaobjeto una gota de solu--

ción salina con la que se hace una suspensión antigénica y a un lado de esta se añade una gota del antisuero específico de H. influenzae del serotipo que se va a probar. Se homogenizan las gotas se hace rotar el portaobjeto y si aglutina estamos ante el serotipo correspondiente.

8. Beta-lactamasas:

De las cepas identificadas como H. influenzae se prepara una suspensión densa de estos organismos en solución salina, se pone en contacto con dos gotas de una solución de almidón al 1% + una gota del reactivo de yodo. Aparece un color azul como consecuencia de la reacción de yodo y almidón. Agitar la mezcla 1 minuto a temperatura ambiente. La decoloración en menos de 10 minutos indica la producción de beta-lactamasas.

Método de dilución seriada en placa (24,39,43) para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos.

1. Preparación del inóculo.

Se prepara el inóculo ajustando a 10^8 UFC/ml. y se diluye 1:10 con infusión de cerebro y corazón.

2. Los antibióticos de prueba usados fueron los siguientes:

Ampicilina, Cefalosporinas, Cloranfenicol y Penicilina G.

a) Se utilizaron sales puras, obtenidas de fuente comercial -- considerando la actividad biológica individual, se pesaron diferentes cantidades de cada uno, las que se diluyeron en disolventes adecuados, hasta obtener soluciones madre de 2000 $\mu\text{g/ml}$ o UI/ml.

C U A D R O N° 4

Preparación de diluciones de antibióticos para la prueba de dilución seriada en placa

Solución de antimicrobianos + agua estéril			CONCENTRACION INTERMEDIA	CONCENTRACION FINAL EN PLACAS DE AGAR
Vol.(ml)	µg/ o UI/ml	Vol.(ml)	µg/ o UI/ml.	µg/ o UI/ml.
6.4	2000	3.6	1280(a)	128
2(a)	1280	2	640(b)	64
1(a)	1280	3	320(c)	32
1(a)	1280	7	160(d)	16
2(d)	160	2	80(e)	8
1(d)	160	3	40(f)	4
1(d)	160	7	20(g)	2
2(g)	20	2	10(h)	1
1(g)	20	3	5(i)	0.5
1(g)	20	7	2.5(j)	0.25

FUENTE: Tomado de Washington J.A. y V.L. Sutter 1980, (24).

b) Se hicieron diluciones de acuerdo al cuadro N° 6, en el que se muestra como se prepararon las diluciones correspondientes de los diferentes antibióticos de prueba.

3. Preparación de las placas:

Se depositan 2 ml. del antimicrobiano en 18 ml. de gelosa, se mezcla, se vacía en las placas, se dejan gelificar y secar a temperatura ambiente.

4. Inoculación de las placas:

Se ajusta la suspensión de cada cepa de H. influenzae a 10^7 -- UFC/ml. y se pone una asada en cada placa con la dilución del-

antibiótico por evaluar. Se dejan secar los inóculos a temperatura ambiente y se incuban las placas a 37°C durante 18 horas en una estufa bacteriológica. Se prepara una placa testigo sin antibiótico para comprobar el crecimiento de todas las cepas de prueba.

5. Lectura e interpretación (24,42):

Se colocan las placas en orden creciente de concentración al final del período de incubación, anotando el resultado de la concentración mínima inhibitoria para cada microorganismo, que equivale a la concentración del antibiótico capaz de evitar el desarrollo del microorganismo durante el período de incubación a 37°C por 24 horas (14,24). Aquellas cajas que muestren inhibición completa del crecimiento o desarrollo de una colonia, se consideran susceptibles (24,42).

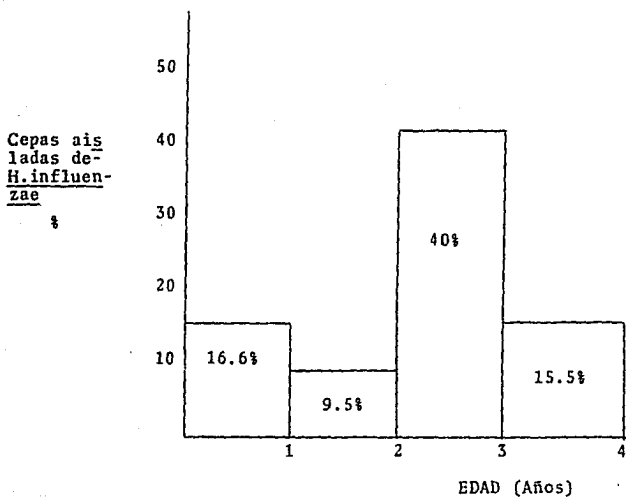
RESULTADOS:

Población estudiada.

