



9
2ej
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DETECCION DE PORTADORES FARINGEOS
DE
Haemophilus influenzae**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

VERONICA AVALOS MOLINA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| OBJETIVO | 2 |
| I. GENERALIDADES ACERCA DE <i>H. influenzae</i> . | |
| i. Taxonomía | 3 |
| ii. Características microscópicas | 6 |
| iii. Propiedades culturales | 7 |
| iv. Pruebas de identificación | 15 |
| v. Tipificación | 16 |
| vi. Importancia clínica | 22 |
| II. PARTE EXPERIMENTAL | |
| i. Equipo, material, medios de cultivo y reactivos. | 34 |
| ii. Metodología | 35 |
| iii. Resultados | 36 |
| iv. Discusión | 39 |
| CONCLUSIONES | 42 |
| BIBLIOGRAFIA | 44 |

H. influenzae figura entre las especies bacterianas que fungen como agentes etiológicos de diversas y graves afecciones, destacando la meningitis, septicemia, pericarditis, bronquitis, neumonía, ptoartritis, epiglotitis, otitis media y sinusitis, entre algunas otras.

Su principal vía de transmisión es la aérea, lo cual determina la imposibilidad de establecer medidas preventivas eficaces que impidan su diseminación entre la población. De esta manera, el microorganismo coloniza inicialmente la faringe de los individuos, región a partir de la cual se traslada al tracto respiratorio inferior y/o a oído medio y a senos paranasales, o bien, penetra en el torrente circulatorio -ocasionando septicemia- y, como consecuencia, llega a corazón, articulaciones y sistema nervioso central (SNC).

Cabe señalar que, en México -tal como sucede en muchos otros países del mundo-, el serotipo b es el causante más frecuente de meningitis bacteriana, enfermedad que afecta con mucha mayor insistencia a los niños que al adulto, ocasionándoles -en numerosos casos- serias complicaciones neurológicas y hasta la muerte.

En el presente trabajo, se intenta establecer la frecuencia con la que *H. influenzae* coloniza las vías respiratorias altas de las personas sanas, con la finalidad de conocer la frecuencia

aproximada con la que forma parte de la flora habitual de la faringe y la de valorar las dimensiones del problema asociado a su transmisión entre la población. En el primer caso, los resultados ayudarán a interpretar con mayor certeza su presencia en los exudados faríngeos mientras que, en el segundo, podría determinarse la importancia de los portadores sanos en la incidencia de las afecciones ocasionadas por esta especie.

OBJETIVO

Establecer la frecuencia de los portadores faríngeos de *Haemophilus influenzae*, considerando parámetros tales como la edad y el sexo.

I. GENERALIDADES

i. Taxonomía

El género *Haemophilus* se encuentra integrado por cocobacilos Gram negativos que, para desarrollarse, requieren hemina o ciertas porfirinas (factor X); de hecho, fue creado por el Comité Americano de Clasificación y Nomenclatura en 1920 para incluir en él a un cierto número de microorganismos hemofílicos. Cabe señalar que, en esa época, el género también contenía a bacterias que actualmente reciben otros nombres, destacando: *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Corynebacterium pyogenes*, *Gardnerella vaginalis* y *Eikenella corrodens* (2, 22, 24).

La taxonomía del género *Haemophilus* ha constituido tradicionalmente un reto importante para los especialistas, al grado de que aún no se ha concretado su afiliación a alguna familia: en un principio se le situó en la *Parvobacteriaceae* y, posteriormente, ha entrado y salido de la *Brucellaceae* (24).

En 1973, Sneath y Johnson, encontraron que era fenotípicamente similar a *Pasteurella* y *Actinobacillus*, y establecieron que los tres géneros podían integrar una familia muy diferente a la que se encontraba constituida por *Bordetella*, *Brucella* y *Moraxella* (7, 24).

En 1976, Kilian sugirió que su clasificación contemplara otros parámetros diferentes al de producción de hemólisis y requerimiento de CO_2 y de los factores V (NAD^+) y X; sin embargo, ello ha resultado complicado, ya que se han reportado notables diferencias en las características bioquímicas de las distintas especies (2).

Adicionalmente, el concepto de agrupar al género de acuerdo a sus requerimientos nutricionales se ha venido cuestionando, con base en diversos estudios sobre homología del DNA (7).

En 1980, se volvió a demostrar la similitud existente entre *Haemophilus*, *Pasteurella* y *Actinobacillus*; en esa ocasión, los análisis incluyeron la comparación de los fenotipos y estudios de reasociación DNA/DNA -en los que se utilizaron métodos ópticos para determinar cuantitativamente los grados de renaturalización-, en los que se observó que *H. pleuropneumoniae*, *Pasteurella* y algunas otras especies de *Haemophilus* alcanzaban niveles de homología mayores al 90 % - cifra que no sólo rebasa a la que determinaría su ubicación dentro de un mismo género sino que, además, indicaría identidad de especie-. Sin embargo, estos datos se han ignorado dado que, bajo dichas condiciones, numerosos grupos tendrían que ser incluidos en el género *Haemophilus* y, adicionalmente, algunas especies de este último resultarían candidatos para reubicarse en otros (7).

En resumen, las dificultades para clasificar al género *Haemophilus* dentro de alguna familia, se relacionan con los siguientes razonamientos (7):

a) Su estructuración taxonómica no resulta posible mediante los patrones genéticos que permiten tradicionalmente la discriminación de especie, género y tribu.

b) Su clasificación dentro de una familia independiente produciría estructuras, rangos o subgrupos asociados estrechamente a los de la familia *Enterobacteriaceae*.

c) Su ubicación en una familia que también incluyera a *Actinobacillus* y *Pasteurella* permitiría conservar los nombres de los 3 géneros.

Tomando en cuenta el último punto, algunos autores consideran que la clasificación de este microorganismo debería ser la siguiente (7, 12, 18) :

Familia: *Pasteurellaceae*

Género: *Haemophilus*

En este sentido, se espera que -en un futuro cercano- todos

los estudios de taxonomía que implican al género *Haemophilus* se dirijan a resolver el conflicto existente entre lo establecido históricamente y los criterios recientes (7).

Mientras tanto, dentro del género *Haemophilus* se encuentran reportadas 15 especies bien definidas y 5 de afiliación incierta, 10 de las cuales se relacionan con el humano: *H. influenzae* (39 % G+C), *H. aegyptius* (39 % G+C), *H. ducreyi* (38 % G+C), *H. parahaemolyticus* (40-41 % G+C), *H. paraphrohaemolyticus* (40-41 % G+C), *H. parainfluenzae* (40-41 % G+C), *H. aphrophilus* (42 % G+C), *H. segnis* (43-44 % G+C), *H. haemolyticus* (39 % G+C) y *H. paraphrophilus* (42 % G+C) (2, 7, 18, 21, 24).

H. influenzae, la especie tipo del género, fue aislada y descrita por Richard Pfeiffer en 1892 -quien la consideraba erróneamente como el agente etiológico de la influenza- (2, 7). Por otro lado, cabe señalar que es la más importante en Medicina Humana, dado que ocasiona al hombre un número elevado de padecimientos (2, 34, 37, 38).

ii. Características microscópicas

Haemophilus influenzae es un cocobacilo Gram negativo, con tendencia a mostrar varios grados de pleomorfismo, dependiendo de su edad y de las condiciones de incubación. Durante las primeras 6 a 8 h de su desarrollo -en medios

enriquecidos- predominan las formas cocobacilares, sin embargo, más tarde se observan bastoncillos más largos, células que experimentaron lisis y formas filamentosas (23, 25).

