



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

DISTRIBUCIÓN DE BIOPELÍCULAS DE  
*Haemophilus Influenzae* no tipificable  
EN PACIENTES CON ENFERMEDAD  
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

TATIANA SUSANA SANTANDER ZARCO

TUTOR

DRA. PATRICIA GÓMEZ DE LEÓN CRUCES



FACULTAD DE CIENCIAS

México, D. F.

Junio 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### **Datos del alumno**

Santander Zarco Tatiana Susana

59121680

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de ciencias

Biología

98060696

### **Datos del Tutor**

Dra. Patricia Gómez de León Cruces

### **Datos del Sinodal 1**

Dr. José Edgardo Escamilla Marván

### **Datos del Sinodal 2**

Dr. Francisco Javier Díaz García

### **Datos del Sinodal 3**

M en C. María Eva Salinas Cortés

### **Datos del Sinodal 4**

Biól Israel Castillo Juárez

### **Datos del trabajo escrito**

Distribución de Biopelículas de *Haemophilus influenzae* no tipificable en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Formación de biopelículas por cepas de HiNT de pacientes con EPOC

63p

2011

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. PATRICIA GÓMEZ DE LEÓN CRUCES.**

SE AGRADECE EL APOYO DEL FINANCIAMIENTO PARA BECA Y DE INSUMOS PARA LA ELABORACIÓN DE ESTA TESIS, A LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA), UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM) MEDIANTE SU PROGRAMA DGAPA-PAPIIT (PROYECTOS: IN220799, IN226207 E IN208410-3). DICHO FINANCIAMIENTO A CARGO DE LA DRA. PATRICIA GÓMEZ DE LEÓN CRUCES.

## **Dedicado a:**

### **A Dios**

Por elegirme, darme de su gran amor, amistad, apoyo en el cumplimiento de mis sueños y dar le un mejor enfoque a mi vida.

### **A mis Pastores**

Eduardo y Alya Dueñas, por su guía, apoyo y sabiduría espiritual e intelectual respecto al padre. También por compartirme de su amor y su tiempo.

### **A mis padres**

Yolanda y Genaro por darme la vida, cuidarme, darme su amor, enseñarme a soñar, estudiar, escuchar, jugar, trabajar, compartir, apoyar, esperar, dar y amar gracias por todo. Los amo.

### **A mis hermanos**

Alya, Samuel, Ivan, Ángel, Anel y Edgar por su amor fraternal, por sus enseñanzas de vida para enfrentar la gran jungla fuera de mi hogar y ayudarme a levantarme en los momentos tristes y caídas de mi vida; gracias por hacerme ver que a pesar de todo siempre podre contar con ustedes. Los amo.

### **A mi abuelo Ángel**

Por su amor, por enseñarme a apreciar, respetar y amar cada puesta del Sol y sobre todo las mejores lunas del año, las de octubre. Gracias por esos deliciosos huevos con pollo, que jamás he vuelto a probar y ese lonch de aguacate que recuerdo con tanto amor.

### **A mi tía Laura**

Por dejarme ver con su vida, que la realidad es subjetiva y enseñarme que en efecto la mente puede dominar el cuerpo; pero no siempre domina la mente.

### **A David Zaragoza Álvarez**

Por ser el camino por el cual aprendí que el amor es hermoso, y a veces muy doloroso pero vale la pena vivirlo. Gracias por cada instante y momento de tu vida, que ha dejado

una huella imborrable en la mía y me han hecho cada día mejor Gracias muchas gracias por tu amor.

### **A Juan y Carmen Zaragoza**

Por aceptarme en su hogar, su apoyo, sabiduría, aprecio, sinceridad y por cada momento alegre y triste compartido en este camino.

### **Al Dr. Luis Manuel y la Dra. Alma**

Por el delicioso café, galletitas y dulces que muchos sábados calmaron la anaconda que alberga mi estomago.

### **A la familia Díaz Montoya**

Por esas deliciosas tortitas de huevo con cilantro, por los alimentos compartidos durante toda la duración de los ensayos. Por las fiestas, piñatas, dulces y películas, apuestas y ayuda muchas gracias.

### **A mis amigos**

Verónica, Marcela, Eric, Edgardo, Alejandro, Israel, Javier, Aron, Alicia, Yordana, Viridiana, Tríni, Joaquín, Laura, Mariana, Marco, Oscar, Edith, Sandra, Elena, Toño, Batis, Héctor, Tatiana, Rosa, Karina, Daniel, Victoria, Linda, Yadira. Muchas gracias por escuchar mis chistes buenos y malos. Por compartir conmigo carreras, retos, fiesta, juegos, viajes, peleas, locuras y circunstancias extremas en algunas prácticas de campo, gracias por respetar mi forma de ser y estar conmigo en este tiempo donde he vivido momentos felices, tristes, de espera y equivocaciones gracias muchas gracias por ser mis amigos y recuerden que siempre los llevo en mi corazón.

**“Son muchas las manos y los corazones que contribuyen al éxito de una persona”**

**Walt Disney**

## **AGRADECIMIENTOS**

A los miembros del comité evaluador de esta tesis por sus valiosos comentarios:

Dra. Patricia Gómez de León Cruces, agradezco la confianza y el apoyo brindado en la dirección de esta tesis.

Dr. Francisco Javier Díaz García, Por confiar en mí, su apoyo incondicional en la realización de este trabajo. Muchas gracias por su valiosa enseñanza, confianza y amistad, sobre todo en los momentos más difíciles.

Dr Edgardo Escamilla Miravities, por sus valiosos comentarios que me brindo para la revisión de esta tesis.

A la M en C. María Eva Salinas Cortés, sus observaciones y sugerencias en la revisión de esta tesis.

Dr. Israel Castillo Juárez por apoyarme en numerosas ocasiones y por la constante discusión de ideas aportadas durante la revisión de este trabajo. Muchas gracias por su valiosa amistad.



## **AGRADECIMIENTOS**

A él Dr. Francisco Quiñonez por el apoyo otorgado en la donación de las cepas para su estudio y por la oportunidad que me dio para la realización de las pruebas de susceptibilidad para las mismas

A Miriam Galicia Velasco y Karina Bermejo por el gran conocimiento compartido y apoyo en toda mi estancia en el INER durante la realización de las pruebas.

Gracias a el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo y sobre todo a el personal de análisis clínicos por su gran hospitalidad y ayuda en este trabajo.

Un especial agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, por la educación de calidad brindada, su libertad de cátedra, su diversidad de opinión, por enseñarme a tener un libre pensamiento, por sus espacios escultóricos, su acceso y difusión de la cultura y las artes; sobre todo porque me permitió poder cumplir uno de mis sueños gracias.

*“Porque mejor es la sabiduría que las piedras preciosas  
y todo cuanto se puede desear, no es de compararse con ella.*

*Yo, la sabiduría, habito con la cordura,  
y hallo la ciencia de los consejos”*

**Proverbios 8: 11-12**

**ÍNDICE GENERAL**

	<b>Páginas</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	iii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	iv
<b>ABREVIATURAS</b>	v
<b>RESUMEN</b>	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades	2
1.2 Características del género <i>Haemophilus</i>	3
1.3 Virulencia y Patogenicidad	4
1.4 Infecciones por HiNT	6
1.4.2 Otitis media	6
1.4.3 Sinusitis	6
1.4.4 Fibrosis quística	6
1.4.5 Neumonía	7
1.4.6 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)	7
1.5 Importancia clínica y epidemiológica de la EPOC	7
1.6 Importancia clínica y epidemiológica en México	11
1.7 Biopelículas y HiNT en la EPOC	12
1.8 Empleo de antimicrobianos en pacientes con EPOC	14
<b>2 HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>19</b>

3.1	Objetivo General	19
3.2	Objetivos particulares	19
<b>4.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
4.1	Cepas bacterianas	21
4.2	Tipificación capsular mediante serología	21
4.3	Genotipificación capsular	22
4.4	Pruebas de identidad a nivel de especie <i>H. influenzae</i>	23
4.5	Ensayo de Formación de Biopelículas	24
4.6	Determinación de susceptibilidad a los antimicrobianos	
	Método de Kirby-Bauer	27
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
5.1	Caracterización fenotípica y genotípica	29
5.2	Capacidad de Formación de Biopelículas	29
5.3	Susceptibilidad a los antimicrobianos	35
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>53</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1.-</b> Diagrama general para la caracterización de las cepas de HiNT	20
<b>Figura 2.-</b> Ensayo para determinación de capacidad de formación de biopelículas	25
<b>Figura 3.-</b> Determinación de formación de biopelículas en función del tiempo de incubación	30
<b>Figura 4.-</b> Aspectos morfológicos de biopelículas formadas por HiNT <i>in vitro</i>	31
<b>Figura 5.-</b> Cultivo <i>in vitro</i> en caldo BHI Fildes 2%	32
<b>Figura 6.-</b> Aspectos morfológicos de biopelículas formadas <i>in vitro</i> y teñidas con CV al 1%	33
<b>Figura 7.-</b> Categorización de la capacidad de producción de biopelículas en cepas de HiNT	34
<b>Figura 8.-</b> Capacidad de formación de biopelículas entre las cepas HiNT 2019 y su mutante isogenica 2019 <i>SiaB</i> <sup>-</sup> a diferentes diluciones	35
<b>Figura 9.-</b> Frecuencias de sensibilidad / resistencia a los antimicrobianos en relación con la capacidad de formación de biopelículas	36

**ÍNDICE DE CUADROS**

	<b>Paginas</b>
<b>Cuadro.1.-</b> Requerimiento de factores de crecimiento en diferentes especies de <i>Haemophilus</i>	4
<b>Cuadro.2.-</b> Agentes infecciosos más comunes asociados con episodios de exacerbación en EPOC	10
<b>Cuadro 3.-</b> Clasificación de Antimicrobianos	16
<b>Cuadro 4.-</b> Actividad <i>in vitro</i> de varios antibióticos contra bacterias respiratorias en Latinoamérica y México	17
<b>Cuadro 5.-</b> Iniciadores empleados para la caracterización genotípica de las cepas de HiNT	24
<b>Cuadro 6.-</b> Valores de interpretación estándar diámetro (mm)	28
<b>Cuadro 7.-</b> Relación del perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana con la capacidad de formación de biopelícula	37

**ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ALAT</b>	Asociación Latino-americana de Tórax
<b>ATS</b>	American Thoracic Society
<b>CV</b>	Cristal Violeta
<b>EPOC</b>	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
<b>ERS</b>	European Respiratory Society
<b>GOLD</b>	Iniciativa Global en Enfermedad Pulmonar Obstructiva (del inglés, <i>Global Initiative in Obstructive Lung Disease</i> )
<b>HINT</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> no Tipificable
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>INER</b>	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
<b>LCFA</b>	Limitación Crónica del Flujo Aéreo
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>NAD</b>	Dinucleótido de nicotinamida
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PLATINO</b>	Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar
<b>PME</b>	Proteínas de membrana externa
<b>SAP</b>	Serología por aglutinación en placa
<b>SSE</b>	Solución salina estéril
<b>VIH</b>	El Virus de Inmunodeficiencia Humana

**Resumen**

En la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), *Haemophilus influenzae* no tipificable (HiNT) es causa importante de infecciones del tracto respiratorio, principalmente en los episodios de exacerbación de la enfermedad. Según el reporte PLATINO, acorde al criterio de la GOLD, la prevalencia estimada de EPOC en México es de 7.8% en personas mayores de 40 años de edad, incrementándose considerablemente con la edad; se estima que en personas de más de 60 años será de un 18.4%. Según estadísticas del año 2005 por el INEGI, la EPOC se situó en el 5° lugar dentro de las 10 principales causas de mortalidad en personas mayores de 65 años. En el INER, la EPOC ocupa el 2° lugar de visitas a urgencias y el 4° lugar como causa de egreso hospitalario. Varias líneas de evidencia indican que la formación de biopelículas por HiNT juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue determinar la distribución de la capacidad de formación de biopelículas entre cepas de HiNT y así como su posible correlación con el perfil de susceptibilidad a diversos antimicrobianos.

Se analizaron 40 cepas de HiNT aisladas de muestras clínicas de esputo de adultos con EPOC, durante episodios de exacerbación. Se incluyeron además las cepas HiNT 2019 y su mutante isogénica *siaB*<sup>-</sup> (Donadas por el Dr. Edward Swords). Dichas cepas fueron evaluadas *in vitro* mediante ensayo colorimétrico con CV, adaptado de Murphy y Kirkham. El perfil de susceptibilidad hacia 9 antimicrobianos empleados en casos de EPOC se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer.

Se obtuvo una distribución heterogénea en la capacidad de formación de biopelículas a las 48 h entre las cepas de HiNT. Se observaron 4 categorías de formación de biopelículas: 19,05% fueron formadoras altas ( $DO > 1.7$ ), 50% fueron formadoras moderadas ( $0.862 < DO \leq 1.7$ ), 21,43% fueron formadoras bajas ( $0.431 < DO \leq 0.862$ ) y el 10% no formaron biopelículas ( $DO \leq 0.431$ ). El 68% de las cepas mostró capacidad de formación de biofilms alta o moderada. Respecto al perfil de susceptibilidad antimicrobiano, las cepas presentaron mayor sensibilidad a los  $\beta$ -lactámicos y quinolonas, especialmente entre cepas con capacidad alta / moderada para formar biopelículas habiendo mayor proporción de susceptibilidad a los antibióticos entre cepas con capacidad alta-moderada para formación de biopelículas.

De acuerdo con estos las cepas de HiNT de casos de EPOC presentaron una elevada frecuencia de formación de biopelículas. Dicha capacidad de formación de biopelículas y no mostró correlación directa con el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos. Lo anterior se refuerza por los reportes de que los pacientes con EPOC tratados con los antibióticos de probada eficacia *in vitro*, frecuentemente presentan pobre eficacia clínica. El escaso conocimiento de EPOC en México hace necesaria la caracterización de la capacidad de formación de biopelículas entre cepas de HiNT y su posible participación en la patogénesis de la EPOC.



## 1. INTRODUCCION

Actualmente la EPOC es un problema de salud pública que causa alta morbilidad entre la población de adultos mayores de 60 años y tiene un gran impacto económico mundial. Los microorganismos involucrados son principalmente *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* [Murphy *et al* 1999; Páez *et al.*, 2000; Drago., 2009], éste último se ha aislado recurrentemente en dicho padecimiento [Murphy y Kirkham, 2002; Martí-Llitera *et al.*, 2009]. Durante los últimos años, los estudios sobre esta especie fueron enfocados hacia *H. influenzae* del serotipo **b**, patógeno grave en niños [Gómez de León *et al.*, 2000]. Desde la introducción de la vacuna conjugada en 1990 para este serotipo; la enfermedad provocada por ésta ha sido casi erradicada en países desarrollados [Gómez de León *et al.*, 2000; Gómez de León *et al.*, 2008; Gómez de León *et al.*, 2010]. Diversos estudios han argumentado que las cepas de HiNT se mantienen como causa importante en infecciones respiratorias [Martí-Llitera *et al.*, 2009] y que comúnmente se asocian a colonización secundaria. Habitualmente, cepas de HiNT están relacionadas con otitis media, sinusitis, enfermedades bronquiales asociadas con la EPOC y neumonía en pacientes VIH seropositivos [Murphy y Kirkham, 2002; Pang *et al.*, 2008; Martí-Llitera *et al.*, 2009]. La colonización por cepas de HiNT es normalmente transitoria [Drago., 2009], por ello diversas investigaciones buscan la identificación de factores que influyen a las cepas de HiNT para la colonización asintomática y su implicación en la patogenicidad [Murphy *et al.*, 1999; Murphy y Kirkham, 2002; Swords *et al.*, 2004; Martí-Llitera *et al.*, 2009].

La presencia de cepas de HiNT en pacientes con EPOC no solo se limita a la nasofaringe, sino que se extiende a los conductos superior e inferior de vías respiratorias. Estudios en pacientes han demostrado que las cepas de HiNT pueden habitar en el hospedero por períodos de meses a años, y que las exacerbaciones de

la EPOC están significativamente relacionadas con la adquisición de nuevas cepas; por lo cual consideran que la presencia de HiNT en pacientes con EPOC puede agravar la recurrencia de las mismas [Erwin y Smith., 2007; Drago., 2009; Murphy *et al.*, 2009]. El tratamiento para este padecimiento está basado principalmente en aplicación de antimicrobianos y glucocorticoides en las diferentes etapas de exacerbaciones, fundamentándose principalmente en el diagnóstico basado en cultivos de esputo [Kaji *et al.*, 2008; Martí-Llitera *et al.*, 2009].

El presente trabajo se enfoca a la identificación, biotipificación, serotipificación y formación de biopelículas de cepas de HiNT aisladas de pacientes con EPOC, para determinar la participación de la formación de biopelículas de HiNT en la patogenia de la EPOC. Así mismo es indispensable determinar la susceptibilidad de éste microorganismo a los agentes antimicrobianos de elección en la clínica.