Se estudiaron 39 niños de un hospital del Sector Salud y 55 niños de una guardería, mediante tomas de exudado faríngeo. De todas las muestras obtenidas de la guardería sólo se aislaron 11 cepas de Haemophilus influenzae provenientes de niños aparentemente sanos de 11 meses a tres años 11 meses de edad, lo que representa el 18.1% de aislamiento. De las muestras obtenidas en el Hospital se aislaron únicamente 14 cepas de H. influenzae de las cuales seis correspondieron a niños aparentemente sanos y ocho a niños con diversos padecimientos desde faringoamigdalitis, púrpura trombocitopénica, síndrome diarreico, síndrome febril, uno con problema dermatológico y hasta un problema ocular. Lo que representa el 36.8% del total de aislamiento, 15.7% de niños aparentemente sanos y 21% de niños con diversas patologías. En la figura 2 se muestra la distribución por edades, de la frecuencia de aislamiento de H. influenzae en niños de guardería aparentemente sanos la mayor frecuencia se observó entre dos y tres años de edad. La figura 3 muestra la distribución por edades de la frecuencia de aislamiento en niños con diversos padecimientos. La mayor frecuencia se observó entre 1 año y tres años once meses.

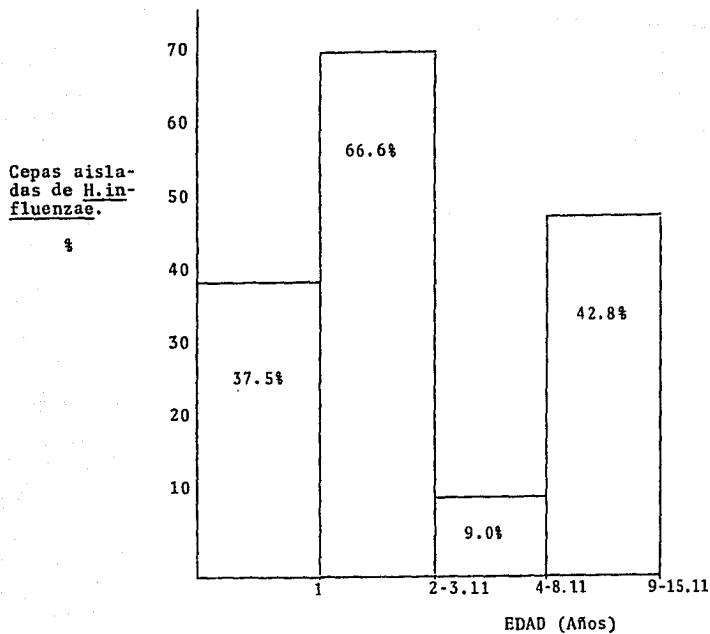
FIGURA 2

Frecuencia de aislamiento de H. influenzae en niños de guardería aparentemente sanos



F I G U R A 3

Frecuencia de aislamiento de cepas de H. influenzae en niños sanos y enfermos de hospital.



El cuadro N° 5 muestra la distribución por edades de la frecuencia del aislamiento de H. influenzae en niños de guardería aparentemente sanos.

El cuadro N° 6 muestra la distribución por edades de la frecuencia del aislamiento de H. influenzae en niños de hospital aparentemente sanos y niños con diversos padecimientos clínicos.

El cuadro N° 7 muestra la biotipificación, serotipificación, producción de betalactamasas de las 11 cepas aisladas de H. influenzae de los 55 niños estudiados de guardería.

El cuadro N° 8 muestra la biotipificación, serotipificación y producción de betalactamasas de las 14 cepas aisladas de H. influenzae de los 39 niños estudiados de hospital tanto sanos como enfermos.