Las cepas no capsuladas a menudo son más elongadas y pueden presentar tinción bipolar con colorantes de Gram, ocasionando que el analista las pueda confundir con *Streptococcus pneumoniae* (21).

En cuanto a las capsuladas, éstas pueden evidenciar cápsulas refráctiles y débiles, demostrables mediante reacciones de quellung -con sueros específicos- (2, 4, 6, 7, 12, 20, 21, 24, 25, 37).

iii. Propiedades culturales

a) Requerimientos nutricionales y medios de cultivo

Haemophilus influenzae crece nula o escasamente en medios de cultivo convencionales, pero lo hace con abundancia en los enriquecidos. Su característica principal radica en su requerimiento de ambos factores accesorios: el X y el V (2, 6, 7, 12, 18, 20, 21, 24).

Thjotta y Avery introdujeron los términos factor X y factor V para referirse, respectivamente, a una sustancia termoestable conocida como hemina y a otra termolábil identificada como nicotinamida adenin dinucleótido (2).

La primera la utiliza la bacteria como grupo prostético de sus citocromos que contienen hierro y en la producción de enzimas con grupo hemo tales como la catalasa (7, 18, 21, 24, 37).

H. influenzae no posee capacidad para convertir al ácido delta aminolevulínico en protoporfirina, sin embargo, sintetiza la enzima que cataliza la inserción final del hierro en el anillo protoporfirínico (hemosintetasa), para convertirlo a hemina. La sangre o sus derivados -incluyendo a la hemina- son las fuentes adecuadas de factor X (7, 18, 24).

Por su parte, el factor V es un dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+ o NADP^+) que actúa como coenzima de las deshidrogenasas unidas a piridina y, aunque se encuentra presente en la sangre, no se aprovecha por localizarse intracelularmente y porque aquélla también contiene NADasa (7, 18, 21, 23, 24).

Algunas bacterias tales como *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *Neisseria*, producen NAD^+ en exceso y lo excretan al medio; por ello, cuando dichos géneros forman parte de los cultivos, el factor de crecimiento se difunde en el medio favoreciendo el desarrollo de *Haemophilus* dependientes de él. Este

fenómeno se conoce como satelitismo y su ocurrencia no indica necesariamente que los microorganismos que aprovechan el suceso sean auxótrofos al factor V (6, 7, 12, 18, 23, 24, 25).

Experimentalmente se ha calculado que, para desarrollar *in vitro*, *H. influenzae* requiere la presencia de 0.2 a 1.0 $\mu\text{g/ml}$ de NAD^+ y entre 0.1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de factor X, dependiendo del tamaño del inóculo y de otros factores aún no definidos; sin embargo, cuando se incuba anaeróbicamente, el microorganismo emplea un metabolismo que no se asocia a los citocromos y, por lo tanto, su necesidad de hemina disminuye notablemente o es casi nula (7, 21, 24).

En la actualidad se emplean varias técnicas simples para determinar los requerimientos de los factores X y V en *H. influenzae*. La más generalizada se basa en el empleo de tiras o discos de papel filtro impregnados con dichos factores, los cuales son hidrosolubles y difunden fácilmente en el agar; lógicamente, el medio debe encontrarse exento de hemina y NAD^+ y las tiras o discos se aplican sobre la superficie del agar - previamente inoculado- para observar el característico patrón de desarrollo alrededor de ellas (25).

No obstante, este método se considera de baja confiabilidad cuando se omite el lavado del inóculo, para eliminar las trazas de dichos factores que pudieran arrastrarse desde el

cultivo primario (2, 7, 12, 19, 24, 25).

Debido a lo anterior, Kilian diseñó una prueba denominada "de la porfirina", la cual se basa en el principio de que las cepas dependientes del factor X carecen de la enzima porfobilinógeno sintetasa -que transforma el ácido deltaminolevulínico en porfobilinógeno, porfirinas y hemina (Diagrama 1)- (25).

El porfobilinógeno se puede detectar en el medio utilizando el reactivo de Ehrlich modificado, o bien, evidenciando la presencia de porfirinas por su fluorescencia mediante el empleo de luz ultravioleta; por lo tanto, la ausencia de éstos indica que el microorganismo requiere una fuente exógena del factor X, tal como sucede en *H. influenzae* cuyo resultado lógicamente es negativo en dicha prueba (18, 24, 25).

Esta técnica no asume los falsos positivos que ocurren en el método de la tira; especialmente, elimina el riesgo del arrastre de hierro procedente de la placa primaria, si bien se debe incluir un testigo exento de sangre (24, 25).

Cabe mencionar que los resultados negativos en microorganismos de otros géneros no implican que aquéllos sean auxótrofos para el factor X (24).

Por otra parte, es necesario consignar que otras sustancias tales como el ácido pantoténico, tiamina, uracilo, purina y

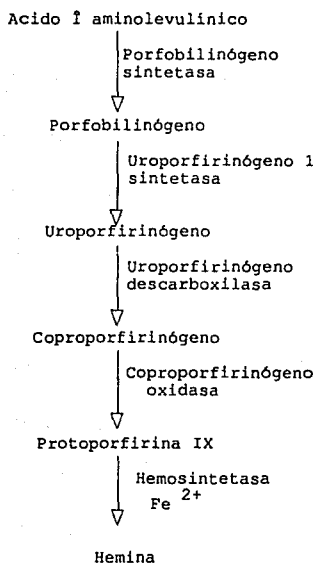
cisteína, estimulan un crecimiento abundante de *Haemophilus* (7, 37).

Por lo general, el medio más empleado para aislar a *H. influenzae* es el agar chocolate, ya que éste contiene todos los factores necesarios para su desarrollo. El principio de la preparación de dicho medio radica en el calentamiento de la sangre, ya que ello libera a los factores X y V de los eritrocitos e inactiva a la NADasa (4, 6, 7, 12, 18, 21, 24).

No obstante, para sustituir el calentamiento se pueden utilizar métodos enzimáticos que provocan la lisis de los glóbulos rojos, se adicionan al medio cantidades específicas de extracto de levadura -como fuente de factor V- o polienriquecimientos (IsoVitalex o equivalentes), los cuales contienen NAD^+ , vitaminas, cofactores y otros suplementos que favorecen el desarrollo del microorganismo (25).

Es preciso señalar que otros medios clásicos para el cultivo de muestras clínicas son el agar enriquecido de Levinthal y el de Fildes (21). El primero contiene el filtrado de eritrocitos lisados de caballo, es transparente y resulta muy útil para aislar cepas capsuladas y no capsuladas de *H. influenzae*, en tanto que, el segundo, contiene los factores

Diagrama 1. Biosíntesis de hemina (18).



de crecimiento liberados por digestión de la sangre (7, 12, 18, 21, 23, 24, 25).