### 1.1 Generalidades

Los miembros del género *Haemophilus* (Orden de las Eubacteriales, Familia *Pasteurellaceae*) habitualmente constituyen parte de la microbiota normal del tracto respiratorio de humanos, así como de otros vertebrados y se encuentra representado por varias especies de importancia médica, en particular por las cepas de *H. influenzae* que cohabitan como comensales o parásitas en el humano [Murray *et al.*, 2002].

El nombre de *Haemophilus* fue asignado por Winslow *et al.*, en 1920; y fue hasta 1933 que Smith y colaboradores establecieron que la influenza era causada por un virus, y que *H. influenzae* se presentaba solamente como causa de infecciones secundarias [Wenger y Ward, 2004; CDC, 2006]. *Haemophilus influenzae* tiene amplias

oportunidades de variar su genoma, lo que le confiere posibilidades de re-arreglo en sus determinantes de patogenicidad y virulencia [Murphy *et al.*, 1999].

## 1.2 Características del género *Haemophilus*

Las bacterias pertenecientes al género *Haemophilus* son cocobacilos gram-negativos que miden de 0.2 a 0.3  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.0  $\mu\text{m}$  a 1.5  $\mu\text{m}$  de longitud, aunque algunas veces presenta pleomorfismo, son organismos no móviles y no esporulantes, usualmente producen capsula. Este microorganismo se caracteriza por ser un anaerobio facultativo, oxidasa positiva y la reacción de la catalasa es variable [Albritton *et al.*, 1978; Hernández-Mendoza., 2005]. Puede utilizar distintos carbohidratos como fuente de carbono, excepto lactosa y sacarosa, por lo que es considerado un microorganismo nutricionalmente exigente. Este organismo fue llamado *Haemophilus* por su afección por la sangre y la incapacidad que presenta para crecer en medios de cultivo sin ella, debido a que carece de la capacidad enzimática de convertir el ácido delta amino-levulinico a porfirinas. Requiere además para su desarrollo de los factores X (hemina o hematina, protoporfirina IX; pigmento que contiene fierro y suministra compuestos tetrapirrol necesarios para la síntesis de citocromos y enzimas) y V (NAD) coenzima que participa en las reacciones de oxidación-reducción del metabolismo celular presentes en la sangre [García-Ramos *et al.*, 1998; Hernández-Mendoza., 2005] (Cuadro 1).

Muestra un marcado pleomorfismo, especialmente durante los estadios tardíos de su crecimiento *in vitro* o cuando se le aísla de pacientes que han recibido antimicrobianos. Dentro del género *Haemophilus* se incluyen ocho especies de importancia médica para los humanos.

**Cuadro.1. Requerimiento de factores de crecimiento en diferentes especies de *Haemophilus*.**

Espece	Factor X*	Factor V**
<i>H. influenzae</i>	+	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+
<i>H. aphrophilus</i>	-	-
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+
<i>H. segnis</i>	-	+
<i>H. ducreyi</i>	+	-

+, Presencia; -, Ausencia

\* Hemina o hematina

\*\* NAD, dinucleótido de nicotinamida y adenina

### 1.3 Virulencia y Patogenicidad

La superficie de muchas de las cepas de *H. influenzae* está cubierta por una cápsula de polisacárido con propiedad antifagocítica; además de ésta, existen otras estructuras superficiales tales como pili, proteínas de membrana externa (PME) importantes en investigaciones epidemiológicas, lipopolisacáridos (LPS) con actividad de endotoxina presentes en su membrana externa, así como algunos componentes extracelulares (proteasas que degradan IgA secretora y sérica) que participan en la patogénesis de las enfermedades causadas por este microorganismo

[Campagnari *et al.*, 1987; Barenkamp y Gemme III., 1994; Gómez de León *et al.*, 1995; Gilsdorf *et al.*, 1997; Gilsdorf., 1998; Gilsdorf *et al.*, 2004].

En 1931, Margaret Pittman (Pittman,1931) publicó un trabajo en el que mostró mediante serología que *H. influenzae* podía presentarse de forma capsulada y/o no capsulada; identificó seis serotipos distintos designándolos con las letras **a**, **b**, **c**, **d**, **e**,

y f de acuerdo con el constituyente de su polisacárido capsular. Las cepas que carecen de cápsula son denominadas no tipificables. Generalmente la determinación del serotipo de una cepa de *H. influenzae* se realiza mediante reacciones antígeno-anticuerpo [Falla *et al.*, 1994; La Claire *et al.*, 2003]. Falla y La Claire implementaron una técnica de tipificación capsular mediante PCR donde se realizó la detección del gen *bex A* que codifica para la proteína implicada en el transporte del material capsular, realizando una segunda PCR para la detección del locus *Cap*, que determina el tipo capsular [Falla *et al.*, 1994; La Claire *et al.*, 2003].

El serotipo b es el principal agente etiológico de meningitis bacteriana [Gómez de León *et al.*, 1995], neumonía bacteriémica, epiglotitis, septicemia, celulitis e infecciones osteoarticulares. Se ha descrito que más del 90% de las enfermedades invasivas por *Haemophilus influenzae* son causadas por cepas con cápsula b.

Recientemente en nuestro país se reconoció que las enfermedades invasivas por *Haemophilus influenzae* b han representado un problema prioritario de salud infantil, por lo que las autoridades del Sector Salud, implementaron un programa de prevención y control mediante inmunoprofilaxis, en donde se consideró tanto la elaboración como la aplicación de una vacuna conjugada PRP-T constituida por polirribosil-ribitol-fosfato acoplado a toxoide tetánico. Las vacunas conjugadas se han usado con eficacia en términos epidemiológicos. Las cifras previas a la introducción de la vacuna en México en 1999, indican que la frecuencia del aislamiento de *Haemophilus influenzae* de diferentes entidades clínicas fueron elevadas y por ende equiparables con las poblaciones infantiles de otros países no desarrollados en los que tampoco se habían liberado inmonógenos protectores [Gómez de León *et al.*, 1995; Gómez de León *et al.*, 2000; Gómez de León *et al.*, 2008; Gómez de León *et al.*, 2010].

Aunque la reducción en el estado de portador, inducida por las vacunas conjugadas es benéfica desde un punto de vista de mecanismos de inmunidad colectiva, se han incrementado los cuestionamientos sobre la posibilidad de reemplazo del serotipo b por otros serotipos o por cepas no tipificables [Murphy *et al.*,1999; Murphy y Kirkham, 2002; Swords *et al.*,2004; Pang *et al.*, 2008].

Se ha observado que además de causar daño mediante mecanismos de patogenicidad, existe una constante emergencia de cepas de *Haemophilus influenzae* resistentes a antibióticos. En 1977, se describió por primera vez la producción de  $\beta$ -lactamasas (enzimas líticas involucradas en la resistencia a ampicilina) por parte de esta bacteria, cuya detección es de gran importancia para la implementación de un tratamiento más adecuado [Paton *et al*2000; Wenger y Ward, 2004].

#### 1.4 infecciones por HiNT

Las cepas de HiNT son causa de enfermedades agudas asociadas a sitios del conducto respiratorio y contiguo, entre las que se incluyen:

**1.4.1 Otitis media:** Las cepas HiNT son responsables del 20% al 40% de los casos de otitis media de la población infantil, confirmada bacteriológicamente, siendo esta la enfermedad más frecuente en la primera infancia. Donde se ha observado que se pueden experimentar de 1 a 3 episodios de otitis antes de los 2 años [Novotny y Bakaletz, 2003; Roberts *et al.*, 2004].

**1.4.2 Sinusitis:** El 31% de los casos se atribuye a HiNT [Harker., 2007].

**1.4.3 Fibrosis quística:** En los estadios iniciales de colonización de pulmón, *Haemophilus influenzae* es un patógeno importante [Cantón *et al.*, 2002].

**1.4.4 Neumonía:** Las manifestaciones clínicas de HiNT no se diferencian de otras neumonías bacterianas, se presentan fiebre, tos y esputo purulento, habitualmente de varios días de duración. Gran parte de la neumonía bacteriana en adulto está dada por cepas de HiNT, en general afecta a pacientes en edad avanzada con EPOC [Puig-Barberá *et al.*, 2007]

**1.4.5 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC):** En esta enfermedad bacterias como HiNT, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*. están involucradas en aproximadamente la mitad de las exacerbaciones agudas [Murphy y Kirkham, 2002]

## 1.5 Importancia clínica y epidemiológica de la EPOC

Entre la población de adultos, la afección más importante por HiNT se presenta en los episodios de exacerbación de la EPOC [Murphy *et al.*, 1999]. La morbilidad y mortalidad por EPOC está cobrando relevancia en el mundo y su incidencia va creciendo en la medida que aumenta el tabaquismo y la edad de la población. La prevalencia a nivel mundial en personas mayores de 40 años de edad rebasa el 10% [Carrillo., 2007; García *et al.*, 2008; Martí-Llitera *et al.*, 2009].

Asimismo, la EPOC se relaciona con la pérdida de productividad, debido a que aproximadamente el 25% de los pacientes con EPOC que acuden a consulta externa, el 50% de los que se hospitalizan y el 60% de los enfermos graves desarrollan desnutrición (peso inferior al 90% del peso calculado para su edad, género y talla). Dicha condición favorece el desarrollo de infecciones, reduce la fuerza de los músculos respiratorios y la tolerancia al ejercicio, lo cual a su vez

ocasiona deterioros progresivos de calidad de vida a medida que avanza la enfermedad [Carrillo., 2007; García *et al.*, 2008]

Durante muchos años ésta enfermedad se definió como un síndrome caracterizado por pruebas anormales del flujo respiratorio que no cambian de manera notable durante períodos de observación de varios meses. La Bronquitis Crónica y el Enfisema Pulmonar son entidades asociadas a EPOC. Esta definición incluye a ciertos sujetos asmáticos que experimentan obstrucción crónica al flujo de aire, así como a personas con trastornos menos frecuentes como bronquiectasias y obstrucción de vías respiratorias altas [ATS, 1995; Páez *et al* 2000]. El término EPOC se utiliza habitualmente como sinónimo de la combinación de lesiones bronquiales crónicas y enfisema cuando el paciente presenta en su evolución una Limitación Crónica del Flujo Aéreo. Histopatológicamente tiene como base una lesión destructiva de los alveolos (enfisema) y un fenómeno inflamatorio crónico que afecta especialmente los bronquiólos. [ATS, 1995; ERS,1991; Montes de Oca *et al*2009].

En las definiciones de 1995 hechas por la ATS y de la ERS, se caracterizó a la enfermedad por la “presencia de obstrucción al flujo aéreo por lesiones bronquiales crónicas o enfisema”, y como un “trastorno caracterizado por una reducción del flujo respiratorio máximo, junto con un vaciado forzado lento de los pulmones, alteraciones que no cambian en el transcurso de varios meses”, [ATS, 1995; ERS, 1991]. La definición más práctica de EPOC ha sido propuesta por GOLD como sigue: “Enfermedad Caracterizada por limitación al flujo aéreo que no es totalmente reversible, usualmente progresiva y asociada a inflamación en pulmones en respuesta a gases o partículas nocivas” [Fabbri *et al.*, 2003].



Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de EPOC es el tabaquismo, asociado a una predisposición probablemente de origen genético, actualmente desconocida. Otro factor es la exposición a humo de leña, especialmente en mujeres que usan este combustible en su hogar y actualmente se está tomando en cuenta la contaminación existente en las grandes ciudades, por lo que es poco probable que en ausencia de estos factores de riesgo se pueda diagnosticar apropiadamente este padecimiento [ERS, 1991; ATS, 1995; Fabbri et al 2003; Martí-Lliteras et al., 2009; Montes de Oca et al/2009].

Una de las causas más importantes que llevan al paciente a atenderse por causa de EPOC son las exacerbaciones, frecuentemente ocasionadas por infecciones del tracto respiratorio [Agustí et al; 2003; Fabbri et al., 2003; Valle., 2006; Montes de Oca et al/2009].

En la evolución clínica de esta entidad, los procesos infecciosos desempeñan un papel importante (Cuadro 2) , por lo que la relación entre la EPOC y las infecciones ha sido motivo de preocupación científica y se ha abordado desde dos puntos de vista: a) Que las infecciones respiratorias participan como factores potenciales de riesgo para la aparición y progresión de la enfermedad en adultos, y b) Que las infecciones causan descompensación importante en los pacientes que ya padecen EPOC [Martí-Llitera et al., 2009]. En este tipo de pacientes se puede observar que se presentan cambios histológicos y funcionales en el conducto respiratorio, ya que se reduce la eficacia del transporte mucociliar de los microorganismos a través del árbol traqueobronquial. Por ello, en estos pacientes, el aumento de la densidad bacteriana se relaciona con un mayor grado de deterioro del arrastre mucociliar [Erwin y Smith.,2007; Kaji et al., 2008; Drago.,2009; Martí-Llitera et al., 2009].

**Cuadro 2. Agentes infecciosos más comunes  
asociados con episodios de exacerbación en EPOC**

<b>Etiología</b>	<b>Agentes</b>
Viral	Rinovirus
	Virus de Influenza
	Virus de Parainfluenza
	Coronavirus
	Adenovirus
	Virus Sincicial Respiratorio
Bacteriana	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Moraxella catarrhalis</i>
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>

En la EPOC la liberación de productos bacterianos y de elastasas de leucocitos polimorfonucleares lesionan el epitelio bronquial en detrimento del transporte mucociliar, que se asocia con un incremento significativo de la densidad de microorganismos residentes y la acumulación de productos tóxicos que favorecen su mantenimiento [Erwin y Smith.,2007].

Existen circunstancias múltiples que hacen a los sujetos con EPOC más vulnerables a padecer de infecciones respiratorias, como son: a) Colonización de vías aéreas, b) Alteración en el transporte mucociliar, c) Hipersecreción e hiperviscosidad mucosa, d) Alteración de la geometría bronquial e inflamación del epitelio bronquial, entre otras. *H. inflienzae* no tipificable, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* suelen ser los colonizadores más frecuentes en la vía respiratoria superior de pacientes con EPOC

[Drago., 2009; Tandon *et al.*, 2010]. El incremento en la mortalidad por EPOC ha sido sustancial en los últimos 30 años. En 1990 ocupaba el sexto lugar y se estima que para el 2020 podría ser la tercera causa de muerte en el mundo, mientras en morbilidad se situará del cuarto al tercer lugar a nivel mundial. Por lo anterior, es importante estudiar la

patogénesis de la enfermedad, así como establecer medidas de prevención y tratamiento oportunos, ya que esto evitará una creciente de costos, morbilidad y mortalidad por EPOC [Valle.,2006; Montes de Oca *et al*2009; Blasi *et al.*, 2010].

### 1.6 Importancia clínica y epidemiológica en México

En México el habito al tabaco es causa principal de esta enfermedad; actualmente afecta a 14 millones de mexicanos, sin embargo existen otros factores de riesgo. Los datos estadísticos del censo del 2000 muestran que el 56.9% de las poblaciones rurales utilizan leña como combustible, siendo la exposición al humo de leña y carbón, causa de esta enfermedad [Valle., 2006; Carrillo., 2007; Barriga *et al* 2008; Escalante *et al.*, 2008]. Sin dejar de mencionar otros factores involucrados como la inhalación de polvos, humos, gases y sustancias químicas que hay en las fábricas, talleres, minas, industria de la cantera, etc. [García-Guillen., 2006; Carrillo., 2007; Escalante *et al.*, 2008].

En México, como en los demás países de Latinoamérica, la EPOC es una enfermedad sobresaliente por su morbi-mortalidad, sin embargo permanece subdiagnosticada y poco reconocida como un problema de salud pública. Según estimaciones publicadas en el reporte PLATINO México muestra problemas de subdiagnostico [Menezes *et al.*, 2005; García-Guillen., 2006; García *et al.*, 2008; Montes de Oca *et al*2009].

Se conoce por casos de ingresos a instituciones hospitalarias de enfermedades respiratorias que *Haemophilus influenzae* NT es uno de los principales microorganismo relacionado con las exacerbaciones de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, en nuestro país, ya que se aísla en más de la mitad de los CASOS. [García-Guillen., 2006; Barriga G. *et al.* 2008; García *et al.*, 2008].

En el INER la EPOC es la 4ª causa de demanda de atención por primera vez en consulta externa y la 5ª en hospitalización y mortalidad. Se estima que en México, el costo de atención diaria de un paciente con EPOC en la unidad de cuidados intensivos alcanza hasta 25 mil pesos, mientras que la estancia promedio de un paciente hospitalizado es de 9 días, lo cual indica el alto impacto económico ocasionado por dicho padecimiento. Se estima que en México actualmente podrían existir más de 6 millones de enfermos de EPOC, siendo ésta la 6ª causa de muerte entre adultos; además el 75% de éstos no son tratados ni adecuada ni oportunamente por ignorar que la padecen [García-Guillén., 2006; Barriga G. *et al.* 2008].