El cuadro 9 muestra la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las 11 cepas aisladas de H. influenzae en los 55 niños sanos de guardería.

El cuadro N° 10 muestra la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las 14 cepas de H. influenzae aisladas en los 39 niños sanos y enfermos de un hospital.

Cuadro N° 5, frecuencia de aislamiento de H. influenzae en muestras de exudado faríngeo de 55 niños de guardería aparentemente sanos.

EDAD (MESES)	Nº DE INDIVIDUOS ESTUDIADOS	Nº DE CEPAS DE <u>H. INFLUENZAE</u>	% DE AISLAMIENTO
Menos de 12	6	1	16.6
12 - 23	21	2	9.5
24 - 35	15	6	40.0
36 - 48	13	2	15.3
T O T A L E S:	55	11	18.1

Cuadro 6, frecuencia de aislamiento de H. influenzae en muestras de exudado faríngeo en niños de hospital aparentemente sanos y niños con diversos padecimientos clínicos.

EDAD (MESES)	INDIVIDUOS		ESTUDIADOS ACUMULADO	Nº DE CEPAS DE <u>H. INFLUENZAE</u>	% DE AISLAMIENTO
	SANOS	ENFERMOS			
Menos de 12	3	5	8	3	37.5
12 - 48	4	2	6	4	66.6
48 - 107	7	4	11	1	9.0
108 - 191	7	7	14	6	42.8
T O T A L E S:	21	18	39	14	36.8

Cuadro N° 7, Biotipificación, serotipificación y producción de beta-lactamasas de 11 cepas de H. influenzae aisladas de niños sanos de guardería.

N° DE NIÑOS ESTUDIADOS	N° DE CEPAS DE H. INFLUENZAE.	BIOTIPOS						SEROTIPOS						BETA LACTAMASAS		
		I	II	III	IV	V	VI	a	b	c	d	e	f			
55	11	5	4	0	2	0	0	-	1	2	2	1	1	1	1	1

No se empleó antisuero de H. influenzae anti-a

Cuadro N° 8, Biotipificación, serotipificación y producción de beta-lactamasas de 14 cepas de H. influenzae aisladas de niños sanos y enfermos de hospital.

CATEGORIA	N° DE NIÑOS ESTUDIADOS	N° DE CEPAS DE H. INFLUENZAE	BIOTIPIFICACION						SEROTIPIF.						BETA LACT.	CEPAS NO TIP.	
			I	II	III	IV	V	VI	a	b	c	d	e	f			
Sanos	19	6	5	1	0	0	0	0	0	-	1	3	0	1	0	1	1
Enfermos	20	8	5	3	0	0	0	0	0	-	1	1	0	3	0	0	3
TOTAL:	39	14	10	4	0	0	0	0	0	-	2	4	0	4	0	1	4

Cuadro N° 9, concentración mínima inhibitoria (MIC) de 11 cepas de H. influenzae aisladas de niños de guardería.

ANTIMICROBIANO	CONCENTRACION ANTIBIOTICO (µG/ML)									
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Ampicilina	7	1	1	1	1	-	-	-	-	-
Cefalosporinas	2	1	8	-	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	9	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicilina	7	1	1	2	-	-	-	-	-	-

Cuadro N° 10, concentración mínima inhibitoria (MIC) de 14 cepas de H. influenzae aisladas en niños sanos y enfermos de hospital.

ANTIMICROBIANO	CONCENTRACION ANTIBIOTICO (µG/ML)									
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Ampicilina	10	4	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefalosporinas	-	7	4	3	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	10	3	1	-	-	-	-	-	-	-
Penicilina	10	2	1	1	-	-	-	-	-	-

Cuadro N° 13, análisis estadístico de los resultados con significancias.

H. INFLUENZAE	GUARDERIA	HOSPITAL	χ^2	SIGNIFICANCIA
Aislamiento.	11	14	3.25	$p > 0.1$
Biotipo I.	5	10	0.389	$p < 0.5$
Edad susceptible- (12-36 meses).	9	7	1.98	$p > 0.1$
Capsuladas.	7	10	0.87	$p < 0.9$
Cepas resistentes a los antibióti- cos.	11	10	1.29	$p < 0.25$
Cepas productoras de beta-lactama- sas.	1	1	0.5	$p > 0.5$

DISCUSION:

Es importante realizar estudios tendientes a detectar portadores - sanos mediante el aislamiento de H. influenzae principalmente en - centros de asistencia infantil como son hospitales y guarderías, - debido a que se reportan en la literatura cifras altas del orden - del 15 al 50% (31).