El agar sangre común permite el crecimiento de *H. influenzae*

sólo cuando la placa se inocula en forma cruzada con microorganismos que excretan factor V. Sin embargo, no es conveniente emplear sangre fresca, humana o de carnero, porque ambas contienen NADasa (12, 18, 21, 25).

Cuando se desea aislar a este microorganismo a partir de muestras provenientes de las diversas mucosas, es recomendable emplear agentes inhibitorios que no lo afecten. En este sentido, destaca la bacitracina, la cual aporta una considerable selectividad a los medios correspondientes (24, 25).

La bacitracina se puede adicionar a todos los medios de cultivo en concentraciones de 5 a 18.9 U/ml, las cuales inhiben eficazmente el desarrollo de numerosas bacterias Gram positivas (12, 18, 24, 25, 35).

Alternativamente, se puede emplear una combinación de bacitracina, vancomicina y cloxacilina para incrementar la selectividad de los medios, incorporándoles 1 % de Isovitalex para favorecer el crecimiento del microorganismo (7, 12, 18, 20, 23, 24, 35).

b) Condiciones de incubación

Las cepas de *H. influenzae* pueden desarrollar en aerobiosis y en anaerobiosis, ya que esta especie produce

dimetilmenaquinona (DMK) -que se emplea para el transporte de electrones en ambas condiciones- y ello le permite obtener energía vías la fosforilación a nivel de sustrato y la fosforilación oxidativa (7, 21).

Su desarrollo óptimo se logra a temperaturas de 35 - 37° C, a pH's de 7.7 a 7.9 y bajo tensiones de 5 a 10 % de CO₂, por lo que se recomienda incubar los cultivos considerando el método de la vela o el empleo de una estufa con CO₂. Bajo estas condiciones, las colonias se obtienen en 24 a 48 h (4, 12, 18, 24, 25, 37).

c) Morfología macroscópica

Las colonias de *H. influenzae* presentan un diámetro de 0.5 a 1.5 mm y son redondas, húmedas y lisas, de aspecto blanco-grisáceo semiofaco (4, 12, 18, 23, 25).

Los cultivos jóvenes (8 - 18 h) de las cepas capsuladas son iridiscentes (semejante al arcoiris bajo la luz transmitida oblicuamente) pero, durante las siguientes 24 h, desarrollan una umbilicación central debido a la actividad de la neuraminidasa. A menudo, las colonias mucoides se transforman espontáneamente en rugosas (3, 20, 21, 23, 24, 25).

Los cultivos de *H. influenzae* son difíciles de mantener en el laboratorio, dada su tendencia a autolisarse; por ello, es

conveniente realizar subcultivos periódicos en agar chocolate u otros medios enriquecidos, aunque resulta más adecuada la liofilización, a través de la cual el microorganismo se conserva por lo menos durante 25 años (21, 24).

iv. Pruebas de identificación

Tradicionalmente, la identificación de las especies de *Haemophilus* se ha basado en su auxotrofia hacia diversos factores de crecimiento. En este caso, los métodos involucrados incluyen el empleo de discos, la prueba de la porfirina y el fenómeno de satelitismo (6, 18, 24, 25, 32).

Sin embargo, lo anterior no es suficiente, ya que especies diferentes llegan a manifestar requerimientos similares; por tal motivo, es necesario incluir las pruebas de fermentación de sacarosa, glucosa, xilosa, manitol y ribosa, la de hemólisis y la de reducción de nitratos a nitritos (24, 25, 37).

En este sentido, algunos autores conceden gran validez a las reacciones de fermentación pero, como ya se mencionó, otros subrayan las discrepancias encontradas en las características bioquímicas de *H. influenzae*. Por otra parte, se debe consignar que sólo las especies no dependientes del factor X fermentan sacarosa; es decir, *H. influenzae* no lo hace (7, 18, 24, 32).

Cabe mencionar que las pruebas de fermentación se basan en la utilización de medios base, a los que se les agrega el carbohidrato en proporción del 1 %, los factores X y V e indicador rojo de fenol; las lecturas se realizan después de una incubación de 2 a 5 días a 35° C (Tabla 1) (18, 24)

v. Tipificación

La especie *H. influenzae* se encuentra integrada por cepas capsuladas y no capsuladas. En este contexto, las primeras se consideran "tipificables" y las segundas "no tipificables", correspondiendo este criterio a la tradicional reacción de quellung (o a cualquiera otra basada en la utilización de sueros anti-capsulares). Mediante estas técnicas se reconocen 6 diferentes serotipos -a, b, c, d, e, f- (Tabla 2), los cuales difieren entre sí en su respectivo material capsular (3, 7, 18, 21, 28, 37, 42, 46).

Dada la existencia de numerosas cepas no serotipificables, Gratten, más recientemente, encontró un método que tipifica confiablemente a un mayor porcentaje del total y que se basa

**TABLA 1. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS PRINCIPALES
 ESPECIES DE *Haemophilus* (2, 7, 18, 24).**

| | Factor V | Hemol | Gluc | Sacar | Lact | XII | Rib | Indol |
|----------------------------|----------|-------|------|-------|------|-----|-----|-------|
| <i>H. influenzae</i> | + | - | + | - | - | + | + | + |
| <i>H. aegyptius</i> | + | - | + | - | - | - | + | - |
| <i>H. haemolyticus</i> | + | + | + | - | - | V | + | V |
| <i>H. ducreyi</i> | - | V | V | - | - | - | - | - |
| <i>H. aphrophilus</i> | - | - | + | + | + | - | + | - |
| <i>H. parainfluenzae</i> | + | - | + | + | - | - | - | - |
| <i>H. parahaemolyticus</i> | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>H. paraphrophilus</i> | + | - | + | + | + | - | + | - |

**V= variable, Hemol= hemolisis, Gluc= glucosa, Sacar= sacarosa, Lact= lactosa,
 XII= xilosa, Rib= ribosa.**

Tabla 2. Composición capsular de los 6 serotipos de *H. influenzae* (21, 37).

| Serotipo | Azúcar | PO ₄ ³⁺ | Acetilo |
|----------|------------------|-------------------------------|---------|
| a | Glucosa | + | - |
| b | Ribosa y ribitol | + | - |
| c | Galactosa | + | - |
| d | Hexosa | - | - |
| e | Hexosamina | - | + |
| f | Galactosamina | + | + |

Tabla 3. Clasificación de Gratten (7, 18, 21, 32)

| Biotipo | Indol | Ureasa | Ornitina Descarboxilasa |
|---------|-------|--------|----------------------------|
| I | + | + | + |
| II | + | + | - |
| III | - | + | - |
| IV | - | + | + |
| V | + | - | + |
| VI | - | - | + |
| VII | + | - | - |
| VIII | - | - | - |

en la realización de 3 pruebas bioquímicas: producción de indol, ureasa y ornitina descarboxilasa. De esta manera, *H. influenzae* se subdivide en 8 biotipos: del I al VIII (Tabla 3). Cabe subrayar que este criterio también aplica para las cepas capsuladas, independientemente de que éstas también se puedan serotipificar (7, 18, 21, 32).