### 1.7 Biopelículas y HiNT en la EPOC

Las biopelículas son comunidades de células bacterianas estructuralmente bien definidas, embebidas en una matriz polimérica elaborada por la bacteria, que es adherible a superficies vivas o inertes. Se estima que el 99.9% de las bacterias en la naturaleza se enlazan a una superficie mediante estructuras como esta o similares [Stepanovic *et al.*, 2000]. En la década anterior se reconoció que las biopelículas están implicados en la patogénesis de infecciones humanas tales como; caries dental, otitis media con efusión, neumonía con fibrosis quística etc. [Evans *et al* 1991; Meluleni *et al.*, 1995; Fink *et al.*, 2003; Fux *et al.*, 2005a].

Desde un punto de vista metabólico, se cree que las células de la biopelícula tienden a minimizar su gasto energético quedando en estado estacionario. En el caso de *Haemophilus influenzae*, una adhesina auto transportadora, llamada *Hap*, media la adherencia bacteriana a la matriz extracelular y a células del hospedero, induciendo

la formación de microcolonias, un paso inicial en la formación de biopelículas [Fink *et al.*, 2002; Fink *et al.*, 2003].

Recientemente la virulencia de algunos microorganismos se atribuye en parte a la elaboración de biopelículas que los protegen de la eliminación por el sistema inmune [Fux *et al.*, 2005a; Cerca *et al.*, 2006;]. La comprensión de las estructuras de biopelículas y de su distribución es importante dada la tolerancia de estas comunidades o los antimicrobianos [Evans *et al* 1991; Meluleni *et al.*, 1995; Fux *et al* 2005a].

En cepas de HiNT se ha reconocido la habilidad de formar biopelículas, dicha estructura podría conferir mecanismos de evasión a la respuesta inmune [Murphy y Kirkham, 2002; Swords *et al.*, 2004]. Cepas de HiNT se han implicado actualmente como causantes de infecciones secundarias u oportunistas, principalmente en enfermedades asociadas al conducto respiratorio de humanos, por lo cual estas adquieren mayor relevancia como agentes patógenos. Un estudio realizado por Murphy y cols. en 1999, reveló características interesantes sobre la dinámica de colonización de *H. influenzae* en EPOC, encontrando que si bien se presenta recambio de cepas por otras nuevas de HiNT, algunas otras poseen la posibilidad de persistir durante muchos meses [Murphy *et al* 1999].

Mediante cultivos mensuales de esputo, Fink y Cols (2003), mostraron la presencia intermitente de cultivos negativos en vez de colonización continua por la misma cepa, según estudios de tipificación molecular. Esto indica que el organismo está presente, no obstante la falla en la recuperación a partir del esputo; lo que sugiere que *H. influenzae* puede colonizar formando biopelículas en el tracto respiratorio de adultos con EPOC [Fink *et al* 2003]. La presencia de un gran número de bacterias en la expectoración de los pacientes con exacerbaciones de bronquitis crónica, sugiere

que la infección bacteriana puede tener algún papel etiológico en la enfermedad, además de que éstas suelen acompañarse de incrementos concomitantes de neutrófilos circulantes y de una serie de mediadores proinflamatorios, los cuales en conjunto pueden participar en el deterioro de la función pulmonar. Por ello, el empleo de antibióticoterapia se ha considerado importante en el tratamiento de EPOC [Solórzano

*et al.*,1998; Kaji *et al.*, 2008; Blasi *et al.*, 2010; Miravittles *et al.*2010].

### **1.8 Empleo de antimicrobianos en pacientes con EPOC**

La creciente resistencia bacteriana a múltiples antimicrobianos ha generado un cambio significativo en la salud global, [Kibsey., 1994; Solórzano *et al.*,1998; Lewis., 2001] aún cuando existen guías o normas para el manejo de los mismos [Goldmann *et al.*, 1997]. Es innegable que al administrar un antibiótico en forma sistémica, además de que actúa contra el patógeno supuesto, también afecta a los microorganismos comensales de la nasofaringe, así como de otros hábitats bacterianos presentes en el humano. Actualmente existe un modelo matemático que ha demostrado la influencia que puede tener un antibiótico sobre la genética de poblaciones bacterianas y su resistencia a antibióticos [Goldmann *et al.*, 1997; Barriga *et al.* 2008; Miravittles *et al.*, 2010].

La resistencia antimicrobiana puede tener un impacto substancial en el mantenimiento y la evolución clínica de la infección que se esté tratando, ya que además puede incrementar las posibilidades de transmisión horizontal, afectando la morbilidad y la mortalidad por causa de la infección [Fux C. *et al.* 2005a; Barriga *et al.* 2008; Kaji *et al.*, 2008].

La selección óptima de los antimicrobianos apropiados para combatir las enfermedades infecciosas exige del juicio clínico y del conocimiento detallado de los factores farmacológicos y microbiológicos. Actualmente para el tratamiento de la

EPOC los antibióticos son usados en dos formas generales, como terapéutica empírica y como fármacos definitivos. Si se usan de manera empírica o como terapéutica inicial, el antibiótico debe atacar a todos los microorganismos patógenos posibles, debido a que no se ha identificado al microorganismo o microorganismos infectantes. Sin embargo, una vez identificado el agente infectante habrá que emprender la antibióticoterapia definitiva. Por lo que cuando está indicado un antimicrobiano, la meta es seleccionar un producto que sea activo de manera selectiva con él o los microorganismos infectantes [Soriano *et al.*, 2004; Fux *et al.* 2005a; Barriga *et al.* 2008].

En el tratamiento de la EPOC, dependiendo del grado de exacerbación que manifiesta el paciente, se realiza la aplicación de diferentes tipos de antibióticos. Los antimicrobianos de primera elección en EPOC incluyen: amoxicilina, cefuroxima y macrólidos; en EPOC grado II-III con alta prevalencia de *H. influenzae*, y gérmenes Gram negativos (excepto *Pseudomonas aeruginosa*): Amoxicilina-Acido clavulánico, levofloxacino y telitromicina; en EPOC grado IV (con alto riesgo de etiología por BGN, incluyendo *P. aeruginosa*): ciprofloxacina, ceftazidima y cefepime. Previo a la prescripción de cada tratamiento se realiza un análisis microbiológico del esputo

[Soriano *et al.*, 2004; Barriga *et al.* 2008; Kaji *et al.*, 2008]. La susceptibilidad antimicrobiana de *Haemophilus influenzae* se realiza principalmente por dos métodos: a) El método de microdilución en caldo, y b) Método de difusión en agar (Kirby Bauer). De acuerdo a su estructura química, mecanismos de acción y efecto antimicrobiano, los antibióticos se pueden clasificar como se muestra (Cuadro 3):

**Cuadro 3. Clasificación de Antimicrobianos <sup>a</sup>**

<b>Grupo <sup>b</sup></b>	<b>Blanco celular</b>	<b>Efecto antimicrobiano</b>
β-lactámico	Pared celular	Inhíbe la síntesis de pared celular
β-lactámico / inhibidor de β- lactamasa	Enzima β-lactamasa.	Inhíbe la acción de la enzima β-lactamasa evitando la destrucción del antibiótico β-lactámico
Cefalosporinas	Pared celular	Inhíbe la síntesis de la pared celular
Carbapenems	Pared celular	Inhíbe la síntesis de la pared celular
Monobactams	Proteínas ligadoras de penicilina	Forma estructuras filamentosas largas que la hacen no viable
Macrolidos	Subunidad ribosómica 50S	Inhíbe la síntesis de proteínas
Tetraciclinas	Subunidad ribosómica 30S	Inhíbe la síntesis de proteínas
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girasa	Inhíbe el superenrollamiento del DNA
Sulfonamidas	Enzima dihidrofolato reductasa	Inhíbe la síntesis del ácido fólico
Cloranfenicol	Subunidad ribosómica 50S	Inhíbe la síntesis de proteínas

<sup>a</sup> Antibióticos agrupados según su estructura química.

<sup>b</sup> Antibióticos de primera elección

No obstante que los antibióticos han sido muy utilizados en el tratamiento de las exacerbaciones agudas de la EPOC, e incluso para su profilaxis, no han demostrado su eficacia en la prevención o en el tratamiento de la enfermedad. Su utilización está justificada en las exacerbaciones de origen infeccioso que, en ocasiones, colocan a estos pacientes en situaciones comprometidas para su vida, es por ello que la decisión de la prescripción y la selección de los antibióticos apropiados requieren de un análisis más cuidadoso (Cuadro 4) [Barriga *et al.* 2008].

Existen muy pocos estudios sobre susceptibilidad antimicrobiana para *H. influenzae* en México. El primer estudio realizado al respecto mostró que el 14% de las cepas de *H. influenzae* tipo b fueron resistentes a ampicilina, y no se hallaron cepas resistentes a cloranfenicol [Trejo y Pérez *et al.*, 1981]. Posteriormente se notificaron las primeras dos cepas con multirresistencia, fenómeno que continúa siendo esporádico en la actualidad [Soriano *et al.*, 2004].



**Cuadro 4. Actividad *in vitro* de varios antibióticos contra bacterias respiratorias en Latinoamérica y México.**

Agente antimicrobiano	Sensibilidad (%)		
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>M. catarrhalis</i>
Penicilina	71.4	ND	ND
Amoxicilina	85.5	87.2	6.2
Clavulanato	85.5	99.6	100
Cefuroxima	81.2	98.8	99
Cefotaxima	88.9	100	100
Azitromicina	87.2	100	100
Claritromicina	86.2	91.7	100
Telitromicina	100	98.4	100
Levofloxacina	98.3	100	100
Moxifloxacina	98.7	100	100
Gemifloxacina	99.6	100	100

ND, No hay datos disponibles

En estudios recientes sobre portadores faríngeos asintomáticos, los porcentajes de resistencia a ampicilina y cloranfenicol han sido variables dependiendo de la población estudiada, pero en general se encuentra alrededor de 20% de resistencia a ampicilina y una nula o muy baja resistencia al cloranfenicol; en los estudios realizados en México, la resistencia hacia macrólidos ha sido elevada [Villaseñor-Sierra *et al* 1993]; estadísticas que nos informan sobre mejoras que los pacientes con EPOC puedan tener con la terapia antimicrobiana, es por ello que no existe un consenso adecuado acerca de la terapia antimicrobiana más eficaz en México.

## 2. HIPÓTESIS

- I. Las cepas de *Haemophilus influenzae* NT aisladas de pacientes con EPOC presentan alta capacidad de formación de biopelículas.
  
- II. Se presume la posibilidad de que haya una correlación directa entre la capacidad de formación de biopelículas y la resistencia a los antimicrobianos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Determinar la distribución de la capacidad de formación de biopelículas entre cepas de *Haemophilus influenzae* NT aisladas de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; así como su posible correlación con el perfil de susceptibilidad a diversos antimicrobianos.

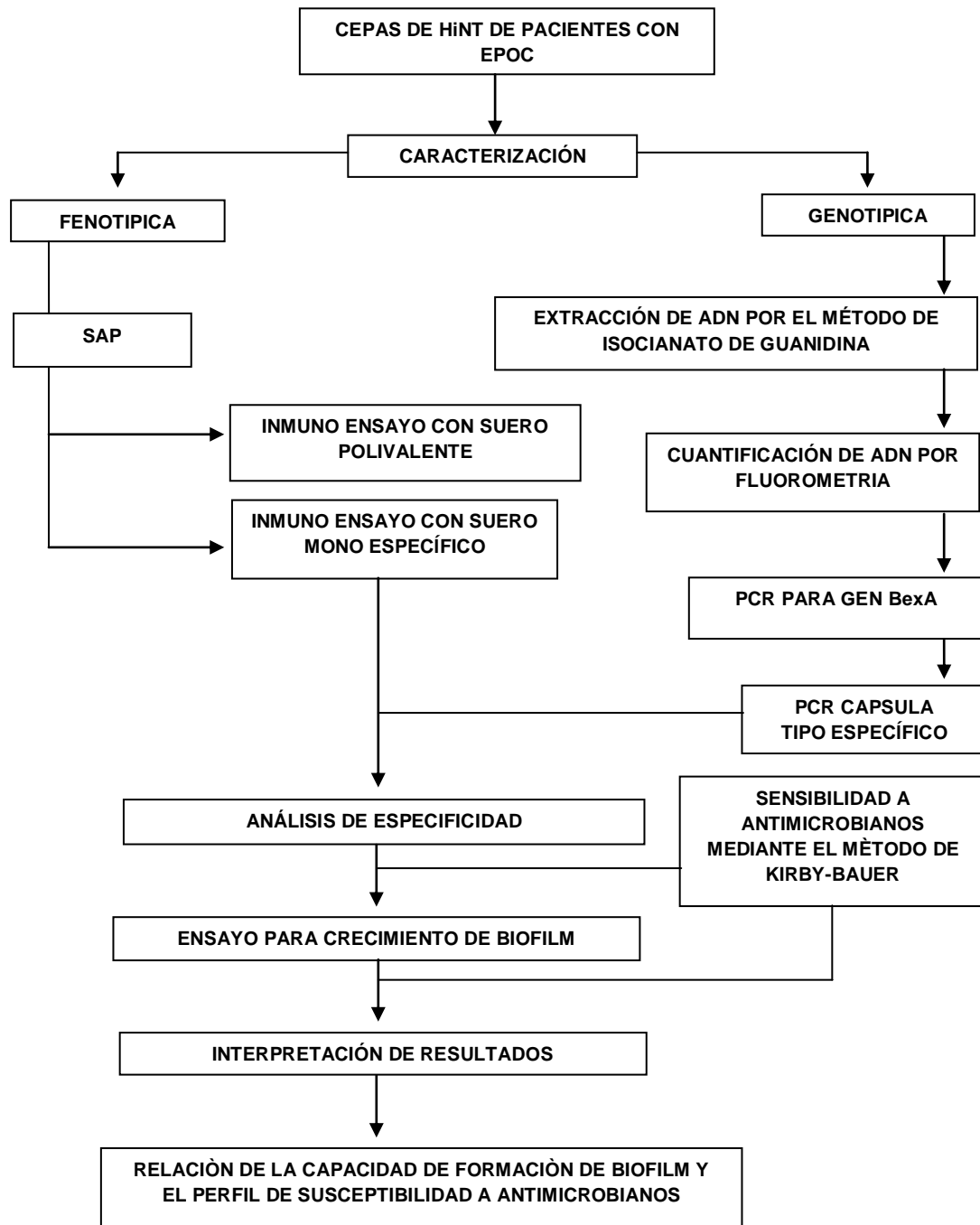
#### **3.2 Objetivos particulares**

- I. Verificar el fenotipo/genotipo acapsular de las cepas de *Haemophilus influenzae* NT mediante serología y PCR.
- II. Determinar la capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Haemophilus influenzae* NT.
- III. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Haemophilus influenzae* NT a los antibióticos de elección usados para el tratamiento de pacientes con EPOC.
- IV. Evaluar la posible correlación entre la capacidad de formación de biopelículas y el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte práctica de este trabajo incluyó diversas aproximaciones experimentales para la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas del estudio, según se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Diagrama general para la caracterización de las cepas de HiNT.



#### 4.1 Cepas bacterianas

Se incluyeron 40 cepas de HiNT aisladas de muestras de esputo de pacientes con EPOC que acudieron al INER. Las cepas fueron aisladas durante algún episodio de exacerbación. Se incluyeron además 2 cepas de HiNT como testigos de la capacidad de formación de biopelícula: cepa HiNT 2019 y su mutante isogénica *siaB*<sup>-</sup> (Donadas por el Dr. Edward Swords, Universidad de Wake Forest, Carolina del Norte, EUA) [Swords *et al.*,2004]. Las cepas de HiNT se conservaron a -70 °C en caldo BHI-leche descremada-glicerol suplementado con 3.5% de Fildes. Para verificar la pureza y la viabilidad de las cepas, pequeñas alícuotas de éstas se descongelaron directamente sobre placas de gelosa BHI suplementada con 3.5% de Fildes, se incubaron durante 24 hrs a 37°C en microaerofilia. Enseguida se realizaron los estudios de tipificación capsular a nivel fenotípico y genotípico, según los métodos estándares [Falla *et al* 1994; La Claire *et al* 2003; Stralin *et al.* 2005].

