



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *Haemophilus influenzae* DE
NIÑOS MEXICANOS A NIVEL CAPSULAR POR PCR."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A

ALBERTO ALFARO LÓPEZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. PATRICIA GÓMEZ DE LEÓN CRUCES

2006



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.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:
" Genotipificación de cepas de Haemophilus influenzae de niños mexicanos
a nivel capsular por PCR. "

realizado por Alberto Alfaro López

con número de cuenta 096043853 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)
Propietario Dra. Patricia Gómez de León Cruces

Propietario M. C José Ignacio Santos Preciado

Propietario Dra. Irma Aurora Rosas Pérez

Suplente M. en C. Francisco Javier Díaz García

Suplente M. en C. María Eva Salinas Cortés

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 10 de Noviembre del 2006.
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA

Dr. Zenón Cano Santaha

FACULTAD DE CIENCIAS



“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”



**¡Oh! Universidad,
escucha con qué ardor
entonan hoy tus hijos
este himno en tu honor.**

**Al darte la victoria
honramos tus laureles
conservando tu historia
que es toda tradición.
Unidos venceremos
y el triunfo alcanzaremos
luchando con tesón
por tí, Universidad.**

**Universitarios,
icemos siempre airoso
el pendón victorioso
de la Universidad;
por su azul y oro,
luchemos sin cesar,
cubriendo así de gloria
su nombre inmortal.**



¡MÉXICO, PUMAS, UNIVERSIDAD!!

**EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE ESTA TESIS SE
LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE
PATOGENICIDAD Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA
TORRE DE INVESTIGACIÓN, FACULTAD DE MEDICINA,
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

D E D I C A T O R I A :

A MI MADRE:

ISABEL LÓPEZ TIERRABLANCA

DE NO HABER SIDO POR TUS DESVELOS, COMPRENSIÓN E INCONDICIONAL APOYO, CARIÑO, AMOR Y LA VALIOSA CONFIANZA EN MI DESTINO, JAMAS HABRIA LLEGADO A ESTA META, LA CUAL CONSTITUYE LA HERENCIA MÁS VALIOSA QUE PUDIERA RECIBIR, POR ESO CON GRATITUD PERMANENTE, EMOCIÓN Y RESPETO. HOY TE DIGO: HE CUMPLIDO, INICIO EL CAMINO. DE HOY EN ADELANTE LA RESPONSABILIDAD ES MIA.

A MIS QUERIDOS HERMANOS:

JUAN HECTOR, JOSÉ ROGELIO Y FERNANDO.

POR TODOS LOS MOMENTOS GRATOS QUE HEMOS PASADO, POR HABER COMPARTIDO MIS ALEGRÍAS Y TRISTEZAS. CON MI AMOR DE SIEMPRE Y AUNQUE HOY SEA YO QUIEN LLEGA A ESTE MOMENTO EL TRIUNFO ES DE TODOS, YA QUE SIN USTEDES ESTE ÉXITO NO TENDRÍA SENTIDO.

A MI NOVIA POR SU PACIENCIA Y AMOR, POR TANTOS MOMENTOS FELICES QUE HEMOS PASADO, POR LA MOTIVACIÓN Y CARIÑO QUE ME HA BRINDADO.

MARÍA DE LA LUZ.

ATODOS MIS AMIGOS QUE ME APOYARON.

A MI UNIVERSIDAD:

POR SU GRANDEZA, POR SU AZUL Y ORO, POR SU ENSORDECEDORA GOOOOYA... . MI ETERNA GRATITUD, LEALTAD Y AMOR.

G R A C I A S

A G R A D E C I M I E N T O S

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ EVALUADOR DE ESTA TESIS:

LA DRA. PATRICIA GÓMEZ DE LEÓN CRUCES, AGRADEZCO EL APOYO BRINDADO EN LA DIRECCIÓN Y ELABORACIÓN DE ESTA TESIS; PERO SOBRE TODO SUS INVALUABLES CONSEJOS Y SU INCONDICIONAL APOYO PARA QUE YO PUDIERA LOGRAR UNA META MÁS EN MI FORMACIÓN ACADÉMICA.

EL M.C. JOSÉ IGNACIO SANTOS PRECIADO, AGRADEZCO EL APOYO BRINDADO POR SUS COMENTARIOS VALIOSOS Y SUGERENCIAS EN LA REVISIÓN DEL MANUSCRITO.