Serotipificación

Como ya se mencionó, los 6 serotipos capsulares pueden diferenciarse por medio de la reacción de quellung; sin embargo, ello también se puede llevar a cabo mediante contraimmunoelectroforesis (CIEF), aglutinación en látex y coaglutinación, empleándose para ello sueros monovalentes. Al parecer, el más sensible de los métodos señalados es el de aglutinación en látex, ya que con la CIEF ocurren falsos negativos -en concentraciones altas del antígeno capsular-; no obstante, también se recomienda el de coaglutinación, debido a su simplicidad, precisión, rapidez y a su menor proporción de falsos negativos en presencia de altas concentraciones del antígeno -polirribitol fosfato- (3, 4, 7, 12, 18, 22, 28, 45).

Los sueros comerciales anti-*H. influenzae* varían notablemente en cuanto a potencia y especificidad: algunos registran reacciones cruzadas entre esta especie y otros microorganismos capsulados, tales como neumococo y meningococo; por otro lado, algunas cepas "no tipificables" se autoaglutinan y ello hace necesario emplear controles negativos -con solución salina- los cuales se leen en 30 a 60 seg (6, 18, 28, 29, 31).

Biotipificación

Esta constituye una herramienta útil en Epidemiología dado

que, mediante el uso de sueros anti-capsulares, un elevado número de cepas de *H. influenzae* resulta "no tipificable"; no obstante, se considera que con la utilización de la reacción de quellung y la clasificación de Gratten (adicionalmente), aún quedan sin tipificar un 40 a 60 % de las cepas -dadas las diferencias existentes en las pruebas bioquímicas dentro de esta especie-; cabe mencionar que las variaciones señaladas podrían residir en la cantidad o la calidad del sustrato base, el amortiguador, el indicador y la naturaleza de otros componentes del medio, más que en las propias enzimas del microorganismo (13, 32).

Debido a lo anterior, Barenkamp ha establecido otro criterio de biotipificación para *H. influenzae*, el cual consiste en caracterizar sus proteínas de membrana externa (OMP) mediante métodos electroforéticos. Para ello, se emplea un sistema de SDS PAGE (sodium dodecil sulphate poliacrylamide gel electrophoresis) (4, 13, 16, 27, 28, 38)

Cabe mencionar que los perfiles de las OMP son estables y útiles para clasificar, tanto a las cepas "tipificables" como a las "no tipificables" (39); de acuerdo a los diferentes trabajos, las últimas han manifestado mayor variabilidad que las primeras (16, 42, 46), lo cual probablemente tenga relación con la gran diversidad genética que existe dentro de la especie, aunque también existe la posibilidad de que ocurran cambios en el movimiento electroforético de muchas

OMP (16).

Según lo antes citado, varias cepas del mismo biotipo -según Gratten- pueden mostrar patrones diferentes de OMP y, algunas otras, aunque coincidan en estos dos sistemas de biotipificación, resultan serológicamente diferentes con cierta frecuencia (39).

En la actualidad se considera que, para llevar a cabo el estudio epidemiológico de *H. influenzae*, lo más conveniente es efectuar el estudio de las OMP, combinado con la biotipificación de Gratten (16, 38).

vi. Importancia clínica

En nuestro país, las enfermedades infecciosas figuran entre las de mayor morbiletalidad, tanto en la población infantil como en la adulta. En cuanto a las que involucran al tracto respiratorio y al sistema nervioso central, éstas presentan una etiología muy variada, destacando los virus y las bacterias como los agentes más significativos. En este contexto, *H. influenzae* posee un lugar preponderante, dada la gran diversidad de patologías que origina en estas regiones anatómicas (37, 38).

Como es sabido, numerosos portadores albergan a este microorganismo formando parte de la flora habitual de su

tracto respiratorio superior, la boca y, ocasionalmente, de su tracto genitourinario y el canal intestinal (4, 7, 9, 10, 12, 19, 20, 24, 25, 28, 30, 33, 35, 37, 41, 43).

Ello favorece que se le aisle con cierta frecuencia a partir de sitios tales como el tracto urinario, apéndice, médula ósea, recto, uñas y piel, hasta donde se desplaza desde el tracto respiratorio. Sin embargo, su mayor participación como agente causal ocurre en faringe, senos paranasales, amígdalas, laringe, tráquea, epiglotis, bronquios, pulmones, sangre, corazón, articulaciones, conjuntiva ocular, oído medio y, sobre todo, en el SNC (13, 29, 33, 40, 43).

Dependiendo de la población analizada, los portadores faríngeos de *H. influenzae* varían entre 7 y 80 %, pudiendo detectarse en varios individuos la colonización por múltiples biotipos; en este sentido, cabe destacar que las cepas "no tipificables" resultan más frecuentes que las serotipificables (Tabla 4) (3, 21, 35, 37, 39, 42, 45)

Aunque se ha demostrado que la colonización faríngea por *H. influenzae* es común, no se ha encontrado una clara asociación entre dicho evento y la frecuencia de las enfermedades ocasionadas por esta especie; es posible que un portador pueda contener una cepa determinada durante algún tiempo y que posteriormente permanezca exento de bacilos de esta

especie o adquiriera en su lugar otras de diferentes biotipos; es decir, las cepas colonizantes pueden ser residentes o transitorias aunque, de cualquier manera, es más probable que las que persisten en el hospedador, obtengan mayores oportunidades de ser transmitidas a otras personas (39, 41).

Tabla 4. Frecuencia de portadores faríngeos de *H. influenzae* y enfermedades que esta especie ocasiona al humano (3, 4, 8, 42).

| Cepas | % de portadores en vías respiratorias altas | Principales manifestaciones de patogenicidad |
|--------------------------|---|--|
| Sin cápsula | 50 a 80 | Bronquitis crónica, Otitis media, sinusitis, conjuntivitis |
| Capsulado tipo b | 2 a 4 | Meningitis, epiglottitis, neumonía, artritis séptica, celulitis, otitis media, pericarditis. |
| Capsuladas a, c, d, e, f | 1 a 2 | Sinusitis. |

Cabe subrayar que, aunque este microorganismo se considera muy exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales, puede mantenerse viable en fomites durante 5 h o más -sobre todo cuando se encuentra suspendido en moco fresco, en donde la lactoferrina funge como fuente de hierro-; por ello, las secreciones respiratorias constituyen un medio adecuado para su transmisión (33, 40).

En una infección por *H. influenzae*, el primer evento consiste en la colonización de la nasofaringe, previa inhalación de microgotitas expelidas por enfermos, convalescientes o portadores; posteriormente, el proceso puede evolucionar hasta transformarse en un padecimiento que se disemina a los senos paranasales, oído medio, epiglotis, bronquios, pulmones y/o sangre. Una vez en esta última, el microorganismo puede llegar a SNC -produciendo meningitis-, a las articulaciones, corazón, etc. (3, 4, 21, 40, 43).

En general, las patologías relacionadas con *H. influenzae* se pueden dividir en dos grupos (7, 37, 38):

- a) Las enfermedades agudas piógenas, en las que el microorganismo funge como patógeno primario.

- b) Los padecimientos crónicos, en los cuales la bacteria desempeña generalmente el papel de patógeno secundario.

Cabe señalar que, recientemente, este microorganismo se ha relacionado con algunos casos de salpingitis, sepsis neonatal y fiebre puerperal (1, 4, 10, 18, 36, 40, 42).