#### 4.2 Tipificación capsular mediante serología.

Se empleó la técnica de serología por aglutinación en placa (SAP) con antisuero polivalente hacia los componentes capsulares **a, b, c, d, e** y **f** (Difco, Laboratories) en primera instancia para verificar el fenotipo No tipificable y en segunda instancia con el antisuero anti cápsula b (Difco, Laboratories) para descartar el fenotipo b<sup>-</sup>. Brevemente, se prepararon suspensiones de las bacterias en solución salina estéril (SSE) al 0.85%, aproximadamente al 0.5 del Nefelómetro de Mcfarland, enseguida se colocaron en forma adyacente 2 alícuotas de 25 µL de cada suspensión en un portaobjetos marcado previamente con el número de la cepa, posteriormente se agregaron 10 µL del antisuero apropiado a la primera alícuota y 10 µL de SSE a la

segunda alícuota, se homogeneizaron con un aplicador de madera y se agitaron con movimientos rotatorios durante un minuto. La ausencia de aglutinación con el antisuero polivalente y/o con el antisuero tipo específico, así como ausencia de aglutinación en los testigos con SSE, confirmó el fenotipo No tipificable en las cepas de *H. influenzae*.

### **4.3 Genotipificación capsular**

Se realizó la extracción de ADN bacteriano según el método de Isotiocianato de Guanidina descrito por Boom *et al* [Boom *et al* 1990]. Enseguida se hizo la cuantificación del ADN purificado mediante el método fluorométrico. El fenotipo No tipificable de las cepas de este estudio se confirmó mediante el ensayo de PCR para la detección de segmentos de los genes que codifican para proteínas involucradas en la exportación y biosíntesis de los polisacáridos capsulares (Cuadro 5), según los métodos descritos previamente [Falla *et al* 1994; La Claire *et al* 2003]. En breve, se prepararon alícuotas de 25  $\mu$ l de la mezcla de reacción conteniendo TRIS HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM del juego de oligonucleótidos apropiado 0.9  $\mu$ M, de cada uno de los dNTP's 0.2 mM, ~50 ng de ADN molde y Taq ADN polimerasa 0.5 UI. La reacción de amplificación consistió de un paso de desnaturalización a 94°C durante 10 min., seguido de 35 ciclos de desnaturalización (30 seg a 94°C), alineación de los iniciadores (30 seg a 58°C) y extensión de la cadena (1min 72°C). Finalmente, se realizó un paso de extensión prolongada durante 7 min a 72°C. Los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Ultrapure, Gibco BRL, Life Technologies, Inc.), teñidos con bromuro de etidio.

**4.4 Pruebas de identidad a nivel de especie de *H. influenzae***

Se realizó la detección de segmentos génicos conservados de *H. influenzae*, del rADN, 16S y de la proteína de membrana externa (OMP) 6, empleando los iniciadores (Cuadro 5) y el método descritos por Stralin [Stralin *et al.*, 2005]. La amplificación se realizó en 25  $\mu$ l de mezcla de reacción conteniendo Tris HCl 20mM, pH 8.4, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM , de cada uno de los oligonucleótidos 0.5 $\mu$ M, de cada uno de los dNTP's 0.2mM, ~50 ng de ADN molde y Taq ADN polimerasa 0.5 UI. La amplificación se inició con un ciclo de desnaturalización de 10 min a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturalización (30 seg a 94°C), alineación de los iniciadores (30 seg a 58°C) y extensión de la cadena (1min a 72°C). Al final se realizó un paso de extensión prolongada durante 7 min a 72°C. Los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Ultrapure, Gibco BRL, Life Technologies, Inc.), teñidos con bromuro de etidio.

Cuadro 5. Iniciadores empleados para la caracterización genotípica de las cepas de HiNT

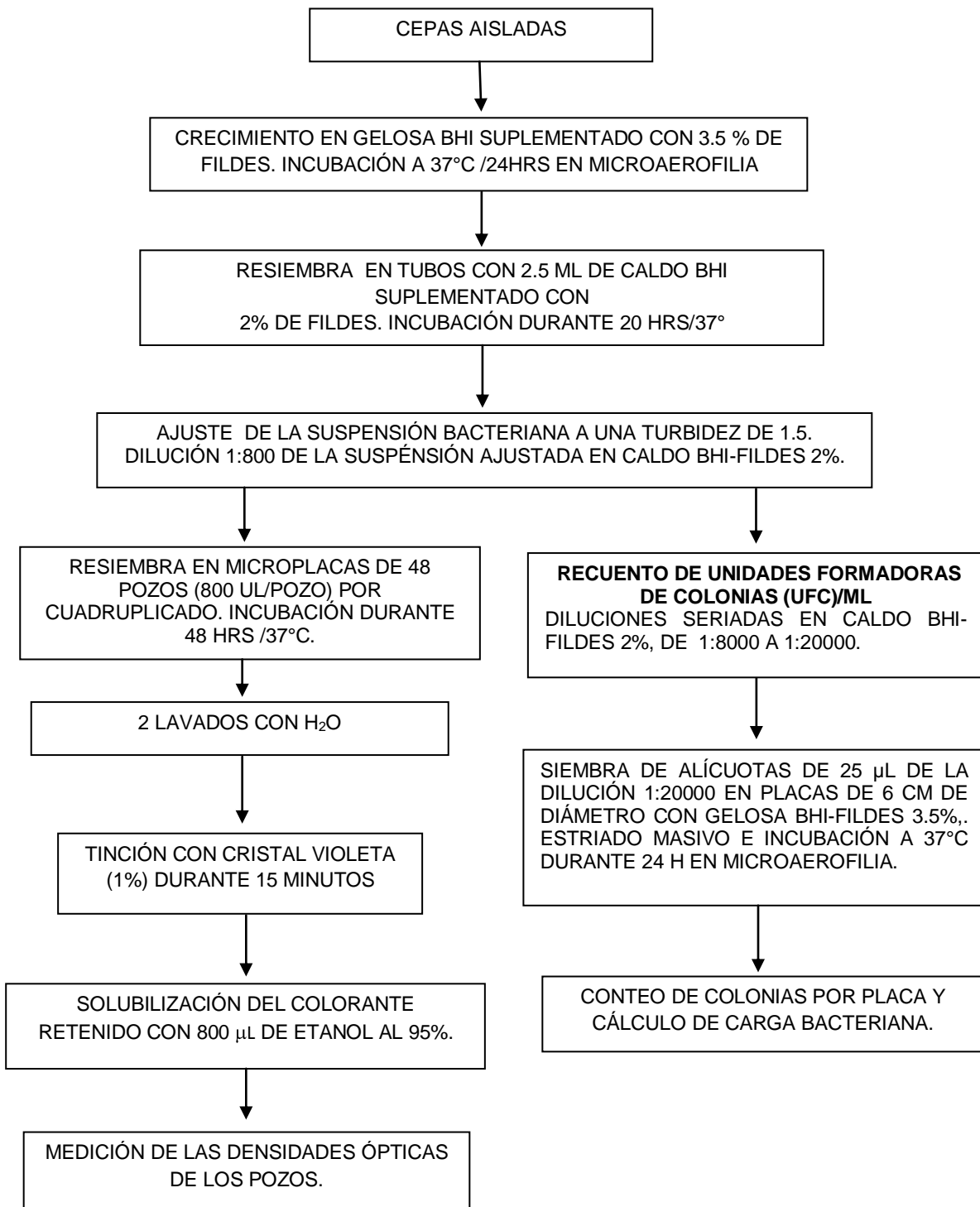
Nombre del Iniciador	Secuencia (5' a 3')*	Blanco	Tamaño del amplicon (pb)
a1	CTACTCATTGCAGCATTTC	Cap a	250
a2	GAATATGACCTGATCTTCTG		
b1	GCGAAAGTGAAGTCTTATCTCTC	Cap b	480
b2	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA		
c1	TCTGTGTAGATGATGGTTCA	Cap c	250
c2	CAGAGGCAAGCTATTAGTGA		
d1	TGATGACCGATACAACCTGT	Cap d	150
d2	TCCACTCTTCAAACCATTCT		
e1	GGTAACGAATGTAGTGGTAG	Cap e	1,350
e2	GCTTTACTGTATAAGTCTAG		
f1	GCTACTATCAAGTCCAAATC	Cap f	450
f2	CGCAATTATGGAAGAAAGCT		
HI-1	CGTTTCTATGATGTTGATCCAGAC	<i>bexA</i>	343
HI-2	TGTCCATGTCTTCAAATGATG		
Hi-P6-F	TTGGCGGWTACTGTTGCT	Gen de OMP 6	
Hi-P6-R	TGCAGGTTTTTCTTCACCGT		
Hi-16S-F	TCCTAAGAAGAGCTCAGAGAT	rDNA 16S	206
Hi-16S-R	TGATCCAACCGCAGGTTCC		

\*Falla *et al* (1994). PCR For Capsular typing of *Haemophilus influenzae*.  
J. Clin. Microbiol., 32:2382-2383

#### 4.5 Ensayos de Formación de Biopelículas

Se evaluó la capacidad de formación de biopelículas *in vitro* de las cepas de HiNT, partiendo del modelo propuesto por Murphy y Kirkham [Murphy y Kirkham; 2002] con algunas modificaciones, según se indica en la Figura 2.





**Figura 2. Ensayo para determinación de capacidad de formación de biopelículas**

Las bacterias se crecieron en placas de 10 cm. de diámetro con gelosa BHI suplementada con 3.5% de Fildes (BHI-Fildes 3.5 %), durante 24 hrs a 37°C en microaerofilia. Enseguida las cepas se resembraron individualmente en 2.5 mL de caldo BHI suplementado con 2% de Fildes (BHI-Fildes 2%), tomando un inóculo abundante del crecimiento en gelosa con un asa de 2 mm de diámetro.

Los tubos inoculados y debidamente etiquetados se colocaron en una incubadora con agitación orbital durante 20 hrs a 37°C; se incluyó un tubo con caldo sin inocular como testigo negativo. Transcurrida la incubación, se inspeccionaron los tubos ajustando la turbidez a un valor de 1.5 en la escala de Mcfarland. Enseguida se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L de cada suspensión bacteriana; se diluyeron en 4 mL de caldo BHI-Fildes 2% (dilución 1:800), posteriormente se depositaron 800  $\mu$ L/pozo por cuadruplicado de esta suspensión en microplacas de 48 pozos c/ tapa ((Costar, Corning Inc., New York)), se incluyeron 8 replicas de caldo BHI-Fildes 2% sin inocular como testigos negativo. Las orillas de las microplacas se sellaron con parafilm y se incubaron durante 48 hrs a 37°C.

Una vez concluida la incubación, las microplacas se observaron al microscopio invertido empleando el objetivo 10X, para confirmar la presencia de material sedimentado en los pozos inoculados y su ausencia en los pozos testigo, así mismo para detectar posible crecimiento microbiano contaminante (éste generalmente se observo por una turbidez uniforme después de incubar toda la noche; HiNT crece muy lento).

Se procedió a retirar el sobrenadante de cada pozo mediante aspiración con vacío, inmediatamente se añadieron 800  $\mu$ L/pozo de Cristal Violeta (CV) al 1% en agua

(p/v) y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El exceso de colorante se removió de las microplacas mediante aspiración con vacío, e inmediatamente se realizaron 2 lavados con 850  $\mu$ L/pozo de agua desionizada, finalmente se dejó secar al aire en posición invertida sobre papel absorbente.

Posteriormente, el colorante retenido en la microplaca se solubilizó con 800  $\mu$ L/pozo de etanol al 95% y se procedió a tomar la lectura de densidad óptica de cada pozo a longitud de onda de 570 nm ( $DO_{570}$ ), empleando etanol al 95% como blanco de calibración. Con estos datos se obtuvieron los promedios de  $DO_{570}$  de los cuadruplicados de cada cepa y se contrastaron con los valores de corte obtenidos con el promedio de  $DO_{570}$  de los testigos [Stepanovic *et al.* 2000], como sigue:

Valor de corte (VC) 1= Promedio de  $DO_{570}$  de los testigos + 3 DE

VC2 = VC1 x 2

VC3 = VC1 x 4

Según los valores de corte, las cepas se separaron en 4 categorías, a saber:

No formadora de Biopelícula:  $DO_{570} \leq VC1$

Baja formación de biopelícula:  $VC1 < DO_{570} \leq VC2$

Moderada formación de biopelícula:  $VC2 < DO_{570} \leq VC3$

Alta formación de biopelícula:  $DO_{570} > VC3$

#### **4.1 Determinación de susceptibilidad a los antimicrobianos. Método de Kirby-Bauer.**

Se tomaron 4 - 5 colonias de un cultivo puro de 24 hrs de cada cepa de HiNT a partir de gelosa chocolate (cultivo), éstas se depositaron en tubos estériles con 3.5 mL de

solución salina al 0.45%, se agitaron en vortex para suspender totalmente las colonias, ajustando la turbidez a 1 del nefelómetro de McFarland para cada tubo. Una vez ajustada la turbidez, se impregnó un hisopo de algodón no tóxico y estéril en la suspensión bacteriana a ensayar, se rotó varias veces ejerciendo una presión firme sobre las paredes internas del tubo para quitar el exceso de líquido. Enseguida el inóculo se depositó sobre la superficie seca de una placa de gelosa HTM suplementado con NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) y Hemina, extendiéndolo uniformemente sobre toda la superficie con ayuda del mismo hisopo, se dejó secar el inóculo entre 3 y 5 minutos antes de que se colocaran los discos con los antibióticos de prueba con ayuda de una pinza presionando con suavidad los discos sobre el agar para permitir un contacto uniforme. Los discos se distribuyeron de modo tal que estuvieran separados por no menos de 4 cm entre uno y otro. Las placas inoculadas se incubaron durante 18 - 24 hrs a 35°C en atmósfera 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se midió con Vernier, el diámetro de inhibición para cada antimicrobiano para clasificarlo como susceptible, intermedio o resistente de acuerdo a los valores que se indican en el Cuadro 6

**Cuadro 6 Valores de interpretación estándar diámetro (mm) CLSI\***

Antibióticos:	Contenido Disk	S**	I**	R**
<b>Ampicilina (AM)</b>	10/10µg	≥20	-	≤19
<b>Amoxicilina (AMC)</b>	20/10µg	≥20	-	≤19
<b>Ciprofloxacina (CIP)</b>	5 µg	≥21	-	-
<b>Ceftriaxona (CRO)</b>	30 µg	≥26	-	-
<b>Claritromicina (CLR)</b>	15 µg	≥13	11-12	≤10
<b>Gatifloxacina (GAT);</b>	5 µg	≥18	-	-
<b>Levofloxacina (LUX)</b>	5 µg	≥17	-	-
<b>Ofloxacina (OFX)</b>	5 µg	≥16	-	-
<b>Trimetoprim/Sulfametazol (STX)</b>	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤10

\*CLSI (2010) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement. CLSI document M100-S20. Pennsylvania, USA. Clinical and Laboratory Standards Institute.

\*\*Sensible (S) , Intermedio (I), Resistente (R)

## 5. RESULTADOS

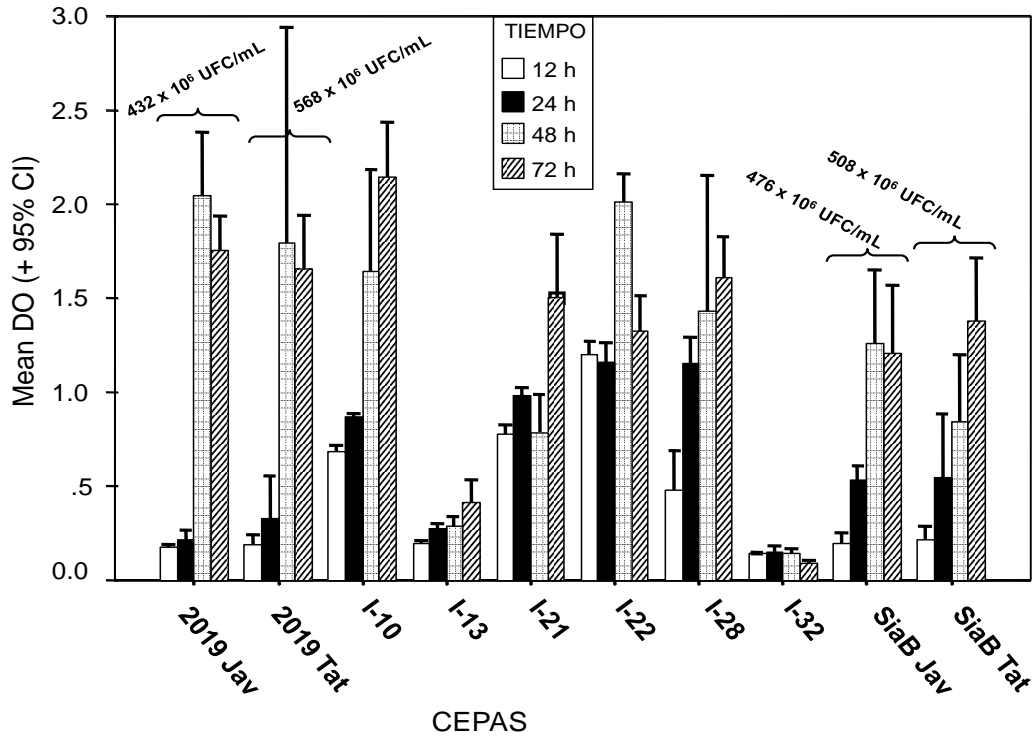
### 5.1 Caracterización fenotípica y genotípica

Todas las cepas incluidas en el estudio, evidenciaron ser HiNT mediante la prueba de tamizaje de SAP, con los sueros mono y polivalentes, obteniendo resultados negativos en estos ensayos. En adición los datos de PCR confirmaron la ausencia del gen *bex A* y de los *loci* cápsula-específicos, por ende nos confirmo la identidad fenotípica de cepas de HiNT.