AL M EN C. FRANCISCO JAVIER DÍAZ GARCÍA, TODO MI AGRADECIMIENTO POR EL APOYO Y DEDICACIÓN QUE ME BRINDO EN EL DESARROLLO DE LA PARTE EXPERIMENTAL, ASÍ MISMO POR SUS SUGERENCIAS PARA ALGUNOS SEGMENTOS DE LA TESIS. Y MUY EN ESPECIAL POR SU SINCERA AMISTAD.

A LA DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ; AGRADEZCO SUS VALIOSOS COMENTARIOS QUE ME BRINDO PARA LA REVISIÓN DE ESTA TESIS.

Y A LA M EN C. MARÍA EVA SALINAS CORTÉS, POR SUS OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS EN LA REVISIÓN DE ESTA TESIS.

A G R A D E C I M I E N T O S

AL DR. JUAN JOSÉ GARCÍA POR EL APOYO TÉCNICO EN EL MANEJO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS Y POR SUS COMENTARIOS.

A LA DRA. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA, ACADÉMICA DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS CICM., DE LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA BUAP, AL DR. ALBERTO VILLASEÑOR SIERRA, DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN DEL CENTRO MÉDICO DE OCCIDENTE EN JALISCO CMO, IMSS Y AL DR. JOSÉ LUIS ARREDONDO SUBDIRECTOR DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA INPed, Ssa, DE LA CIUDAD DE MÉXICO, POR LA DONACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO DEL ESTUDIO.

A LA DRA. ESPERANZA PÉREZ GALVÁN, ACADÉMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNAM. QUE MUY GENTILMENTE OTORGÓ LAS CEPAS DE REFERENCIA.

A EL ACTUARIO MAURICIO ÁGUILAR GONZÁLEZ JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LICENCIATURA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, POR EL APOYO BRINDADO EN LOS TRAMITES ESCOLARES.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA FORMA INFLUYERON EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

A T O D O S G R A C I A S

ÍNDICE

	Pag.
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades	2
Importancia clínica y epidemiológica	4
Prevención mediante la introducción de vacunas	7
Efecto de la vacuna conjugada sobre la prevalencia de <i>H. influenzae</i> b	9
Sistemas de caracterización para la identificación de <i>H. influenzae</i>	13
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
Población de estudio y material biológico	23
Serología por aglutinación en placa (SAP)	25
Extracción del ADN cromosómico	25
Determinación de la concentración de ADN por el método Fluorométrico	27
PCRs para el gen <i>bexA</i> y cápsula tipo-específico a, b, c, d, e y f	27
Electroforesis en gel de agarosa al 2%	30
Análisis de sensibilidad y especificidad	30
Distribución de frecuencias y análisis estadístico	31

RESULTADOS	32
Caracterización de las cepas por serología	32
Genotipificación capsular por PCR	32
Correlación entre los resultados por SAP y PCR para tipificación capsular	36
Análisis de grupos de portadores y de casos entre cepas pre-vacunales y post-vacunales	37
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	47
CONSIDERACIONES RELEVANTES Y PERSPECTIVAS	48
REFERENCIAS	50
ANEXO 1	58
ANEXO 2	61

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	Pag.
Fig. 1.- Morfología microscópica de <i>H. influenzae</i>	3
Fig. 2.- Estructura y composición diferencial del polisacárido capsular de <i>H. influenzae</i> (serotipos a-f)	14
Fig. 3.- El locus <i>cap</i> en <i>H. influenzae b</i>	16
Fig. 4.- <i>Cap</i> como elemento transposon	17
Fig. 5.- Esquema general de trabajo	22
Fig. 6.- Amplificación del gen <i>bexA</i> de <i>H. influenzae</i>	33
Fig. 7.- Amplificación de cápsula tipo-específico a	34
Fig. 8.- Amplificación de cápsula tipo-específico b	34
Fig. 9.- Amplificación de cápsula tipo-específico e	35
Fig. 10.- Amplificación de cápsula tipo-específico f	35
Cuadro. 1.- Cepas de referencia para <i>H. influenzae</i>	24
Cuadro. 2.- Iniciadores para el gen <i>bexA</i> e iniciadores cápsula tipo-específico (a-f)	29
Cuadro. 3.- Distribución de serotipos de <i>H. influenzae</i> por el método de SAP	32
Cuadro. 4.- Correlación entre los resultados de tipificación capsular de las 111 cepas de <i>H. influenzae</i> por el método de SAP y PCR	36
Cuadro. 5.- Distribución de frecuencias de cepas capsuladas y no capsuladas entre los grupos de portadores y casos para población pre-vaunal y post-vacunal	39