Por lo que respecta al serotipo b, éste es uno de los principales patógenos en niños (1, 9, 11, 14, 15, 17, 22, 23, 26, 44) y su importancia en los adultos aún es tema de controversia (10, 15, 29, 30, 34, 47); en contraste, la virulencia de las cepas "no tipificables" se ha comprobado ampliamente en ambos grupos (36, 39).

Entre los 6 serotipos tipificables, el f es el segundo patógeno humano en cuanto a frecuencia; de hecho, existen reportes de diversas patologías en adultos, muchas de las cuales son indistinguibles de las ocasionadas por el tipo b (36).

A continuación se describen brevemente las enfermedades respiratorias en las que *H. influenzae* participa con mayor frecuencia (31).

Epiglotitis

La gran mayoría de las veces, esta afección se debe a *H. influenzae* tipo b y/o a *Streptococcus pneumoniae*; en general, las cepas "no tipificables" de la primera especie no se

consideran agentes etiológicos de esta enfermedad; es importante considerar que entre las "tipificables" también se han registrado casos provocados por el serotipo f. De cualquier manera, es común que la bacteremia ocurra casi paralelamente (15, 18, 36, 42).

Por lo regular, la faringitis antecede a la colonización del tracto respiratorio inferior, produciéndose la inflamación de la epiglotis; ésta obstruye mecánicamente la vía aérea dificultando la respiración, generando hipoxia y retención de CO_2 y alterando el mecanismo de limpieza de las mucosas. Como consecuencia de lo anterior, puede ocurrir una asfixia fatal (5, 18, 36).

El diagnóstico clínico presuntivo se basa en la aparición de fiebre, dolor de garganta y deficiencia respiratoria, y su confirmación comprende la visualización de una epiglotis inflamada, purulenta y rojiza (36).

Neumonía

En nuestro medio, la neumonía ocasionada por *H. influenzae* se presenta en similar frecuencia que la debida a *Streptococcus pneumoniae* (4).

Prácticamente, cualquiera de los seis serotipos de *H. influenzae* puede causar este padecimiento, aún cuando los de

mayor incidencia son el a y el b (5); en cuanto a las cepas "no tipificables", éstas son más frecuentes cuando la neumonía sucede a una bronquitis crónica (4).

Aún cuando esta enfermedad -causada por *H. influenzae*- es propia de la primera infancia, también puede ocurrir en adultos. En su cuadro clínico destacan: el esputo típicamente tenaz de color "verde manzana" y una cianosis intensa (4, 5, 42).

El diagnóstico se establece con base en el cuadro clínico y la identificación del microorganismo en el esputo; los hemocultivos son positivos hasta en un 60 % de los casos y, cuando se presenta derrame pleural, aumenta la posibilidad de que se aisle al agente etiológico en el líquido correspondiente (4, 5).

Otitis media

Esta es otra de las patologías causadas frecuentemente por *H. influenzae* e incluso sus índices son superiores a los de *S. pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*. Las cepas "no tipificables" ocasionan más de la cuarta parte (85 a 90 %) de los casos generados por esta especie, debido a que son las que se encuentran en mayor proporción en la faringe de los portadores sanos (50 a 80 %); por su parte, las del tipo b provocan el 10 a 15 % y, aunque se han reportado otitis medias relacionadas con los grupos a, e y f, su incidencia es escasa (4, 46).

Esta enfermedad ocurre en todas las edades pero, incuestionablemente, los pacientes pediátricos son afectados con mayor frecuencia; sus signos principales son: secreción nasal, congestión faríngea, dolor en el oído -por acumulación de líquidos- y abombamiento con opacidad de la membrana timpánica (4, 46).

El diagnóstico se establece de acuerdo al cuadro clínico y al aislamiento del microorganismo a partir de muestras recolectadas por aspiración del líquido mucopurulento que se acumula en el oído (4, 46).

Sinusitis

Constituye una de las principales entidades clínicas que afectan al tracto respiratorio superior, tanto en adultos como en niños; entre los agentes etiológicos de mayor incidencia destacan *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* y *H. influenzae*; en cuanto a este último, parece no existir algún tipo predominante, aunque las cepas "no tipificables" suelen resultar más frecuentes (5, 18, 20, 36, 39, 40, 41).

La sinusitis se define como la inflamación de las membranas

mucosas de los senos paranasales, con acumulación de material purulento; dependiendo de su duración, se divide en aguda, subaguda o crónica, y sus síntomas y signos dependen de la localización de los senos afectados y del curso mismo del padecimiento; no obstante, destacan la descarga nasal purulenta -amarillo o verdosa-, dolor o molestia facial, desórdenes en el olfato, dolor al masticar, congestión nasal, accesos tusígenos e irritación y edema faríngeos (5).

El diagnóstico de laboratorio puede llevarse a cabo mediante métodos directos e indirectos. En los primeros se efectúa la recolección de las muestras directamente de los senos afectados y se procede a aislar e identificar secuencialmente a los agentes etiológicos del padecimiento y, en cuanto a los indirectos, éstos son de ayuda para confirmar el diagnóstico inicial basado en los signos y síntomas, destacando la transiluminación, las radiografías y el ultrasonido de los senos paranasales -para localizar y determinar el grado de la alteración- (5).

Bronquitis crónica

Esta enfermedad afecta generalmente a pacientes de edad avanzada, aunque también se presentan algunos casos en niños (19, 31, 36, 42); sus principales agentes etiológicos son: *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, *P.*

aeruginosa, *K. pneumoniae* y *E. coli* predominando, dentro de la primera especie citada, las cepas "no tipificables" (5, 18, 19).

Cabe mencionar que algunos autores afirman que *H. influenzae* juega un papel secundario en este padecimiento, dado que previamente suelen existir daños en las mucosas -relacionados con virus, reacciones alérgicas, obstrucción mecánica, bajas defensas del hospedador o ciertos hábitos tales como el tabaquismo- (18).

La bronquitis crónica se define como un proceso inflamatorio del árbol bronquial, asociado a exposición prolongada a agentes irritantes inespecíficos y caracterizado por hipersecreción mucosa y alteraciones estructurales de los bronquios; clínicamente pueden observarse anomalías tales como las siguientes: deficiencias ventilatorias, disnea, tos productiva -que suele ser de predominio matutino-, expectoración mucoadherente de color amarillo verdoso y una hipoxemia -la cual provoca vasoconstricción de las arteriolas pulmonares, hipertensión pulmonar e insuficiencias respiratoria y cardíaca, pudiendo sobrevenir la muerte del paciente- (5).

La bronquitis crónica y el enfisema coexisten muchas veces en el paciente, produciendo obstrucción de las vías aéreas; por tal motivo, a este cuadro se le denomina comúnmente

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (5).

Por lo que se refiere al diagnóstico, éste debe basarse en el examen físico, la demostración de signos fisiológicos de obstrucción en las vías aéreas, y la exclusión de enfermedades específicas tales como silicosis, aspergilosis, asma bronquial y fibrosis quística; además, es conveniente emplear la espirometría, las radiografías del tórax, los electrocardiogramas y, desde luego, los exámenes bacteriológicos de expectoraciones, lavados bronquiales, aspirados transtraqueales, etc (5).