Adicionalmente, se obtuvo amplificación positiva de los fragmentos de las secuencias específicas del rDNA 16S y del gen OMP 6 de *H. influenzae* en todas las cepas analizadas, confirmando a nivel de especie.

### 5.2 Capacidad de formación de biopelículas

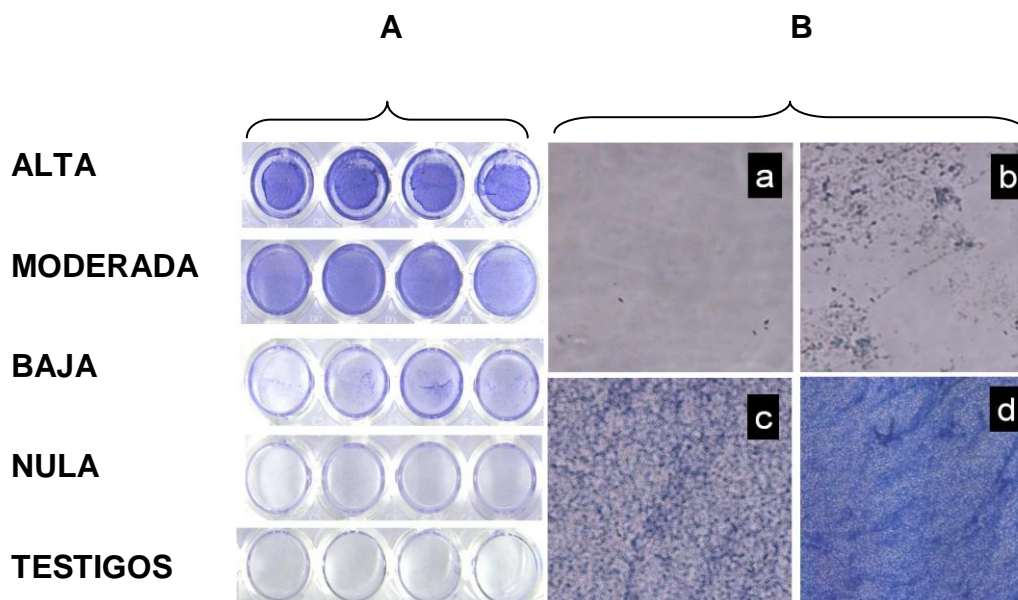
Se optimizó el modelo *in vitro* para la determinación de biopelículas a partir de la metodología propuesta por Murphy y Kirkham 2002, empleando un formato de microplaca de 48 pozos. Además de realizar ensayos a diferentes tiempos con el fin de establecer el tiempo idóneo en el que las cepas de HiNT presentaran reproducibilidad de los datos de ensayos de formación de bifilm. Permittiéndonos determinar 48hrs como el tiempo idóneo para la toma de lecturas de DO. Con esta información sobre la estandarización de la metodología, se procedió a la realización de los ensayos posteriores (Figura 3)



**Figura 3. Determinación de formación de biopelícula en función del tiempo de incubación.**

Se muestran los valores promedio de 4 replicas. Se observan valores de DO bajos hasta las 24 hrs que no permiten discriminar adecuadamente la capacidad de formación de biopelícula. A partir de las 48 hrs, la DO mostró un incremento sustancial que permitió discriminar a las cepas con capacidad para formar biopelícula de aquellas que no lo forman.

Mediante estos ensayos, nos fue posible discriminar entre las cuatro categorías de capacidad de el formación de biopelícula de las cepas del estudio, tanto a nivel macroscópico como microscópico (Figura 4).

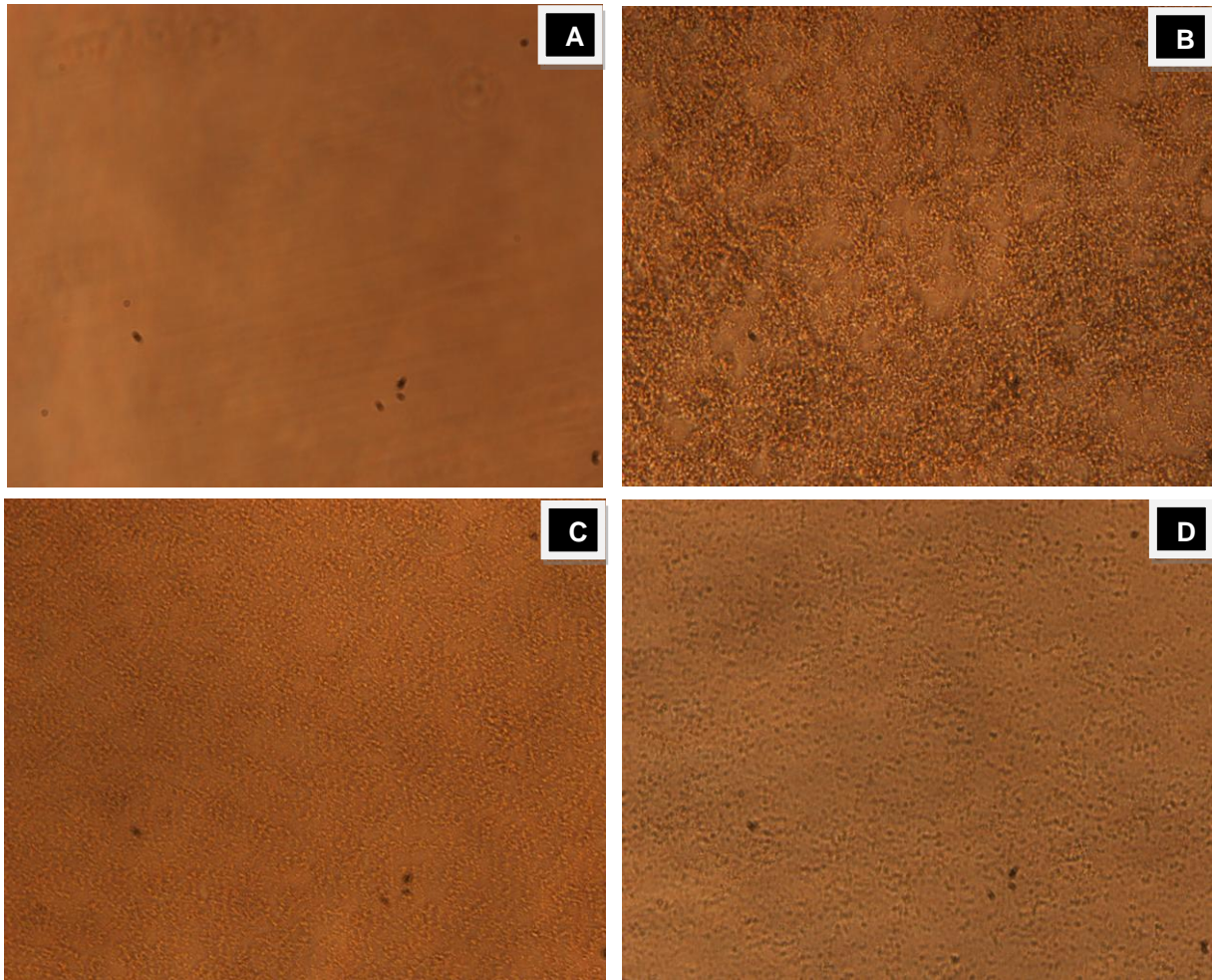


**Figura 4. Aspectos morfológicos de biopelículas formados por HiNT *in vitro***

(A) A las 48 hrs se observa la presencia de material adherente en el fondo de los micropozos, en diferentes magnitudes, reflejando la variabilidad en la capacidad de formación de biopelículas. (B) A nivel microscópico (100X), se observan estructuras reticulares con diferentes grados de compactación correspondientes a las categorías nula (a), baja (b), moderada (c) y alta (d).

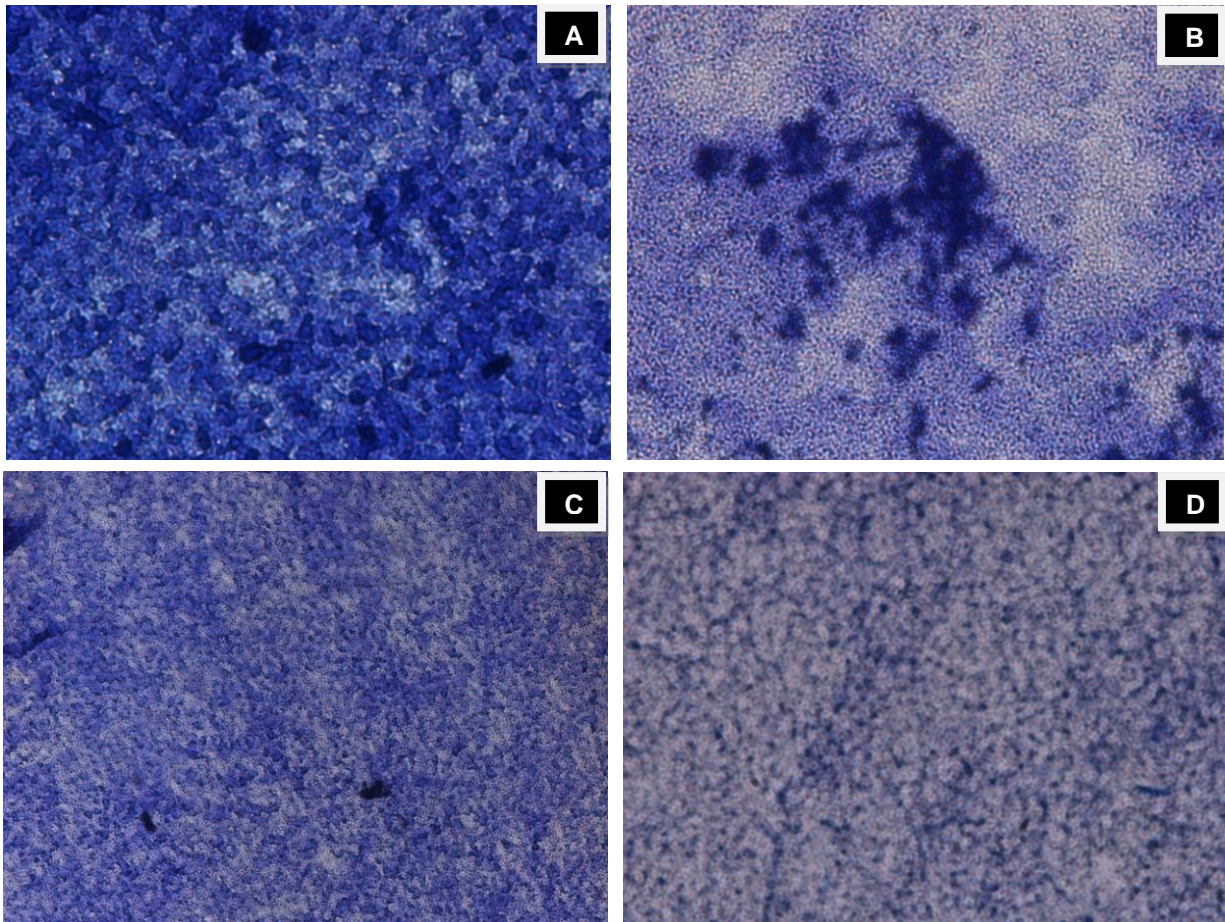
Los biopelículas mostraron apariencia microscópica de redes homogéneas, las cuales se extendieron sobre toda la superficie de los pozos, cuyas diferencias entre sí variaron de acuerdo con el grado de compactación de dichas redes, es decir en la densidad por unidad de área, de acuerdo con las cuatro categorías de formación de biopelícula según las lecturas de DO. La observación detallada al microscopio permitió notar la existencia de diferentes disposiciones estructurales de las redes que

presentan las cepas de HiNT, por ejemplo, alternancia de zonas con redes compactas y zonas con redes laxas Figuras 5 y 6.



**Figura 5. Fotografías de los micropozos según observación al microscopio.** Cultivo justo antes de tinción con Cristal Violeta. (A) Pozo testigo: ningún crecimiento bacteriano (B) Observación de estructuras reticulares con diferentes grados de compactación. (C) y (D) Se observan estructuras reticulares con diferentes grados de compactación a nivel microscópico (100X).

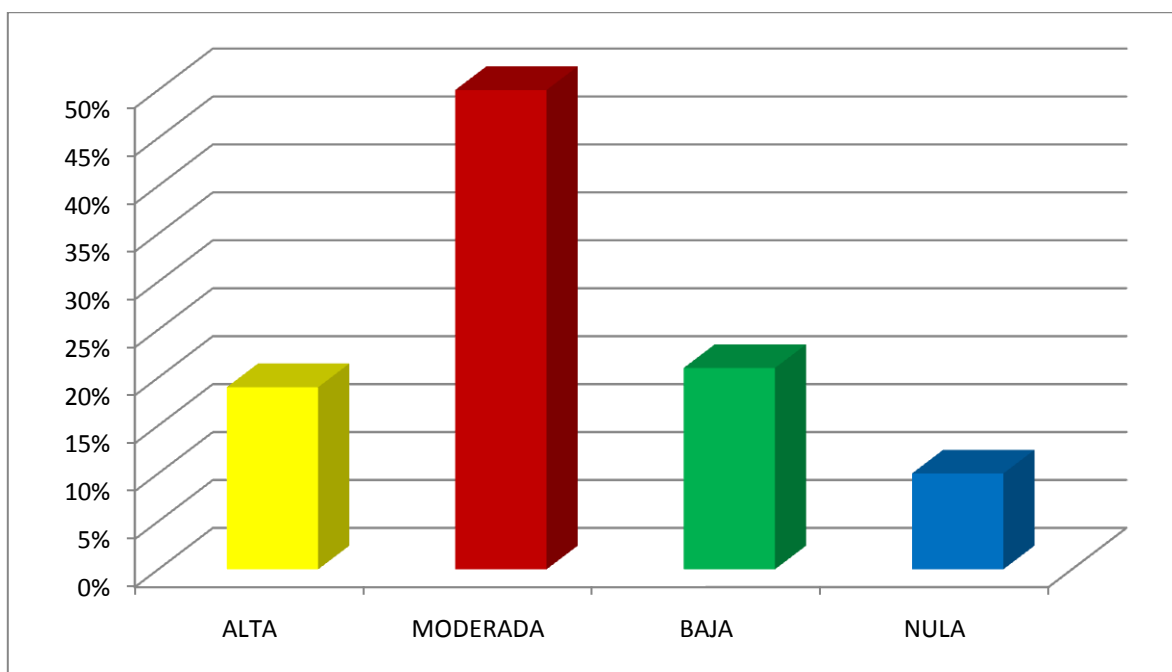




**Figura 6. Aspectos morfológicos de biopelículas *in vitro* en tinción (CV al 1%)**

Fotografías de los micropozos según observación al microscopio. Inmediatamente después de lavarse y teñirse con CV al 1%. A, B, C, D Estructura y compactación de material adherente con diferente compactación (100X).

En cuanto a capacidad de formación de biopelícula, se observó una distribución heterogénea entre las cepas de HiNT de casos de EPOC. No obstante, el 68% de las cepas mostró capacidad de formación de biofilm moderada o alta, mientras que solo 4 cepas (10%) fueron incapaces de formar biopelículas (Figura 7).