Los porcentajes de aislamiento de H. influenzae de este estudio en el que se evaluó una población total de 94 niños: 39 niños de un - hospital y 55 niños de guardería a quienes se les tomó exudado fa- ríngeo, se obtuvieron los siguientes resultados: 11 cepas de H.in- fluenzae en niños aparentemente sanos de 11 meses a 3 años 11 me- ses de la guardería, con un 20% de aislamiento. De las muestras - obtenidas del hospital se aislaron 14 cepas de H.influenzae de las cuales 6 correspondieron a niños sanos y 8 a niños con diversos pa- decimientos, lo que representa un 36.8% del total de aislamiento, - 15.7% en niños sanos y 21% en niños enfermos. Esto nos demuestra que hubo un mayor aislamiento de H. influenzae en el hospital que- en la guardería, lo cual podría explicarse en principio por el me- canismo de transmisión (aérea) o (por vías respiratorias superio- res) que caracteriza a esta bacteria (11). También se observó en- la figura 2 que la mayor frecuencia de aislamiento de H.influenzae en niños de guardería sanos se encuentra entre el grupo de edad de 24 a 36 meses. La figura 3 muestra la mayor frecuencia del aisla- miento de H. influenzae en niños de hospital sanos o enfermos, es- tá dentro del grupo de edad de 12 a 47 meses. Estos resultados en- contrados correlacionan bien con aquéllos reportados por Kilian --

(18) quien señala que la frecuencia de aislamiento en población infantil fluctúa entre el 15 al 50%. También Granato y cols. (17) en 1982 en la Universidad de Nueva York reportan cifras de aislamiento del 30% en la población infantil. Brabender, Glenn y cols. (20) en 1983 en la Universidad de Kansas reportan cifras de aislamiento en población infantil del 35% y la frecuencia de aislamiento de cepas productoras de beta-lactamasas del 3 al 9%.

A nivel nacional Calderón y cols. (48) en 1985 reportan en población infantil cifras de aislamiento de H. influenzae en el 23%, el serotipo b se recuperó en un 9.3% y las cepas de H. influenzae beta lactamasas positivas representaron el 21.9%. Los serotipos más frecuentes fueron el a y el b, en cuanto a biotipos lo fueron el IV y el III. Este trabajo se realizó en invierno tomando exudado faríngeo a 303 niños entre seis meses y cinco años de edad de un centro de asistencia infantil. Por los antecedentes anteriores podemos correlacionar que los datos obtenidos en este trabajo concuerdan con los valores encontrados en otros países y en México.

De las cepas aisladas de niños de guardería aparentemente sanos el 9% fué identificado como H. influenzae serotipo b, 45.4% como del biotipo I, 36.3% como del biotipo II y 9% del biotipo IV, no encontrándoseles biotipos III, V, VI. En cuanto a los demás serotipos 18.2% del serotipo c, 18.2% del serotipo d, 9% del serotipo e y 9% del serotipo f. No se realizó el estudio con antisuero a.

De las cepas aisladas de niños de hospital aparentemente sanos el 16.6% fue identificado como del serotipo b, 83.3% del biotipo I, -

16.6% del biotipo II no encontrándose los demás biotipos. En cuanto a los otros serotipos correspondió al 50% del serotipo c y 16.6% al serotipo e. En cuanto a los niños de hospital enfermos el serotipo b se encontró en el 12.5%, 62.5% del biotipo I, 37.5% del biotipo II no encontrándose los demás biotipos. En cuanto a los otros serotipos 12.5% del serotipo c y 50% del serotipo e. Se resalta el hecho de que en niños de guardería sanos, el serotipo b se encuentra en 9% con un 45.4% del biotipo I, en niños de hospital sanos 16.6% del serotipo b con un 83.3% del biotipo I y en niños enfermos de hospital del serotipo b 12.5% con un 62.5% del biotipo I.