Meningitis

De todas las enfermedades ocasionadas por *H. influenzae*, ésta es -incuestionablemente- la más grave; afecta tanto a la población infantil y los neonatos como a la adulta, aunque en la primera se localiza la mayor morbi-letalidad. En México, este microorganismo es el agente etiológico número uno de la meningitis bacteriana, seguido de *S. pneumoniae*, *E. coli* K1, *P. aeruginosa* y otras especies; aunque el serotipo b es el predominante, se han registrado casos debidos a los serotipos a, e y f -tanto en adultos como en niños- y, con menor frecuencia, a las cepas "no tipificables" (1, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 27, 30, 31, 36, 39, 42, 44, 45, 47).

En esta enfermedad, el agente etiológico establecido en la faringe, invade el torrente sanguíneo -provocando bacteremia- y, posteriormente, llega a meninges originando al paciente: fiebre, irritabilidad, somnolencia, cefalea, náuseas, vómito, convulsiones y rigidez de nuca (4, 12).

El diagnóstico requiere de la punción lumbar y el examen del LCR para obtener la siguiente información: presión, aspecto del líquido, cuenta celular y concentración de proteínas y glucosa; asimismo, se realizan -del sedimento- los frotis al Gram, la reacción de quellung y el cultivo (4, 5).

Esta enfermedad debe tratarse rápidamente para evitar la muerte o la aparición de posibles secuelas tales como: daño neural, ceguera, sordera, parálisis, retraso mental o hidrocefalia (4, 5, 8).

II. PARTE EXPERIMENTAL**i. Equipo, material, medios de cultivo y reactivos**

Microscopio óptico

Microscopio estereoscópico

Autoclave

Incubadora ajustada a 35⁰C

Cuarto frío ajustado a 4⁰C

Balanza granataria

Jarra Gas pack

Mechero Bunsen

Pinzas Millipore

Asa bacteriológica

Jeringas de 1 y 5 ml estériles

Espátula

Tripié con tela de alambre

Tubos de ensaye

Matraces EM de 1000 y 500 ml

Pipetas Pasteur estériles

Cajas Petri estériles

Portaobjetos

Hisopos estériles

Abatelenguas

Velas

Agar chocolate (Tripticasa soya agar + Hemoglobina)

IsoVitalex 2 %

Agar Casoy

Caldo infusión cerebro corazón

Agar sangre humana

Solución estéril de NaCl al 0.85 %

Colorantes de Gram

Discos impregnados con factores X, V y XV

Suero Phadebact anti *H. influenzae* tipo b

Cepa testigo de *H. influenzae* tipo b

ii. Metodología

En este trabajo se realizaron los análisis microbiológicos de 180 exudados faríngeos practicados a otras tantas personas sin patologías aparentes en el tracto respiratorio: 90 varones y 90 mujeres, de diferentes edades (Tabla 5).

Recolección y cultivo de las muestras

Los especímenes se recolectaron con hisopos de algodón estériles a partir de la faringe, tomándose en consideración las precauciones recomendadas para no incrementar la carga microbiológica con microorganismos presentes en boca y úvula. Posteriormente, se procedió a descargar el contenido de los hisopos en placas de agar sangre y gelosa chocolate con 2 % de IsoVitalex y a estriar la superficie de las mismas con asas esterilizadas a la flama. Las incubaciones

correspondientes se llevaron a cabo a 35 - 37⁰ C, durante 48 h y bajo una tensión de 5 a 10 % de CO₂ -por el método de la vela-. Las colonias que sugerían la presencia del microorganismo -pequeñas, redondas, grisáceas, convexas y de bordes regulares- se propagaron en otra placa de gelosa chocolate con IsoVitaleX, con el objeto de obtener un desarrollo abundante que permitiera realizar frotis al Gram y las pruebas de identificación.

Identificación de *H. influenzae*

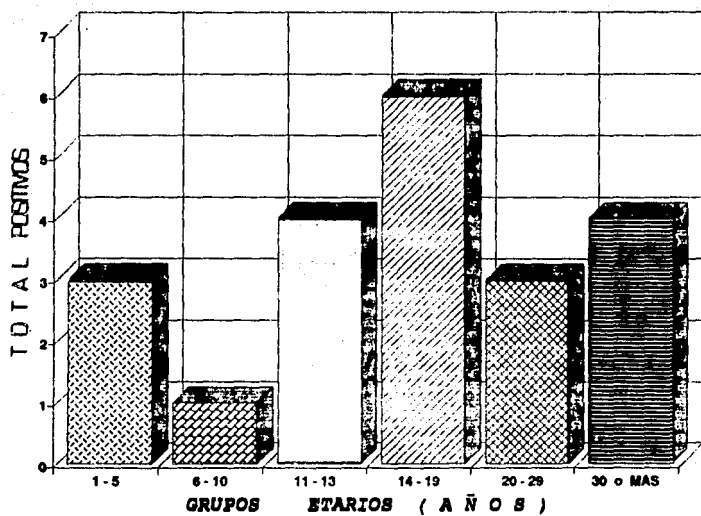
Una vez obtenidos los cultivos abundantes de las colonias cuya morfología sugería la presencia de *Haemophilus*, se llevaron a cabo frotis al Gram -para verificar pureza y observar si las características microscópicas coincidían con las del microorganismo- y las pruebas de requerimiento de los factores X y V para identificar a la especie. Posteriormente, las cepas identificadas como *H. influenzae* se sometieron a reacciones de coaglutinación con suero anti- b.

iii. Resultados

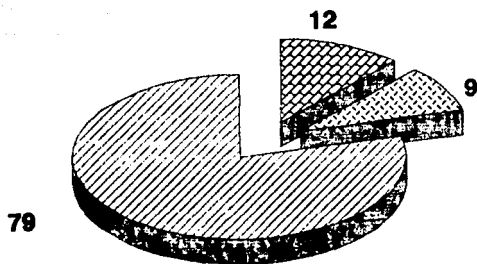
Como se puede observar en la tabla 5, *H. influenzae* se detectó en 21 de los 180 individuos sanos analizados, para una incidencia global de 11.6 %. Cabe subrayar que ninguna de las cepas aisladas pertenecía al serotipo b.

TABLA 5. RESULTADOS

| GRUPOS ETARIOS (AÑOS) | INDIVIDUOS MUESTREADOS | | | POSITIVOS | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|-----------|------------|-----------|-------------|----------|-----------|-----------|-------------|
| | F | M | TOTAL | F | % | M | % | T | %T |
| 1 - 5 | 15 | 15 | 30 | 2 | 13.3 | 1 | 6.6 | 3 | 10 |
| 6 - 10 | 15 | 15 | 30 | 0 | 0 | 1 | 6.6 | 1 | 3.3 |
| 11 - 13 | 15 | 15 | 30 | 3 | 20 | 1 | 6.6 | 4 | 13.3 |
| 14 - 19 | 15 | 15 | 30 | 2 | 13.3 | 4 | 26.6 | 6 | 20 |
| 20 - 29 | 15 | 15 | 30 | 2 | 13.3 | 1 | 6.6 | 3 | 10 |
| 30 O MAS | 15 | 15 | 30 | 3 | 20 | 1 | 6.6 | 4 | 13.3 |
| TOTAL | 90 | 90 | 180 | 12 | 13.3 | 9 | 10 | 21 | 11.6 |

R E S U L T A D O S

RESULTADOS



PORTADORES FEMENINOS



PORTADORES MASCULINOS



NO PORTADORES



En cuanto a los diferentes grupos etarios estudiados, esta especie se encontró con mayor frecuencia en el de 14 a 19 años (20 %), seguido por el de 11 a 13 y el de 30 o más (cada uno con 13.3 %), el de 1 a 5 y el de 20 a 29 (con 10 %) y, finalmente, el de 6 a 10 (con 3.3 %).