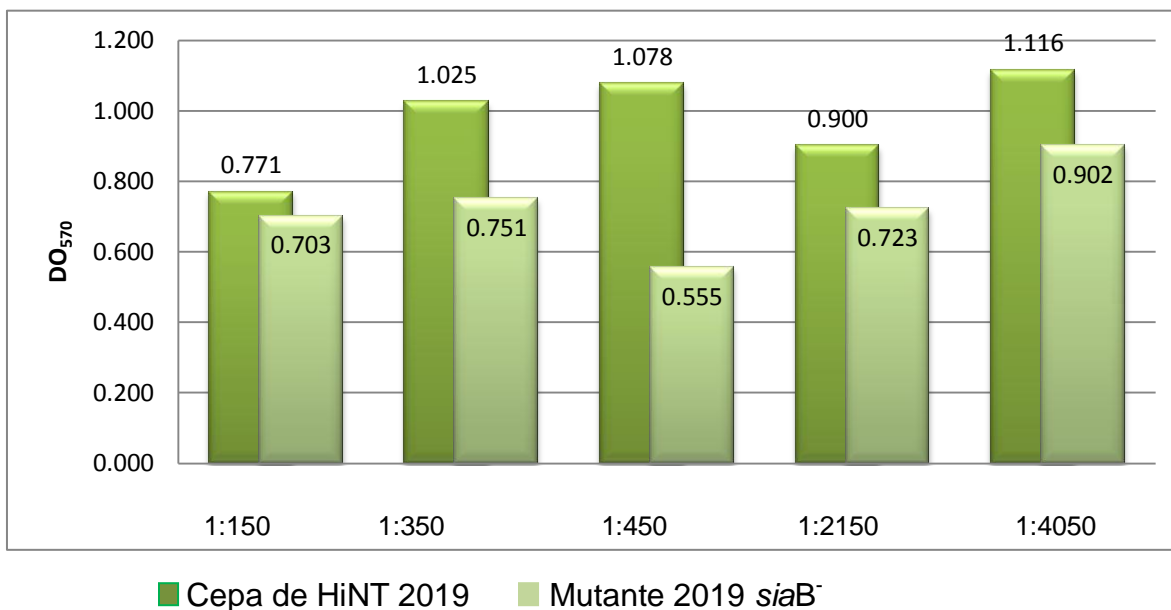


**Figura 7. Categorización de la capacidad de producción de biopelícula en cepas de HiNT**

Los valores de corte para cada categoría, según las lecturas de densidad óptica (DO), fueron:

- ◆ Nula formación de biopelícula:  $DO_{570} \leq 0.431$
- ◆ Baja formación de biopelícula:  $0.431 < DO_{570} \leq 0.831$
- ◆ Moderada formación de biopelícula:  $0.831 < DO_{570} \leq 1.761$
- ◆ Alta formación de biopelícula:  $DO_{570} > 1.761$

Los valores de DO obtenidos de las cepas control HiNT 2019 y su mutante isogénica 2019 *siaB* se ubicaron en la categoría correspondiente a formación moderada de biopelícula. En ensayos con diferentes cargas bacterianas (diluciones), la cepa mutante 2019 *siaB*<sup>-</sup> mostró un valor promedio de DO de 0.723 y la cepa HiNT 2019 un valor promedio de DO de 0.900. (Figura 8)



**Figura 8 Capacidad de formación de biopelícula entre las cepas HiNT 2019 y su mutante isogenica 2019 *siaB*<sup>-</sup> a diferentes diluciones**

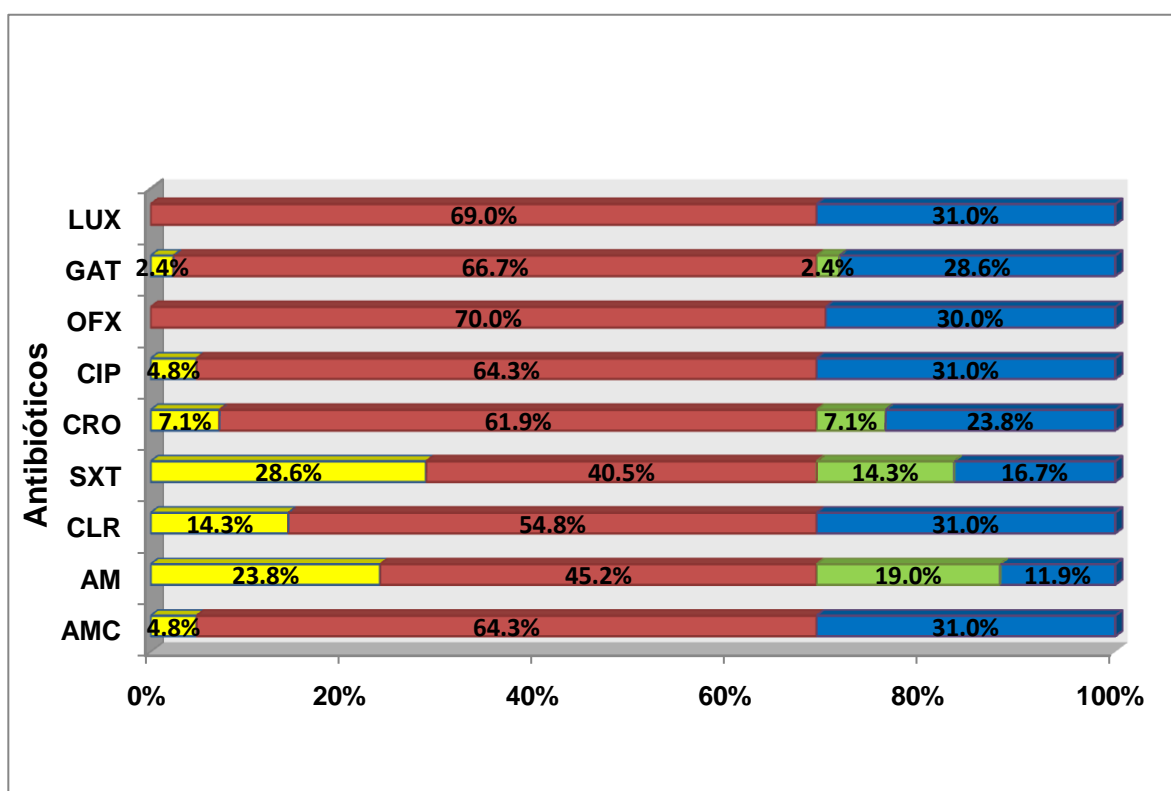
La comparación de los promedios de lecturas de DO entre las cepas HiNT 2019 y *siaB*<sup>-</sup>, a diferentes diluciones nos deja ver, que a pesar de que estas se ubicaron en la categoría de capacidad moderada de formación de biopelícula, si existe una diferencia con respecto a la capacidad de formación de biopelícula entre estas.

### 5.3 Susceptibilidad a los antimicrobianos

De los agentes antimicrobianos que se probaron contra las cepas de este estudio, los  $\beta$ -lactámicos y las quinolonas mostraron mayor actividad antimicrobiana (Figura 5). El 57.1% de las cepas presentaron sensibilidad a todos los antibióticos. Se observaron proporciones similares de resistencia y sensibilidad antimicrobiana (43% vs 57%) para sulfametoxazol.

Las cepas de HiNT pertenecientes a la categoría de capacidad de formación de biopelícula alta-moderada presentan con alto porcentaje de susceptibilidad (69.4%) a

todos los antibióticos probados (Figura 9). La evaluación de los perfiles de susceptibilidad de las 29 cepas de HiNT que conformaron la categoría de capacidad de formación de biopelícula alta-moderada, reveló que 13 cepas de HiNT (44.82%), mostraron sensibilidad antimicrobiana a todos los antibióticos probados. La prueba de  $\chi^2$  no mostró diferencias significativas entre resistencia y producción de biopelícula.



**Figura 9. Frecuencias de sensibilidad / resistencia a los antimicrobianos en relación con la capacidad de formación de biopelícula**

Antibióticos: Levofloxacina (LUX); Gatifloxacina (GAT); Ofloxacina (OFX); Ciprofloxacina (CIP); Ceftriaxona (CRO); Trimetoprim/Sulfametazol (STX); Claritromicina (CLR); Ampicilina (AM); Amoxicilina (AMC)

- ◆ Formación Alta-Moderada con perfil resistente
- ◆ Formación Alta-Moderada con perfil sensible
- ◆ Formación Baja-Nula con perfil resistente
- ◆ Formación Baja-Nula con perfil sensible

Siete (87.5%) de las ocho cepas pertenecientes a la categoría de capacidad de formación de biopelícula alta, mostraron susceptibilidad a los 9 antibióticos probados. En contraste, las cepas pertenecientes a las categorías de formación de biopelícula moderada y baja mostraron frecuencias de susceptibilidad de entre el 20% y el 22%, respectivamente. De las cepas pertenecientes a la categoría de formación de biopelícula nula, el 25% fue susceptible a los antimicrobianos de prueba. (Cuadro 6)

**Cuadro 7. Relación entre el perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana y la capacidad de formación de Biopelícula**

Perfil de Susceptibilidad	No. de cepas (%)	Formación de Biopelícula		Valor de P
		A/M No.	B/N No.	
RESISTENCIA <sup>a</sup>	26 (61.9)	16	10	NS*
4 o más antib.	2 ( 4.8)	2	-	NS*
3 antib.	5 (11.9)	4	1	NS*
2 antib.	11 (26.2)	5	6	NS*
1 antib.	8 (19.0)	5	3	NS*
SENSIBILIDAD <sup>b</sup>	16 (38.1)	13	3	

A/M, Alta-moderada; B/N, Baja-nula.

<sup>a</sup> Al menos a uno de los antibióticos probados.

<sup>b</sup> A todos los antibióticos probados.

\*  $P > 0.05$ , contrastado contra el grupo de cepas sensibles.

## 6. DISCUSION

Además de ser bacterias comensales del conducto nasofaríngeo de humanos, en las últimas dos décadas se ha acumulado evidencia suficiente de que las cepas no tipificables de *Haemophilus influenzae* muestran capacidad patogénica en infecciones agudas y crónicas [Swords *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2005; Buchinsky *et al.*, 2007; Erwin *et al.*, 2007]. Actualmente HiNT, se considera un patógeno importante en los casos de EPOC a nivel mundial [Falla T. *et al.*, 1993; Hong *et al.*, 2007a; Hong. *et al.*, 2007b; Salcedo y Cid., 2011].

En este estudio se trabajó con un grupo de cepas de *H. influenzae* aisladas de casos de EPOC y, mediante la caracterización fenotípica y genotípica a nivel capsular, se verificó que fueron no capsuladas o no tipificables, lo cual apoya la noción de que HiNT juega un papel importante como causa de esta enfermedad. En adición, se ha descrito que del 40% al 60% de los episodios de exacerbaciones en casos de EPOC, se relacionan con infecciones bacterianas [Butorac-Petanjek *et al.*, 2010] y que HiNT suele estar presente, a pesar de que la detección mediante cultivo de esputo resulte negativa y de que haya presencia de anticuerpos específicos contra el patógeno [Murphy *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2009; Salcedo y Cid., 2011].

Las biopelículas formados por diversas bacterias patógenas en modelos animales, confieren mayor resistencia contra las defensas del huésped y/ó contra la terapia antimicrobiana, cuya repercusión es la persistencia bacteriana [Lewis *et al.*, 2001; Fux *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2007b]. El modelo de formación de biopelículas usado en este trabajo se fundamentó en la capacidad que muestran las cepas de HiNT para adherirse al poliestireno en microplacas de cultivo, tal como se ha descrito anteriormente [Stepanovic *et al.*, 2000; Murphy y Kirkham., 2002; Swords *et al.*, 2004]. Nuestros resultados fueron reproducibles y

confiables debido a que se evitó el uso de fijadores y se hicieron lavados que fácilmente removieron el material sedimentado y/o débilmente adherido, tal como lo describe Sandal et al., 2007. Es importante notar que, a diferencia de los ensayos realizados por Murphy y Kirkham, 2002; Swords et al, 2004; y Stepanovic et al, 2000, en este estudio la incubación se llevó a cabo durante 48 h. La razón de lo anterior se debió a que empleamos placas con mayor capacidad de volumen por pozo y a que este lapso fue el de máxima respuesta según la cinética de formación de biopelículas, lo cual concuerda con el ensayo de Sandal et al., 2007, para *H. somni*, un miembro de la familia *Pasteurellaceae*.

Según nuestro modelo, alrededor del 90% de las cepas de HiNT analizadas mostraron capacidad para formar biopelículas, aunque en magnitudes variables, siendo los fenotipos productores alto y moderado los más frecuentes. Lo anterior concuerda con las frecuencias observadas por otros autores [Murphy et al 1999; Murphy y Kirkham., 2002; Swords et al 2004]. Un ejemplo de ello, son los estudios realizados por Swords et al 2004, donde mediante ensayos de formación de biopelículas en microplacas de 96 pozos, observó diferencias significativas (según su intervalo de lecturas de DO<sub>540</sub>) entre las cepas de HiNT aisladas de casos de otitis media y las de bronquitis. Murphy y Kirkham, 2002, encontraron gran capacidad diferencial de formación de biopelículas entre cepas de HiNT de casos de otitis media y de EPOC.

La inclusión de las cepas testigo de HiNT 2019 y su mutante isogénica 2019 *siaB*<sup>-</sup>, [Swords et al., 2003], permitió contar con datos de referencia previamente publicados, lo que le da mayor validez a este estudio. En congruencia con los datos publicados por Swords (2004), la capacidad de formación de biopelículas entre ambas cepas de referencia es diferente. No obstante en nuestro estudio ambas cepas se ubicaron en

la categoría de formación moderada de biopelícula, esto puede atribuirse a que nosotros empleamos un método de cultivo estático, mientras que Swords *et al*, 2004, emplearon método de cultivo en flujo continuo [Stepanovic *et al*, 2000; Murphy y Kirkham., 2002; Swords *et al*, 2004; Faleiro-Naves, 2010; Fux *et al*, 2005b].

Actualmente se sugiere que los pili tipo IV; las adhesinas Hap, HMW1 y HMW2, y los lipopolisacáridos (LPS) de HiNT juegan un papel clave en la formación del biopelícula *in vivo* [Murphy y Kirkham., 2002; Swords *et al*, 2004; Fux, *et al*, 2005a]. Se ha relacionado la presencia de residuos de fosforilcolina (PCho) en los LPS superficiales con el fenotipo invasivo de las cepas HiNT. Esta característica también se ha relacionado con la formación de biopelícula y la resistencia a la remoción de las bacterias en un modelo animal [Marti-Literas *et al*, 2009]. Lo anterior refuerza el papel de los biopelículas en la colonización del epitelio respiratorio y en la patogenicidad de HiNT [Murphy y Kirkham., 2002; Pang *et al*, 2008; Hong *et al*, 2007b., Marti Literas *et al*, 2009].

Otros autores señalan que la supervivencia intracelular de HiNT en las células epiteliales infectadas *in vitro*, parece ser independiente de la presencia de PCho en los LPS [Salcedo. *et al* 2011; Morey P.*et al* 2011]. Recientemente, Johnson *et al*, 2011, muestran evidencias de que anticuerpos dirigidos contra la proteína D de HiNT, reducen la decoración de los LPS con residuos de PCho en los biopelículas formados *in vitro*. Se puede especular que tales residuos podrían funcionar como “señales” para la agregación bacteriana y la maduración de los biopelículas formados *in vivo*, independientemente de su función en la invasividad [Jhonson *et al* 2011].

Se ha observado por microscopía, que los biopelículas formados *in vitro* por diversas bacterias, muestran un gradiente decreciente de susceptibilidad a los antibióticos (de las capas superficiales hacia las profundas), que correlaciona con la actividad



metabólica diferencial dentro del biopelícula. Esto es, a las células embebidas en las capas profundas del biopelícula les llegan cantidades mínimas del antibiótico, que en concierto con la reducida actividad metabólica, induce tolerancia [Fux et al, 2005a].

Se sabe además que algunas bacterias patógenas exhiben plasticidad genética en respuesta a los cambios ambientales, que aunado a índices altos de transferencia horizontal de genes dentro de los biopelículas, resultan en una gran variabilidad genética (y por ende, fenotípica) intraespecie [Fux et al., 2005b]. En este contexto, la variabilidad genotípica y fenotípica de las cepas de HiNT ha sido ampliamente documentada [Gómez de León et al., 2000; Erwin et al., 2005; Buchinsky et al., 2007].

No obstante que no se encontró asociación directa entre la capacidad productora de biopelícula y el perfil de resistencia antimicrobiano probado, no podemos decir que no existe como tal dicha asociación; esto debido a que se ha descrito que los pacientes con EPOC tratados con los antibióticos de eficacia probada *in vitro*, frecuentemente presentan pobre eficacia clínica [Pang et al., 2008; Kaji et al., 2008; Fuch., 2001; Martí-Llitas et al., 2009; Butorac-Petanjek et al., 2010].

En el caso de los biopelículas maduros, éstos muestran una estructura tridimensional compleja que involucra diversos microambientes que difieren en términos de osmolaridad, aporte de nutrientes y densidad celular [Fux et al., 2005a]. Haciendo una extrapolación con los biopelículas formados *in vivo*, particularmente en infecciones crónicas como la EPOC, la presencia de tales microambientes podría explicar la dificultad para erradicar a los patógenos mediante el uso de antimicrobianos. Por ello, se debe considerar que dentro de los biopelículas existe una gran heterogeneidad fenotípica, que pudiera no correlacionar con el perfil de susceptibilidad a los antibióticos

determinado convencionalmente en el laboratorio, de manera que se sugiere que se determinen los perfiles de susceptibilidad directamente en los biopelículas formados *in vitro*. Esto refuerza la idea de que no existe un “fenotipo formador de biopelícula” único dentro de una biopelícula formada por una sola especie [Fux et al., 2005a].