Cuadro N° 14, Relación entre el H. influenzae biotipo I con el serotipo b de cepas aisladas de niños sanos y enfermos de hospital y guardería del Sector Salud.

	NIÑOS: GUARDERIA	HOSPITAL	
		Sanos	Enfermos
<u>H. influenzae</u>			
Serotipo b.	9%	16.6%	12.5%
Biotipo I	45.4%	83.3%	62.5%

En cuanto a la producción de beta-lactamasas se encontró que en niños sanos de guardería el 9% de las cepas aisladas producen esta enzima. En niños de hospital sanos el 16.6% y en niños de hospital enfermos no se encontraron cepas de H. influenzae que produje-

ran beta-lactamasas. El aislamiento de H. influenzae depende de la estación del año y de las características de la población estudiada; este estudio se realizó entre los meses de mayo a septiembre, por lo que se puede explicar que el aislamiento del serotipo b fue relativamente menor a los reportados. Se ha demostrado que la mejor estación del año para aislar con más frecuencia al H. influenzae es en invierno (19). En cuanto a la sensibilidad a los antibióticos las cepas de H. influenzae de hospital presentaron curiosamente mayor sensibilidad a la ampicilina que las cepas de niños de guardería, lo cual teóricamente se esperaba que sucediera al contrario o a la inversa, ya que presentaron mayor sensibilidad al cloranfenicol. Los antimicrobianos tales como cefalosporinas y penicilina siguen siendo útiles en el tratamiento de esta enfermedad.

La frecuencia de cepas de H. influenzae productoras de beta-lactamasas en población infantil varía del 3 al 9% (18). En adultos, Saginum y Bartlett (12) reportaron que 2% de 111 cepas aisladas de H. influenzae fueron productoras de beta-lactamasas. Wallace y cols. (17) también reportaron un 2% de incidencia en la producción de beta-lactamasas en 103 cepas de H. influenzae aisladas de diferentes sitios, en especial de fluidos estériles y de vías respiratorias superiores. La detección de beta-lactamasas provee una información valiosa desde el punto de vista clínico de acuerdo a la terapia a seguir con antibióticos, pero no provee información del significado clínico de un aislamiento particular. En otras palabras la producción de beta-lactamasas es útil para la selección de un antibiótico así como un indicador de significancia clínica.

En este estudio resaltan algunos de los factores de virulencia de H. influenzae que son de consideración, ya que su detección en portadores nos permite un seguimiento epidemiológico y sustancial del problema, ya que la relación de biotipo a serotipo, origen del -- aislamiento o susceptibilidad antimicrobiana, identifican factores que están asociados con la invasividad de ciertos biotipos de H.influenzae, y aunque en este estudio no fueron estadísticamente significativos posiblemente por el tamaño de la muestra, está claramente establecida la importancia de los factores de patogenicidad del H. influenzae.

CONCLUSIONES:

Se establecieron las siguientes de acuerdo con las condiciones en las cuales se realizó este estudio:

- 1) El aislamiento de Haemophilus influenzae en guardería y hospital fué significativa con el 92.5% de confianza $p > 0.1$.
- 2) El biotipo I resultó ser el más prevalente de todos los biotipos en la población estudiada de guardería y hospital $p < 0.5$.
- 3) El aislamiento de Haemophilus influenzae serotipo b tanto en guardería como en hospital no fué significativo $p > 0.75$.
- 4) La edad más susceptible en niños de guardería y de hospital -- fue entre el grupo de edad de 12 meses a 36 meses, $p > 0.1$.
- 5) La prevalencia del biotipo I con respecto a los otros biotipos no fué significativo $p > 0.5$.
- 6) La prevalencia de cepas capsuladas con respecto a las no capsuladas tampoco fue significativa $p < 0.9$.
- 7) La prevalencia del biotipo I y beta-lactamasas no fué significativo $p > 0.5$.
- 8) Los tres antibióticos de elección, ampicilina, cloranfenicol y cefalosporinas mostraron mayor actividad de inhibición del Hae

Haemophilus influenzae a la concentración de 1 mg/ml. $p < 0.25$.