Por lo que respecta a los dos sexos, *H. influenzae* se detectó con mayor frecuencia en la mujer (13.3 %) que en el varón (10 %). En las primeras, los grupos etarios con más aislamientos fueron el de 11 a 13 y el de 30 años o más (3 de 15 en cada caso) mientras que, en los varones, fue el de 14 a 19 años (con 4 de 15). Sin embargo, dado que las muestras por edad/sexo no resultaron lo suficientemente numerosas, estos últimos datos no pueden considerarse representativos.

iv. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, puede afirmarse que, en la población estudiada, la frecuencia global de portadores faríngeos de *H. influenzae* (11.6 %) no difiere de las que se han reportado en otros países e implica que más del 80 % de los habitantes sanos de la Ciudad de México no presenta a este microorganismo en las vías respiratorias altas. Lo anterior sugiere que, cuando se aísla a *H. influenzae* en muestras patológicas provenientes de esta región anatómica, las posibilidades de que sea el generador o exacerbador del cuadro clínico son muy elevadas y, por lo tanto, que el

paciente debe recibir el tratamiento adecuado para erradicar al microorganismo. Por otra parte, la cifra obtenida -la cual es relativamente baja-, propone que el microorganismo es muy virulento, ya que la elevada frecuencia con la que ocasiona padecimientos respiratorios, oculares y óticos, contrasta con los bajos índices de portadores que lo pueden diseminar o transmitir al resto de los habitantes.

Por lo que se refiere a los diferentes grupos etarios analizados, no se aprecia una diferencia muy clara entre los índices encontrados en cada uno de ellos; sin embargo, se puede afirmar que existen niños de 1 a 10 años que son portadores faríngeos del microorganismo, y que éstos no sólo fungen como focos infecciosos en el hogar, las guarderías y las escuelas sino que, además, corren el riesgo de verse afectados por él en cuanto adquieran enfermedades respiratorias asociadas a otras etiologías.

Por otra parte, el hecho de que *H. influenzae* se haya detectado en personas de otras edades, obliga a pensar en otros focos infecciosos que también diseminan al microorganismo, lo cual obviamente adquiere mayor importancia cuando se trata de individuos que comparten vivienda con niños de 3 meses a 10 años.

En este sentido, cabe recordar que esta especie es la principal causante de meningitis infantil en nuestro medio y

que su vía de contagio es precisamente la aérea. No obstante, llama la atención el hecho de que ninguna de las cepas detectadas haya pertenecido al serotipo b. A este respecto, cabe mencionar que la cepa empleada como control positivo garantizó la eficacia del suero utilizado, descartando la posibilidad de falsos negativos. En consecuencia, se puede inferir que la mayor virulencia de este serotipo reduce notablemente la posibilidad de que el individuo al que coloniza no experimente patologías -como sucede en los portadores sanos- y, por lo tanto, que la transmisión de este microorganismo se encuentre restringida a los enfermos activos o convalescientes.

En cuanto al sexo de los portadores faríngeos de esta especie, en general, los índices resultaron un poco mayores en la mujer. Sin embargo, la baja incidencia global que se observó en los resultados no permite asegurar que exista una clara diferencia en relación al sexo de los portadores.

En resumen, es posible establecer que la frecuencia de portadores faríngeos de *H. influenzae* no es muy elevada ni discrimina a un determinado sexo o grupo etario.

1. La taxonomía asociada al género *Haemophilus* continúa representando un reto difícil de superar para los especialistas.

2. Dada su incuestionable relevancia en numerosas enfermedades, es necesario uniformar los patrones bioquímicos en los que se basa la identificación de *H. influenzae*.

3. Con respecto a los estudios epidemiológicos, la tipificación de *H. influenzae* debe contemplar el empleo de sueros anticapsulares. En el caso de que se trate de cepas "no tipificables" por este método, resultará conveniente aplicar la clasificación de Gratten -en tanto los especialistas logran ajustar la técnica que involucra a las OMP-.

4. En nuestro medio, la frecuencia de portadores faríngeos de *H. influenzae* es más reducida que la observada en otros países, independientemente de la edad y el sexo de las personas.

5. Es muy probable que la mayor virulencia de *H. influenzae* tipo b determine que, quienes lo adquieren, padezcan de afecciones y, por ende, no puedan convertirse en portadores sanos.

6. La transmisión del serotipo b parece estar restringida a los enfermos activos y convalescientes.

7. Al detectarse individuos afectados por *H. influenzae* no b, resultaría conveniente efectuar exudados faríngeos a las demás personas que comparten la vivienda, ya que es posible que se identifique al foco infeccioso -en cuyo caso el tratamiento no sólo involucraría al enfermo-.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdul A. R. and Schreiber J. R. : Neonatal *H. influenzae* type b sepsis, *Pediatr. Infect. Dis.*, 1990; 9: 918 - 921.
2. Albritton W. L.: Infections due to *Haemophilus* species other than *H. influenzae*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 1982; 36: 199- 216.
3. Arredondo J. L., Aguilar R. M.: Respuesta inmunitaria a infecciones por *Haemophilus influenzae*, *Infectología*, 1985; 5 (2): 39-43.
4. Arredondo J. L., Espinoza L. E, Zepeda H.: Infecciones por *Haemophilus influenzae*, problema actual en pediatría, *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 1987; 44 (12): 777- 785.
5. Berkow R., Talbott H. J.
THE MERCK MANUAL OF DIAGNOSIS AND THERAPY
Ed. Merck Sharp & Dohme, 6^a edición
E. U. A., 1987.
6. Boyd R. F. and Hoerl B. G:
BASIC MEDICAL MICROBIOLOGY
Litte Brown and Company
New York, 1977.

7. Buchanan R. E., Gibbons N. E.:
BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY
The Williams and Wilkins Company, 8th ed.
Batimore, 1984.
8. Cabrera R. C.: Vacuna contra *Haemophilus influenzae* :
perspectivas; *Infectología*, 1985; 5 (11): 300- 306.
9. Campbell N. N.: Respiratory tract infection and
anaesthesia, *Anaesthesia*, 1990; 45 (7): 561- 562.
10. Christensen J. J., Kirkegaard E. and Korner B.:
Haemophilus isolated from unusual anatomical sites,
Scan. J. Infect. Dis., 1990; 22: 437- 444.
11. Douglas L. H. and Overturf G. D.: Delayed
cerebrospinal fluid sterilization in infants with
Haemophilus influenzae type b meningitis, *J. Infect.*
Dis., 1989; 160 (4): 711- 715.
12. Finegold S. M. y Baron E. J.,
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO BAILEY/ SCOTT
Ed. Médica Panamericana, 7^a edición
Buenos Aires, 1989.