Por otra parte, desde un punto de vista evolutivo y microbiológico, las cepas incapaces de formar biopelículas podrían haber desarrollado una ventaja adaptativa con la resistencia a los antibióticos como defensa contra la terapia antimicrobiana. En contraste, cabe suponer que las cepas con capacidad de formación de biopelículas pudieran protegerse mediante la formación de una matriz polimérica, independientemente del perfil de susceptibilidad. En este sentido, nuestros resultados apuntan hacia una mayor frecuencia de cepas HiNT con capacidad moderada-alta para formar biopelículas que exhiben sensibilidad a los antimicrobianos. Si bien se conocen los determinantes de virulencia de este patógeno oportunista; la evidencia existente apunta que la formación de biopelículas, tiene implicaciones en la cronicidad y la severidad de la enfermedad. La participación de la biopelícula en la patogenicidad empieza a reconocerse

La variabilidad en la capacidad de formación de biopelículas de HiNT observada aquí, es congruente con las explicaciones sobre su variabilidad:

- HiNT usualmente coloniza durante períodos prolongados a su hospedero en el estado de portador. Aunque Fusté [Fusté et al., 1995] sugiere pocas probabilidades de recombinación, es concebible que el microorganismo tenga oportunidades de intercambiar su material por ser naturalmente competente para transformación y así acumular mutaciones.

- En infecciones persistentes como BC y EPOC, es poco probable que las capas gruesas del epitelio mucoso del tracto respiratorio de humanos constituyan un medio nutricional adecuado para el crecimiento de *H. influenzae*. Así, bajo tales condiciones, durante su replicación se incrementan las tasas de error inducidas por la taq DNA polimerasa, como se ha observado en poblaciones de *E. coli* bajo limitación nutricional [Selander *et al.*, 1995].

En México el 7.8 % de la población mayor de 40 años padece EPOC. El Sector Salud la coloca como una carga económica para las instituciones responsables. Ésta es la sexta causa de muerte en nuestro país, por su severidad y por ser una enfermedad poco conocida y mal diagnosticada [Menezes *et al* 2005; Fromer y Cooper C., 2008]. La decisión de administrar antibióticos en EPOC es multifactorial, la gravedad del estadio y el estado funcional del paciente son parámetros que se toman para el uso de estos [Eldika y Sethi, 2006; Fromer y Cooper., 2008; Miravittles *et al* 2010]. . El abismo entre la información existente sobre la causas y el tratamiento de la EPOC, remarca la importancia de estudios clínicos/experimentales que contribuyan al desarrollo de tratamientos que sean eficaces para estos pacientes [Fromer y Cooper 2008; Miravittles *et al.*, 2010; Blasi *et al.*, 2010 Salcedo *et al.*, 2011]. Por ello es deseable la actualización sistemática de la información clínico-epidemiológica sobre las bacterias locales y regionales que se presentan en pacientes con EPOC, así como sobre sus perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. Se sugiere que el análisis integral de los datos sobre susceptibilidad antimicrobiana y sobre la capacidad de formación de biopelículas por cepas de HiNT, se emplee para la selección del tratamiento antimicrobiano en pacientes con EPOC. Esta información puede ser utilizada para proponer y/o establecer guías terapéuticas con antimicrobianos según la situación epidemiológica actual en México.

## 7. CONCLUSIONES

- ✚ Los resultados generados en las pruebas de PCR y SAP para las 42 cepas de *Haemophilus influenzae*, confirmaron el fenotipo NT.
- ✚ La metodología empleada fue la adecuada para cubrir las respuestas a los objetivos planteados en esta Tesis. Las variantes metodológicas integradas aquí, se sugieren para uso convencional ya que se obtienen coloraciones adecuadas para las lecturas de DO. Además da lugar a un método simple, seguro y económico.
- ✚ Se evidenció frecuencia elevada de producción de biopelículas (68%) entre las 42 cepas de HiNT.
- ✚ Se observó distribución heterogénea de la magnitud de los biopelículas formados por las cepas de HiNT, predominando el fenotipo formador de biopelícula Alto-Moderado.
- ✚ En este estudio no se encontró ninguna correlación directa entre la capacidad de formación de biopelículas y el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos.
- ✚ Se observó perfil de sensibilidad a los 9 antimicrobianos probados en 57.1% de las cepas HiNT de este estudio.
- ✚ Se observó mayor frecuencia (76%) de cepas de HiNT con capacidad baja-nula para formación de biopelículas entre las cepas que mostraron perfiles de resistencia a uno o más antibióticos.

**8 BIBLIOGRAFÍA**

1. AGUSTÍ A. G., NOGUERA A., SAULEDA J., SALA E., PONS J., BUSQUETS X. 2003. Sistemic efeccts of chronic obstructive pulmonary disease. Eur. Respir. J. 21(2): 347-360.  
**[Agusti et al., 2003]**
2. ALBRITTON W. L., PENNER S., SLANEY L., BRUNTON J. 1978. Biochemical characteristics of *Haemophilus influenzae* in relationship to source of isolation an antibiotic resistance. J. Clin. Microbiol. (6): 519-523.  
**[Albritton et al., 1978]**
3. ATS Statement Standards for the diagnosis and care of patients with COPD. 1995. Am J Respir Crit Care Med; 152:S77-S120  
**[ATS., 1995]**
4. BARENKAMP S.J., ST GEME J.W.III. 1994. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. Infect Immun.62(8):3320-3328.  
**[Barenkamp y St Geme III 1994]**
5. BARRIGA A. G., ARUMIR E. C., MERCADO G.N.F. 2008. Actualidades en la susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos causales de infecciones respiratorias en pacientes ambulatorios Rev. Mex. Patol. Clin.55(1): 29-36.  
**[Barriaga et al 2008]**
6. BLASI F., CONCIA E., MAZZEI T., MORETTI A. M., NICOLETTI G., NOVELLI A., TEMPERA G., GIARIR F. 2010. Role of the oral Beta-lactams in the treatment of exacerbations of chronic bronchitis: critical analysis and therapeutics recommendations. J. Chemother. 22(Suppl 1): 3-4.  
**[Blasi et al., 2010]**
7. BOOM R., SOL C.J., SALIMANS M.M., JANSEN C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN P.M., NOORDAA J.1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol.28(3):495-503.  
**[Boom et al 1990]**
8. BUCHINSKY F.J., FORBES M.L., HAYES J.D., SHEN K., EZZO S., COMPLIMENT J., HOGG J., HILLER N.L., HU F.Z, POST J.C., EHRLICH G.D. 2007. Virulence phenotypes of low-passage clinical isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* assessed using the chinchilla laniger model of otitis media. BMC Microbiol. Jun 14;57:56.  
**[Buchinsky., 2007]**
9. BUTORAC-PETANJEK B., PARNHAM M. J., POPOVIC-GRLE S. 2010. Antibiotic therapy for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). J. Chemother. 2(5): 291-297.  
**[Butorac-Petanjek B. et al., 2010]**
10. CAMPAGNARI A.A., GUPTA M.R., DUDAS K.C., MURPHY T.F., APICELLA M.A., 1987. Antigenic diversity of lipooligosaccharides of nontypable *Haemophilus influenzae*. Infect Immun.55(4):882-887.  
**[ Campagnari et al 1987]**
11. CANTÓN R., GIRÓN R., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L., OLIVER A., SOLÉ A., VALDEZATE S., MÁIZ L. 2002. Patógenos multirresistentes en la fibrosis quística. Arch. Bronconeumol. 38(8): 376-385.  
**[Cantón et al., 2002]**
12. CARRILLO R. G. 2007. Tabaquismo y enfermedad pulmonar Neumología y cirugía del Torax. 66(3):105-106  
**[Carrillo., 2007]**

13. CDC. In: Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. 9th, ed. 2006:111-123
14. CERCA N., JEFFERSON K. K., OLIVEIRA R., PIER G. B., AZEREDO J. 2006. Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state., *Infect. Immun.* 74(8): 4849–4855.  
**[Cerca et al., 2006]**
15. CLSI. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement. CLSI document M100-S20. Pennsylvania, USA. Clinical and Laboratory Standards Institute.  
**[CLSI, 2010]**
16. DRAGO L. 2009. Batteri e biofilm nelle infezioni respiratorie. Bacteria and biofilm in respiratory tract infections. *Infez. Med.* 17( Suppl 2): 3-9.  
**[Drago L., 2009]**
17. ELDIKA N., SETHI S. 2006. Role of nontypeable *Haemophilus influenzae* in exacerbations and progression of chronic obstructive pulmonary disease., *Curr. Opin. Pulm. Med.* 12(2): 118-124.  
**[Eldika y Sethi, 2002]**
18. ERS European Respiratory Society Rehabilitation and Chronic. Care Scientific Group. 1991. Pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with recommendations for its use. *Eur. Respir. Rev.* 1991; 6:(1)–568.  
**[ERS ., 1991]**
19. ERWIN A. L., SMITH A. L. 2007. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol.* 15(8): 355-362.  
**[Erwin and Smith, 2007]**
20. ERWIN A.L., NELSON K.L., MHLANGA-MUTANGADURA T., BONTHUIS P.J., GEELHOOD J.L., MORLIN G., UNRATH W.C., CAMPOS J., CROOK D.W., FARLEY M.M., HENDERSON F.W., JACOBS R.F., MÜHLEMANN K., SATOLA S.W., VAN ALPHEN L., GOLOMB M., SMITH A.L. 2005. Characterization of genetic and phenotypic diversity of invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* 73(9):5853-5863.  
**[ Erwin et al., 2005]**
21. ESCALANTE C. R.C., PEREZ- GUZMAN C., GARCÍA P.R.S., GILES M. R., VEGA H. J. 2008. Importancia de la nutrición en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *REV Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 21(2):142-148  
**[Escalante et al 2008]**
22. EVANS D. J., ALLISON D. G., BROWN M. R., GILBERT P. 1991. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate., *J. Antimicrob. Chemother.* 27(2): 177-184.  
**[Evans et al., 1991]**
23. FABBRI L.M., HURD S.S., GOLD Scientific Committee. 2003. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD: 2003 update. *Eur. Respir. J.* 22:1–2  
**[Fabbri et al 2003]**
24. FALEIRO-NAVES P. L. 2010. Formación de biopelículas por “*Escherichia coli*” y su correlación con factores de virulencia. Prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.  
**[Faleiro-Naves, 2010]**
25. FALLA T. J., CROOK D. W., BROPHY L. N., MASKELL D., KROLL J. S., MOXON E. R. 1994. PCR for capsular

- typing of *Haemophilus influenzae*., J. Clin. Microbiol. 32(10): 2382-2386.  
**[Falla et al., 1994]**
26. FALLA T. J., DOBSON S. R., CROOK D. W., KRAAK W. A., NICHOLS W. W., ANDERSON E. C., JORDENS J. Z., SLACK M. P., MAYON-WHITE D., MOXON E. R. 1993. Population-based study of non-typable *Haemophilus influenzae* invasive disease in children and neonates. Lancet. 341(8849): 851-854  
**[Falla et al., 1993]**
27. FINK D. L., GREEN B. A., ST GEME J. W. 3rd. 2002. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. Infect. Immun. 70(9): 4902-4907.  
**[Fink et al., 2002]**
28. FINK D. L., BUSCHER A. Z., GREEN B., FERNSTEN P., ST GEME J. W. 3rd. 2003. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. Cell. Microbiol. 5(3): 175-186.  
**[Fink et al., 2003]**
29. FROMER L., COOPER C. B. 2008. Review of the GOLD guidelines for the diagnosis and treatment of patients with COPD. Int. J. Clin. Pract. 62(8): 1219-1236.  
**[Fromer and Cooper, 2008]**
30. FUCHS P.C., BARRY A.L., BROWN S.P. 2001. Influence of variations in test methods on susceptibility of *Haemophilus influenzae* to ampicillin, azithromycin, clarithromycin, and telithromycin. Jour Clin Microbiol. 39 (1): 43  
**[Fuchs et al 2001]**
31. FUSTÉ M. C., PINEDA M. A., PALOMAR J., VIÑAS M., LORÉN J. G. 1996. Clonality of multidrug-resistant nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*. J. Clin Microbiol, 34(11): 2760-2765.  
**[Fustè et al 1996]**
32. FUX C. A., COSTERTON J. W., STEWART P. S., STOODLEY P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms, Trends Microbiol. 13(1): 34-40.  
**[Fux et al., 2005a]**
33. FUX C. A., SHIRTLIFF M., STOODLEY P., COSTERTON J. W. 2005. Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis?. Trends Microbiol. 13(2): 58-63.  
**[Fux et al., 2005b]**
34. FUX C. A., STOODLEY P., HALL-STOODLEY L., COSTERTON J. W. 2003. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 1(4): 667-683.  
**[Fux et al., 2003]**
35. GARCÍA P. J., HERNANDEZ Z. R., SANCHEZ R.C. QUIÑONEZ F. F., PADUA G.X., DÍAZ O. F. RAMÍREZ V. A. 2008 Exacerbación infecciosa de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica Neumología y Cirugía del Torax. 67(3):104-116  
**[García et al 2008]**
36. GARCÍA-GUILLEN M. L. 2006 Setenta y un años de historia de la EPOC en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (1935-2006) Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 19(4):316-320  
**[García-Guillen., 2006]**
37. GARCÍA-RAMOS E., VIVEROS-TERRAZAS M. G., GONZÁLEZ-ELIZALDE H., GARCÍA J. J. 1998. Caracterización y

- resistencia de las cepas de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* aisladas de la nasofaringe de portadores. Rev. Inst. Nac. Enfermedades Respir. 11(1):17-24.  
**[García-Ramos et al., 1998]**
38. GILSDORF J. R., MARRS C. F., FOXMAN B. 2004. *Haemophilus influenzae*: genetic variability and natural selection to identify virulence factors. Infect. Immun. 72(5):2457-2461.  
**[Gilsdorf et al., 2004]**
39. GILSDORF J. R., McCREA K. W., MARRS C. F. 1997. Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. Infect. Immun. 65(8):2997-3002.  
**[Gilsdorf et al., 1997]**
40. GILSDORF J. R. 1998. Antigenic diversity and gene polymorphisms in *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. 66(11):5053-5059.  
**[Gilsdorf., 1998]**
41. GOLDMANN D.A., HUSKINS W.C. 1997. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. Clin Infect Dis. 24 Suppl 1:S139-S145.  
**[Goldmann et al 1997]**
42. GOMEZ DE LEÓN P., SANTOS J. I., CABALLERO J., GOMEZ D., ESPINOSA L. E., MORENO I., PIÑERO D., CRAVIOTO A. 2000. Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from Mexican children determined by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR. J. Clin. Microbiol. 38(7):2504-2511. **[Gómez de León et al., 2000]**
43. GOMEZ DE LEON P., DIAZ-GARCIA F. J., VILLASEÑOR-SIERRA A., SEGURA J., CARRANZA M. I., ARREDONDO-GARCIA J. L., SANTOS J. I. 2008. Immunoglobulin G avidities in infants in Mexico after primary immunization with three doses of polyribosylribitol phosphate-tetanus toxoid *Haemophilus influenzae* type b vaccine. Clin. Vaccine Immunol. 15(6): 1024-1027.  
**[Gómez de León et al., 2008]**
44. GÓMEZ DE LEÓN P., MOLINARI J. L., CABRERA R., GÓMEZ-BARRETO D., CRAVIOTO J., CRAVIOTO A. 1995. Serum response to outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b in Mexican children with or without evidence of invasive disease. Immunol. Infect. Dis. 5:238-243.  
**[Gómez de León et al., 1995]**
45. GÓMEZ DE LEÓN-CRUCES P., DÍAZ-GARCÍA J., SANTOS J. I. 2010. Effect of the DTwP *Haemophilus influenzae* b conjugate vaccination in Mexico (1999-2007). Arch. Med. Res. 41(4):281-287.  
**[Gómez de León et al., 2010]**
46. HARKER H. 2007. Fundación Santa Fe de Bogotá., Oficina de Recursos Educativos – FEPAFEM  
<http://www.aibarra.org/Guias/8-7.htm>  
**[Harker et al., 2007]**
47. HERNÁNDEZ-MENDOZA E. A. 2005. Susceptibilidad a antibióticos, serotipos, biotipos y prevalencia de β-lactamasas tipo TEM y ROB en cepas de *H. influenzae* aisladas de niños portadores en la República Mexicana., Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.  
**[Hernández-Mendoza, 2005]**
48. HONG W., MASON K., JURCISEK J., NOVOTNY L., BAKALETZ L. O., SWORDS W. E. 2007. Phosphorylcholine