- 9) La producción de beta-lactamasas en niños sanos de guardería -
fue del 9%, en niños sanos de hospital del 16.6% y en niños en-
fermos de hospital no se encontraron cepas de Haemophilus in-
fluenzae productoras de beta-lactamasas.

- 10) La determinación de los factores de virulencia de Haemophilus-
influenzae como son la producción de cápsula, el biotipo, la -
producción de beta-lactamasas y la sensibilidad a los antibió-
ticos permitieron evaluar los determinantes de patogenicidad e
invasividad de Haemophilus influenzae en población infantil.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Rivers, T.M., 1982: Influenzal meningitis. Am. J. Dis. Child. 24:102-106.
- 2) Nyhan, W.L. and Richardson, F., 1963: Complications of meningitis. Annu. Rev. Med. 14:243-248.
- 3) Smith, F.W.P., Jr. and Hagnes, R.E., 1972: Changing incidence of Haemophilus influenzae meningitis. Pediatrics, 50:723-727.
- 4) Robbins, J.B., Schneerson, R. Argaman M., and Handzel, Z.T., - 1973: Haemophilus influenzae type b: disease and immunity in humans. Ann Intern. Med., 78:259-263.
- 5) Smith, A.L., Smicth, D. H., Averill, D.R., Jr., Mariano J. -- and Moxon, E.R., 1973: Production of H. influenzae b meningitis infant rats by intraperitoneal inoculation, Infect. Immun. 8:278-282.
- 6) Sell, S.H.W., Merrill, R.E., Doyne, E.O., and Zimsky, E.P., -- 1972: Long-term sequelae of H. influenzae meningitis. Pediatrics, 49:206-212.
- 7) Sproles, E.T. Azerrad, J. Williamson C., and Merrill, R.E., - 1969: Meningitis due to H. influenzae long-term sequelae, J. Pediatrics, 75:782-783.
- 8) Glass, B., Callipp, P.J. and Waldman, .A., 1971: Viral and - Bacterial meningitis. N.Y. State J. Med., 71:2182-2183.

- 9) Sell, S.H., W., Webb, W.W., Pate J.E. and Doyme, E.O., 1972:-- Psychological sequelae to bacterial meningitis two controlled studies. *Pediatrics*, 49:212-215.
- 10) Fothergill, L.D. and Wright, J. 1973: Influenzal meningitis: The relation of age incidence to the bactericidal power of -- blood against the causal organism. *J. Immunol.* 24:273-277.
- 11) Robbins J.B., 1975: Acquisition of "natural" and immuniza- - tion induced immunity to H. influenzae type b diseases, *Microbiology Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.*
- 12) Parke, J.G., Jr. Schneerson, R. and Robbins, J.B., 1972: The age and racial distribution and case fatality rate of H.in- - fluenzae type b, meningitis in Mecklenburg, North Carolina, - *J. Pediatric*, 81:713-717.
- 13) Michaels, R.H., 1971: Increase influenzal meningitis, N. - - Engl, J., *Med.*, 285:666-672.
- 14) Wehrle, P.F., Mathies, A.W. Jr. and Leedon, J.M., 1969: The - critically ill child: Management of acute bacterial meningi- - tis. *Pediatrics*, 44:999-1003.
- 15) Edberg, S.C., Melton E., Singer, J.M., 1980: Rapid biochemical characterization of H. influenzae species by using the mi - cro-ID *J. Clin. Microbiol.*, 11:22-26.
- 16) Goldstein E., Daly, A.K., Seamans, 1967: H. influenzae as a - caused of adult pneumonia. *Ann Intern. Med.*, 66:35-40.