13. Garza R. V., Peniche E. Q.: Los tres principales agentes etiológicos de otitis media bacteriana, *Lab-acta*, 1990; 2/3: 39- 42.
14. Gilbert G. L., Clements D. A. and Broughton S. J.: *Haemophilus influenzae* type b infections in Victoria Australia, 1985 to 1987, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1990; 9 (4): 252- 257.
15. Gibert G. L.: Epidemiology and prevention of invasive *Haemophilus influenzae* type b infection, *Aus. Pediatr. J.*, 1987; 23: 323- 327.
16. Gough J., Kraak W. A. G., Anderson E. C., Nichols W. W., Slack M. P. E. and McGhie D.: Cross infection by non encapsulated *Haemophilus influenzae*, *Lancet*, 1990; 336 (8708): 159- 160.
17. Hay J. W. and Daum R. S.: Cost- benefit analysis of *Haemophilus influenzae* type b prevention: conjugate vaccination at eighteen months of age, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1990; 9 (4): 246- 251.

18. Howard B. J., Klaas J., Jo S.R., Weissfeld A.S. and
Tilton R. C.

CLINICAL AND PATHOGENIC MICROBIOLOGY

Mosby Company

St. Louis Missouri, 1987.

19. Isenberg H. D. and Painter B. G.: Indigenus pathogenic
microorganisms, in:

MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY

Lennette E. H., Balows A., Hausler W. J. and Truant J.P.

Ed. Médica Panamericana, 4^a ed.

Washington D. C., 1985.

20. Jawetz E., Melnick J. L., Adelberg E. A.

MICROBIOLOGIA MEDICA

Ed. Manual Moderno, 12^a edición

México, 1987.

21. Joklin W. K., Willett H. P., Amos D. B.

MICROBIOLOGIA ZINSSER

Ed. Médica Panamericana, 18^a edición

Buenos Aires, 1986.

22. Kayth H., Eskola J., Peltola H., Ronnberg P. R., Kela E., Karanko V., and Saarinen L.: Antibody responses to four *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines, *Am. J. Dis. Child*, 1991; 145 (2): 223- 226.
23. Kilian M.: *Haemophilus*, in:
MICROBIOLOGIA CLINICA
Braude A. I., Davis C. E. and Fierer J.
Ed. Médica Panamericana
Buenos Aires 1984.
24. Kilian M.: The genus *Haemophilus*, In:
The PROKARYOTES
Starr M. P., Stolp H., Truper H. G.; Vol II
Springel- Verlag
New York, 1981.
25. Koneman E., Allen S. D., Dowell V. R. and Sommers H. M.
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
Ed. Médica Panamericana
Buenos Aires, 1989.
26. Kristensen K., Kaaber K., Ronne T., Olesen S. L. and
Henrichsen J.: Epidemiology of *Haemophilus influenzae*
type b infections among children in Denmark in 1985 and
1986, *Act. Paediatr. Scand.*, 1990; 79 (6-7): 587- 592.

ESTA TESTE NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

27. Makintubee S., Istre G. R. and Ward J. I.: Transmission of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in day care settings, *J. Pediatr.*, 1987; 111 (2): 180- 186.
28. Mc. Graw T. P. and Bruckner D. A.: Sensivity of commercial agglutination and counterimmunoelectrophoresis methods for the detection of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide, *Am. J.Clin. Pathol.*, 1983; 80 (5):703- 706.
29. Moeser P. J., Costello P. B., Gillikin S. and Murphy T. F.: *Haemophilus influenzae* polyarthritits in an adult: an analysis of serotype b strains, *Rev. Infect. Dis.*, 1991; 13: 61- 63.
30. Moxon E. R., Rappuoli R.: Modern vaccines, *Haemophilus influenzae* infections and whooping cough, *Lancet*, 1990; 335 (8701): 1324- 1329.
31. Munson R. S., Kabeer M. H., Lenoir A. A. and Granoff D. M.: Epidemiology and prospects for prevention of disease due to *Haemophilus influenzae* in developing countries, *Rev. Infect. Dis.*, 1989; 2 Suppl 3: S588- 597.
32. Murphy P. G., Craig I., Smyth E. T. M.: Evaluation of two rapid methods for identifying and biotyping *Haemophilus influenzae*, *J. Clin. Pathol.*, 1990; 43 (7): 581- 583.

33. Murphy T. V., Clements J. F., Petroni M., Coury S. and Stetler L.: *Haemophilus influenzae* type b in respiratory secretions, *Pediatr. Infect. Dis.*, 1989; 8 (3): 148 - 151.
34. Round A.: *Haemophilus influenzae* type b infections in adults, *Thorax*, 1989; 44 (4): 313.
35. Schwartz R. H. and Rodriguez W. J.: *Haemophilus* species in the pharynx, *Arch. Otolaryngol.*, 1984; 110: 676- 678.
36. Slater L. N., Guarnaccia J., Makitubee S. and Istre G. R.: Bacteremic disease due to *H. influenzae* capsular type f in adults: report five cases and review, *Rev. Infect. Dis.*, 1990; 12 (4): 628- 635.
37. Sosa E. G. I.: Superficies microbianas de *H. influenzae* en relación con la patogenicidad, primera parte, *Infectología*, 1987; 7 (9): 435- 442.
38. Sosa E. G. I.: Superficies microbianas de *Haemophilus influenzae* en relación con la patogenicidad, segunda parte, *Infectología*, 1987; 7 (10): 481- 487.
39. Spinola S. M., Peacock J., Denny F. W., Smith D. L. and Cannon J. G.: Epidemiology of colonization by nontypable *H. influenzae* in children: a longitudinal study, *J. Infect. Dis.*, 1986; 154 (1): 100- 109.

40. Stephens D. S. and Farley M. M.: Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *H. influenzae*, Rev. Infect. Dis., 1991; 13: 22- 33.
41. Trottier S., Stenberg K. and Svanborg- eden C.: Turnover of nontypable *H. influenzae* in the nasopharynges of healthy children, J. Clin. Microbiol., 1989; 27 (10): 2175- 2179.
42. Turk D. C.: The pathogenicity of *H. influenzae*, J. Med. Microbiol., 1984; 18 (1): 1- 16.
43. Tuyau J. E. and Sims W.: Aspects of the pathogenicity of some oral and other *Haemophili*, J. Med. Microb., 1983; 16 (4): 467- 477.
44. Vella P. P. and Ellis R. W.: Immunogenicity of *H. influenzae* type b conjugate vaccines in infant rhesus monkeys, Ped. Reserch, 1991; 29 (1): 10- 12.
45. Von Rosen I. A., Gothefors L., Schmeisser S., Tärnvik A. and Svanborg C. E.: Outbreak of *H. influenzae* type b meningitis in a day care center, Pediatr. Infect. Dis. J., 1990; 9 (5): 326- 332.

46. Wald E. R.: *H. influenzae* as a cause of acute otitis media, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1989; 8: S28- S30.

47. Zaki M., Daould A. S., Elsaleh Q. and West P. W. J.: Childhood bacterial meningitis in Kuwait, *J. Trop. Med. Hyg.*, 1990; 93: 7- 11.