- decreases early inflammation and promotes the establishment of stable biofilm communities of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP in a chinchilla model of otitis media. *Infect. Immun.* 75(2): 958-965.  
**[Hong et al., 2007a]**
49. HONG W., PANG B., WEST-BARNETTE S., SWORDS W. E. 2007. Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities *in vitro* and *in vivo*. *J. Bacteriol.* 189(22):8300-8307.  
**[Hong et al., 2007b]**
50. JOHNSON R. W., MCGILLIVARY G., DENOËL P., POOLMAN J., BAKALETZ L. O. 2011. Abrogation of nontypeable *Haemophilus influenzae* Protein D función reduces phosphorylcholine decoration, adherence to airway epithelial cells, and fitness in a chinchilla model of otitis media. *Vaccine.* 29(6):1211-1221.  
**[Johnson et al., 2011]**
51. KAJI C., WATANABE K., APICELLA M. A., WATANABE H. 2008. Antimicrobial effect of fluoroquinolones for the eradication of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates within biofilms. *Tohoku J. Exp. Med.* 214(2): 121-128. **[Kaji et al., 2008]**
52. KIBSEY P. C., RENNIE R. P. Y RUSHTON J.E. 1994 Disk diffusion versus broth microdilution susceptibility testing of haemophilus species and *Moraxella catarrhalis* using seven oral antimicrobial agents: application of updated susceptibility guidelines of the National Committee for clinical Laboratory Standards. *J. Clin. Microbiol.* 32:2786-2790  
**[Kibsey et al., 1994]**
53. LaCLAIRE L. L., TONDELLA M. L., BEALL D. S., NOBLE C. A., RAGHUNATHAN P. L., ROSENSTEIN N. E., POPOVIC T. 2003. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination aerotyping and PCR-based capsule typing., *J. Clin. Microbiol.* 41(1): 393-396.  
**[La Claire et al., 2003]**
54. LEWIS K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(4): 999-1007.  
**[Lewis, 2001]**
55. MARTÍ-LLITERAS P., REGUEIRO V., MOREY P., HOOD D. W., SAUS C., SAULEDA J., AGUSTÍ A. G., BENGOCHEA J. A., GARMENDIA J. 2009. Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke.. *Infec. Immun.* 77(10): 4232-4242.  
**[Martí-Lliteras et al., 2009]**
56. MELULENI G. J., GROUT M., EVANS D. J., PIER G. B. 1995. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm *in vitro* are killed by opsonic antibodies to the mucoïd exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J. Immunol.* 155(4): 2029-2238.  
**[Meluleni et al., 1995]**
57. MENEZES A. M., PERÉZ -PADILLA R., JARDIM J. R., MIUÑO A., LÓPEZ M. V., VALDIVIA G., MONTES DE OCA M., TALAMO C., HALLAL P. C., VICTORA C. G., PLATINO TEAM. 2005. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet* 366(9500):1875-1881.  
**[Menezes et al., 2005]**
58. MIRAVITLLES M., LLOR C., MOLINA J., NABERAN K., COTS J. M., ROS F., EVOCA STUDY GROUP. 2010. Antibiotic treatment of exacerbations of COPD in general practice: long-term impact on health-related quality of life. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 5: 11-19.  
**[Miravittles et al., 2010]**

59. MONTES DE OCA M., TÁLAMO C., HALBERT R. J., PEREZ-PADILLA R., VICTORINA L. M., MUIÑO A., JARDIM B. J. R., VALDIVIA G., PERTUZÉ J., MORENO D., MENEZES B. A. M., 2009 Frequency of Self-Reported COPD Exacerbation and Airflow Obstruction in Five Latin American Cities The Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar (PLATINO) Study. *Chest*. 136;71-78  
**[Montes de Oca et al 2009]**
60. MOREY P., CANO V., MARTÍ-LLITERAS P., LÓPEZ-GÓMEZ A., REGUEIRO V., SAUS C., BENGOCHEA J.A., GARMENDIA J. 2011. Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology*.157(1):234-250.  
**[Morey et al., 2011]**
61. MURPHY T. F. 2000. *Haemophilus influenzae* in chronic bronchitis. *Semin. Respir. Infect.* 15(1): 41-51.  
**[Murphy, 2000]**
62. MURPHY T. F., BAKALETZ L. O., SMEESTERS P. R. 2009. Microbial interactions in the respiratory tract. *Pediat. Infect. Dis. J.* 28(10 Suppl):121-126.  
**[Murphy et al., 2009]**
63. MURPHY T. F., KIRKHAM C. 2002. Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol.* 2:7.  
**[Murphy y Kirkham, 2002]**
64. MURPHY T. F., KIRKHAM C., SETHI S., LESSE A. J. 2005. Expression of a peroxiredoxin-glutaredoxin by *Haemophilus influenzae* in biofilms and during human respiratory tract infection, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44(1): 81-89.  
**[Murphy et al., 2005]**
65. MURPHY T. F., SETHI S, KLINGMAN K. L., BRUEGGEMANN A. B., DOERN G. V. 1999. Simultaneous respiratory tract colonization by multiple strains of nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease: implications for antibiotic therapy. *J. Infect. Dis.* 180(2): 404-409.  
**[Murphy et al., 1999]**
66. MURRAY P, ROSENTHAL K, KOBAYASHI G, PFALLER M. 2002. *Microbiología Médica*, Ediciones Elsevier Science, España.4<sup>th</sup>: 312-317  
**[Murray et al., 2002].**
67. NOVOTNY L.A., BAKALETZ L.O. 2003 The fourth surface-exposed region of the outer membrane protein P5-homologous adhesin of nontypable *Haemophilus influenzae* is an immunodominant but nonprotective decoying epitope. *J. Immunol.*171(4):1978-1983.  
**[Novotny et al 2003]**
68. PÁEZ I., PINO P., GASSIOT C., RODRÍGUEZ C. PLACERES A. 2000 Infecciones y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *Acta Médica*.9(1-2):34-38.  
**[Páez et al 2000]**
69. PANG B, HONG W, WEST-BARNETTE SL, KOCK ND, SWORDS WE. 2008. Diminished ICAM-1 expression and impaired pulmonary clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease/emphysema. *Infect. Immun.* 76(11): 4959-4967.  
**[Pang et al., 2008]**

70. PATON R., ARNOLD J., COCKBURN J. Y EMMANUEL F. X. S., 2000 Susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* to claritromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45:529-531  
**[Paton et al., 2000]**
71. PITTMAN M. 1931. Variation and type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. *J. Exp. Med.* 53(4): 471-493.
72. PUIG-BARBERÁ J., DÍEZ-DOMINGO J., VAREA B. A. , CHAVARRI G. S., RODRIGO J.A., HOYOS S.P., VIDAL D.G. 2007. Effectiveness of MF59™-adjuvanted subunit influenza vaccine in preventing hospitalisations for cardiovascular disease, cerebrovascular disease and pneumonia in the elderly. *Vaccine*. 7313-7321.  
**[Puig-Barberá et al., 2007]**
73. ROBERTS J. E., ROSENFELD R. M., ZEISEL S. A. 2004. Otitis media and speech and language: a meta-analysis of prospective studies. *Pediatrics* 113: 238–248.  
**[Roberts et al., 2004]**
74. SALCEDO S.P., CID V.J. 2011. Nontypable *Haemophilus influenzae*: an intracellular phase within epithelial cells might contribute to persistence. *Microbiology*. 157(Pt 1):1-2.  
**[Salcedo y Cid., 2011]**
75. SANDAL I., HONG W., SWORDS W. E., INZANA T. J. 2007. Characterization and comparison of biofilm development by pathogenic and commensal isolates of *Histophilus somni*. *J. Bacteriol.* 189(22):8179-8185.
76. SELANDER R.K., BELTRAN P., SMITH N.H. 1990. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers, *Infect Immun* 58:2262–2275.  
**[Selander., 2011]**
77. SORIANO V., GRANIZO J.J., CORONEL P., GIMENO M., RODENAS E. 2004. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from adult patients with respiratory tract infections in four southern European countries. *Int Jour Antimicrob Agen*. 23(3):295-298.  
**[Soriano et al 2004]**
78. STEPANOVIC S., VUKOVIC D., DAKIC I., SAVIC B., SVABIC-VLAHOVIC M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40(2):175-179.  
**[Stepanovic et al., 2000]**
79. STRÅLIN K., BÄCKMAN A., HOLMBERG H., FREFLUND H., OLCÉN P. 2005. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae* to be used on sputum samples. *APMIS* 113(2): 99-111.  
**[Strålin et al., 2005]**
80. SWORDS W. E., MOORE M. L., GODZICKI L., BUKOFZER G., MITTEN M. J., VONCANNON J. 2004 Sialylation of lipooligosaccharides promotes biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*, *Infect. Immun*, 72(1): 106-113.  
**[Swords et al., 2004]**
81. SWORDS W.E., JONES P.A., APICELLA M.A. 2003. The lipo-oligosaccharides of *Haemophilus influenzae*: an interesting array of characters. *J. Endotoxin Res.* 9(3):131-144.  
**[Swords et al., 2003]**

82. TANDON M. K., PHILLIPS M., WATERER G., DUNKLEY M., COMANS P., CLANCY R. 2010. Oral immunotherapy with inactivated NTHi reduces severity of acute exacerbations in severe COPD. *Chest* 137(4):805-811.  
**[Tandon et al., 2010]**
83. TREJO Y PEREZ J., GUISCAFRE G. H., GARCÍA M. M., JAIME C. M., GONZÁLEZ A. S., MUÑOZ O. 1981 Sensibilidad de *Haemophilus influenzae* a la ampicilina y al cloranfenicol en niños de la Ciudad de México. *Bol. Méd. Hosp. Infantil Méx.* 38:79-83  
**[Trejo y Perez et al., 1981]**
84. VALLE. C. F. 2006 Día mundial de la EPOC. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex* 19(4):247  
**[Valle., 2006]**
85. VILLASEÑOR-SIERRA A. AVILA FIGUEROA C. SANTOS-PRECIADO J. 1993 Impacto en las infecciones por *Haemophilus influenzae* en niños mexicanos. *Bol. Méd. Hosp. Infantil Méx.* 50:415-421  
**[Villaseñor-Sierra et al 1993]**
86. WENGER J D, WARD J I. 2004. *Haemophilus influenzae* vaccine. En *Vaccines*. Plotkin S. A. Orenstein W. A., Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 4<sup>th</sup> 229-268.  
**[Wenger y Ward., 2004]**

## ANEXO

## MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

✚ **Extracto de Fildes**

Cloruro de sodio (NaCl)	1.275 g
Pepsina granular	1 g
Sangre de carnero desfibrinada	50 mL
Ácido clorhídrico concentrado	6 mL

Mezclar la sangre con los demás componentes en matraz de 250 mL. Incubar a 56°C en baño María durante 24 hrs. Ajustar pH 7.2 a 7.4 con NaOH (sol. saturada). Envasar en botellas estériles de 100 mL con tapón de hule, guardar a 4°C y proteger de la luz.

✚ **Gelosa BHI-Fildes**

Base de caldo BHI	27.7 g
Agar bacteriológico	6.75 g
H <sub>2</sub> O	723.75 mL
Fildes	26.25 mL

Disolver el agar y la base de caldo BHI en H<sub>2</sub>O. Esterilizar a 15 lb/15 min. Enfriar a 55°C y agregar los 26.25 mL de fluido de Fildes. Vaciar a placas Petri.

✚ **Caldo BHI-Glicerol-Leche descremada**

Base de caldo BHI	7.4 g
Leche descremada	3.0 g (1.5%)
Glicerol	30 mL (15%)
H <sub>2</sub> O	170 mL

Disolver la leche descremada calentada a mechero, agregar el glicerol y la Base de caldo BHI. Homogeneizar la mezcla y distribuir en tubos de propileno (2 mL con tapa) 1.5 mL. Esterilizar a 15 lb/15 min. Enfriar a Temp. Ambiente y agregar una gota (≈ 50 µL) de fluido de Fildes. Conservar a -70°C hasta su uso.

### ✚ Caldo BHI-Fildes (2% o 3%)

Base de caldo BHI	37.0 g
H <sub>2</sub> O	980 mL (2%) / 970 mL (3%)
Fildes	20 mL (2%) / 30 mL (3%)

Disolver la base de caldo BHI en H<sub>2</sub>O. Esterilizar a 15 lb/15 min. Enfriar a 55°C y agregar el fluido de Fildes. Filtrar asépticamente a través de membrana de 0.2 µm de tamaño de poro.

### ✚ Gelosa HTM

Agar Mueller hinton BBL 21g/L	50 mg
Hematina SIGMA 15µg/mL	30 mL
NAD SIGMA 15µg/mL	50mg
Extracto de Levadura BBL 5mg/mL	5g
NaOH	100 mL(0.01 mol/L)
Agua destilada	10mL

Se suspendieron 25gr del polvo en 1 litro de agua destilada, se homogenizó y agregó 2 gr de agar, se calentó hasta disolver el medio y se envaso en placas de petri.

## REACTIVOS DE USO GENERAL

### Soluciones:

#### ✚ Tris-Base 1M

Tris-Base	2.11 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

Esterilizar a 121°C/15 min.

#### ✚ EDTA 0.5M

EDTA	18.5 g
H <sub>2</sub> O	75 ml

Ajustar a pH 8.0 con lentejas de NaOH. Aforar a 100 mL y esterilizar a 121°C/15 min.

**✚ Regulador Tris-EDTA (TE) para cosecha de cepas**

Tris-Base	50 mM
EDTA	50 mM

Partiendo de los stocks de EDTA 0.5M y tris base 1M. Aforar a 50 mL

**✚ Regulador Tris-EDTA (TE) para dilución de ADN**

Tris-Base	10 mM
EDTA	1 mM

Partiendo de los stocks de EDTA 0.5M y tris base 1M. Aforar a 50 mL

**✚ Acetato de amonio 7.5 M**

CH <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	29.49 g
H <sub>2</sub> O	500 mL

**✚ N-Lauril- sarcosina 10%**

N-Lauril-sarcosina	2.0 g
H <sub>2</sub> O	20 ml

**✚ Hidróxido de Sodio (sol. saturada)**

NaOH	35 g
H <sub>2</sub> O	60 ml

Calentar a 60°C y esterilizar a 15 lb/15 min

**✚ Solución Hoechst (H33258) 1 µl/ml**

Colorante H33258	10 µL
H <sub>2</sub> O	90 mL

Guardar a 4°C protegiendo de la luz

**✚ Regulador TNE 10X**

Tris-Base	100 mM
EDTA	10 mM
NaCl	2 mM

Disolver en 800 mL de H<sub>2</sub>O. Ajustar pH a 7.4 con HCl (sol. saturada) y aforar a 1 L. Filtrar con poro de 0.45 µm y almacenar a 4°C

**✚ Solución stock AND (Calf-Thymus AND 1 mg/ml)**

ADN	10 mg
Regulador TE 10X	1 ml
H <sub>2</sub> O	2 ml

**✚ Solución Estándar de ADN (rango de ensayo de 10-500 mg)**

Stock ADN	100 µL
TNE 10X	100 µL
H <sub>2</sub> O	800 µL

Queda una sol. de ADN 100 mg/mL en TNE 1X.

**✚ Regulador de Ensayo Fluorescente 1X**

Regulador TNE 10X	10 mL
Stock H33258 (1mg/mL)	10 µL
H <sub>2</sub> O	90 mL

Preparar en probeta y proteger de la luz. Queda una sol. de H33258 0.1µg/mL en TNE 1X.

**✚ Buffer de carga Gel Loading Buffer**

Agorosa	0.02 g
Tris-HCl 1M pH 8.0	0.1 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	0.2 mL
Glicerol Anhidrido	1.0 mL
Azul de Bromofenol	1 mg

Aforar a 10 mL con H<sub>2</sub>O. Esterilizar a 15 lb/30 min. Reposar 2 hrs a 4°C. Pasar varias veces por una aguja calibre 18 estéril y almacenar a 4°C.

**✚ Estandar de peso molecular 100pb (1µg/µl) en 10 mM de EDTA, 5% de glicerol**

100 pb 1 µg/µL	5 µl
TE 50mM	10 µl
Gel Loading Buffer c/glicerol 10%	25 µl
H <sub>2</sub> O	10 µl



**+ Regulador para corrimiento de geles de agarosa, TBE 5X**

Tris-Base TE 50mM	54 g
Ácido Bórico	27.5 g
EDTA 0.5M	20ml
H <sub>2</sub> O	60ml

**+ Solución Cristal Violeta 1%**

Cristal Violeta	5 g
Etanol al 70%	50mL
H <sub>2</sub> O desionizada	450mL

Disolver el colorante en el etanol y aforar a 500 con el H<sub>2</sub>O. Reposar toda la noche en obscuridad. Filtrar a través de papel filtro convencional.

**+ Etanol al 70%**

Etanol Absoluto	700mL
H <sub>2</sub> O desionizada	300mL