- 17) Granato, P.A., Jurek, E.A., Weinem, L.B., 1983: Biotypes of H. influenzae: Relationship to clinical source of isolation, serotype, and antibiotic susceptibility. Am. J. Clin. Pathol. 79:73-77.
- 18) Kilian, M., 1976: A taxonomic study of the genus Haemophilus with the proposal of a new species. J. Gen. Microbiol. 93:9-62.
- 19) Kilian, M., Sorensen I., Frederikson W., 1979: Biochemical characteristics of 130 recent isolates from H. influenzae meningitis. J. Clin. Microbiol. 9:409-412.
- 20) Quintiliani R., Hymans P.J., 1971: The association of bacteremic H. influenzae pneumonia in adults with typable strains. - Am. J. Med. 50:781-786.
- 21) Simon, H.B., Southwick, F.S., Moellering, R.C. Jr., Sherman - E., 1980: H. influenzae in hospitalized adults: current perspectives, Am. J. Med. 69:219-226.
- 22) Wallace, R.J., Musher D.M., Septemus, E.J. et al, 1981: H. influenzae infections in adults: Characterization of strains - by serotypes, biotypes, and beta-lactamase production. J. Infect. Dis. 144:101-106.
- 23) Wallace, R.J., Musher, D.M., Martin, R.R., 1978: H. influenzae pneumonia in adults. Am. J. Med., 64:87-93.
- 24) Thornsberry C., T. L. Gavan, E.G., Gerlach and S.C. Sherris, - 1977: New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. American Society for Microbiol. Washington D.C. 6:1-4.

- 25) Thornsberry C. and L.A. Kermen, 1974: Ampicilin resistant in H. influenzae as determined by a rapid test for beta-lactamase production. Antimicrob. Ag. Chemother, 6:653-654.
- 26) Levin D.C., Schwarz M.I., Matthay R.A., 1977: La force M: -- Bacteremic H. influenzae pneumonia in adults. A report of 24-cases and a review of the literature. Am. J. Med., 62:219-224.
- 27) Long S.S., Teter M.J., Gilligan R.H., 1983: Biotype of H. influenzae: Correlation with virulence and ampicillin resistance. J. Infect. Dis. 147:800-806.
- 28) Tu K.K. Jorgensen J.H., Stratton C.W. 1981: A rapid paper -- disc test for penicilinase. Am. J. Clin. Pathol, 22:557-559.
- 29) Herschmann J.V., Everett E.D., 1979: H. influenzae infection in adult: Report on nine cases a review of the literature. Medicine, 58:80-93.
- 30) Johnson W.D., Kaye D., Hoog E.W., 1968: H. influenzae pneumonia in adults: Report of five cases and review of the literature. Am. Rev. Resp. Dis., 97:1112-1117.
- 31) Kamme C. 1980. Biotypes of capsulated and non-capsulated H. influenzae: Correlation between biotypes and beta-lactamase -- production. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 88:261-264.
- 32) Albritton W.L., Penner S., Slaney L. Brunton J., 1978: Biochemical Characteristics of H. influenzae in relationship to source of isolation and antibiotic resistance. J. Clin. Microbiol., 7:519-523.

- 33) Anderson P., Smith D. H., Ingram D.L. et al, 1977: Antibody to polyribophosphate of H. influenzae type b in infants and childrens: Effect of immunization with polyribophosphate. - J. Infect. Dis., 136:557-562.
- 34) Kilian M., 1980: Haemophilus: Manual of clinical microbiology 3er. edition. Edited by Lennette E.H., Balows A. Hauster. American Society for Microbiology, p. 330-336.
- 35) Leinonen M., Sivonen A., 1979: Serological grouping of meningococci and encapsulated H. influenzae strains by latex - agglutination J. Clin. Microbiol. 10:404-408.
- 36) Wayne Brabender, M.D., Glenn R., Hodges M.D. and William G. Barnes, 1984: Clinical significance of serotype, biotype -- and beta-lactamase production of respiratory isolates of - - H. influenzae. Am. J. Clin. Pathol., 81:85-88.
- 37) Long, S.S. Phillips, 1976: Chloramphenicol-resistant H. influenzae J. Pediatrics, 90:1036-1041.
- 38) Nelson K. E., Postl B. Kotelewetz, 1982: Emergence of rifampicin resistant H. influenzae. Antimicrob. Agents Chemother, 21:498-500.
- 39) Oberholer T.R., Back A.E., 1979: Biotypes of Haemophilus encountered in clinical laboratories. J. Clin. Microbiol. 10:-168-174.
- 40) Prober C.G., Bannatyne R.M., 1982: H. influenzae type b in a nursery school: The value of biotyping. Pediatrics 69:215-218.

- 41) Santos J. I., Jacobson J.A., Swenson P., Palmer W.M., 1981: Cellulitis: Treatment with coefoxitin compared with multiple antibiotic therapy. *Pediatrics*, 67:887-890.
- 42) Shapiro E.D., Wald A., 1980: Efficacy of rifampin in eliminating pharyngeal carriage of H. influenzae type b *Pediatrics*-66:5-8.
- 43) Tomeh M.O., Starr S.E., Mc. Gowan J.E., 1974: Ampicillin-resistant H. influenzae type b infection. *JAMA*, 229:295-297.
- 44) Jackson G.G. y Muldoon R.L., 1975: Virus causing common respiratory infections in man. *Viruses of Influenza A.J. Infect.-Dis.* 13:308-312.
- 45) Back A.E. y T.R. Oberhofer, 1978: Use of minitek system for Biotyping of Haemophilus species. *J. Clin. Microbiol.*, 7:312-313.
- 46) Burans J.P., F.H. Kruszewski, M. Lynn y M. Solotorovsky, 1981: Kinetics of H. influenzae type b: Infection in normal and ribosome-immunized mice using intraperitoneal and intracerebral routes of inoculation. *Br. J. Exp. Pathol.*, 62:496-503.
- 47) Burans J.P., M. Lynn y M. Solotorovsky, 1983: Induction of active immunity with membrane fractions from H. influenzae type b *Infect. Immun.*, 41(1):285-293.
- 48) Calderón J.E., Camorlinga, M., Salas P. y Conde C., 1980: -- Epidemiología de las infecciones por H. Influenzae. *Infectología* 11(1):37-45.

- 49) Conrall, C.J., J.A. Winklestein y E.R. Moxon, 1982: Partici-
pation of complement in host defense against encapsulated --
H. influenzae types a,c, and d Infect. Immun. 35:759-764.
- 50) Denny, F.W., 1974: Effect of a toxin produced by H. influen-
zae on ciliated respiratory epithelium. J. Infect Dis 129:93
-100.
- 51) Drow D.L., D.G. Maki y D.D. Manning, 1979: Indirect Sandw--
ich enzyme linked immunosorbent assay for rapid detection of
H. influenzae type b infection. J. Clin. Microbiol. 10:442--
450.
- 52) Flesher A.R. y R.A. Insel, 1978: Characterization of lipopo-
lysaccharido of H. influenzae. J.J. INFECT. Dis., 138:719-730
- 53) Guiscafre G.H., García M.M., Jaime C.M., 1981: Frecuencia -
de H. influenzae resistente a ampicilina y Streptococcus - -
pneumoniae resistente a penicilina en portadores sanos. Arch.
Invest. Med. 12:141-151.
- 54) Hanser E.J., P.A. Gulig, S.M. Robertson, C.F. Frisch, 1982:-
Immunoprotection of rats against H. influenzae type b disease
mediated by monoclonal antibody against a Haemophilus cuter-
membrane protein. Lancet, 1:366-368.
- 55) Hargis J.W. y S.S. Husain, 1981: Detection of beta lactama-
se in H. influenzae by immunofluorescence. Can. J. Microbiol
27(10):1076-1079.
- 56) Johnson W.G.R., A.K. Pierce., 1970: The role of bacterial -

- antagonism in pneumococcal colonization of the human pharynx. J. Lab. Clin. Med., 75(6):946-950.
- 57) Kaplan S.L., J. Goddard., R.D. Feigin, 1981: Ataxia and deafness in children due to bacterial meningitis. Pediatrics, - 68(1):8-13..
- 58) Katz, M.M., Lynn M., y M. Solotorovsky, 1981: Serological - and biological activities of anti-H. influenzae ribosomal serum. Infect. immun., 31:1125-1131.
- 59) Katz, M.A., Solotorovsky y M. Lynn, 1983: Opsonization and phagocytosis of H. influenzae type b organisms by mouse polymorphonuclear leucocytes and antiribosomal serum. Br. L. - - exp. Path., 64:268-276.
- 60) Kumate J. y G. Gutiérrez, 1980: Manual de Infectología. 7a. Ed. Ediciones médicas del Hospital Infantil de México. pp., - 164-170.