RESUMEN

En México se ha implementado un programa de prevención y control mediante la aplicación de la vacuna conjugada PRP-T de *Haemophilus influenzae* b, desde 1999. En nuestro país la información sobre la prevalencia de serotipos antes y después de la introducción de la vacuna es escasa. Tradicionalmente la determinación de serotipos capsulares de *H. influenzae* se realiza por aglutinación en placa (SAP). Sin embargo, se han informado inconsistencias entre resultados obtenidos por SAP en diferentes laboratorios. La genotipificación capsular por PCR desarrollada por Falla y cols. en 1994, es el método más eficaz para distinguir entre cepas capsuladas y no capsuladas. Se estudiaron 111 cepas de *H. influenzae* recuperadas de niños Mexicanos vacunados y no vacunados, de las cuales, 73 fueron de portadores y 38 de casos. Se determinó el serotipo por el método de SAP y el genotipo por el de PCR y se correlacionaron los resultados obtenidos por ambos métodos. Se realizó un análisis de grupos de portadores y de casos entre cepas pre-vacunales y post-vacunales. Mediante SAP se determinó que HiNT se presentó con frecuencia del 64%, mientras que el 36% fueron capsuladas, de éstas, el serotipo b fue el más frecuente con 22 aislados. Mediante PCR el 40.5% (45/111) fueron capsuladas, de las cuales, 23 fueron tipo f, 18 b, 3 a, y 1 e. De las 66 cepas no tipificables ninguna fue b⁻. La discrepancia entre ambos métodos fue del 11.7%. Las cepas NT se presentaron mayoritariamente entre portadores de las poblaciones pre y post-vacunal con el 33.3% y el 59.2%, respectivamente. Seis cepas capsuladas de Hif (10.6%) y 2 de Hib (3.5%) se distribuyeron entre portadores pre-vacunales. En el grupo de portadores de la población post-vacunal se observó un patrón diferente, las cepas con cápsula estuvieron representadas por los tipos a, e y f, con frecuencias de 3.7%, 1.9% y 20.4%, respectivamente. Se observó un ligero decremento entre las cepas b de casos cuando se contrastó la población pre-vacunal (10/57) con la post-vacunal (6/54). Las cepas patógenas NT se distribuyeron preferencialmente entre pre-vacunales con frecuencia de 24.6%. La disminución del serotipo b sugiere que la vacunación ha presentado efecto favorable en términos de respuesta inmunológica en la población infantil mexicana.

INTRODUCCIÓN

El género *Haemophilus*, representado por varias especies de importancia médica, está clasificado dentro de la familia *Pasteurellaceae* del orden de las *Eubacteriales*, la cual incluye otros dos géneros, *Actinobacillus* y *Pasteurella*, se asocian en raras ocasiones como patógenos y principalmente son responsables de infecciones oportunistas. Los miembros del género *Haemophilus* constituyen parte de la biota normal de las membranas mucosas del tracto respiratorio de humanos y de ciertas especies animales, en particular las cepas de *H. influenzae* cohabitan como comensales o parásitas del hombre (Murray et al., 2002)

La especie prototipo *Haemophilus influenzae* (Pfeiffer, 1892) es uno de los principales agentes causales de una amplia variedad de enfermedades en humanos, particularmente entre la población infantil. Durante una epidemia de influenza, Pfeiffer encontró a la bacteria en muestras de esputo de pacientes y propuso una asociación causal entre ésta y el síndrome clínico conocido como influenza. El nombre de *Haemophilus* fue asignado por Winslow et al., en 1920; y no fue sino 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).

Posteriormente se reconoció la patología de este organismo y hoy en día se sabe que *H. influenzae* es causa de infecciones a menudo graves. El espectro de padecimientos incluye tanto infecciones de vías respiratorias altas y bajas

(localizadas o superficiales), como de infecciones sistémicas (diseminación vía sistema circulatorio). *H. influenzae* es causa de tasas altas de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años, así como de secuelas neurológicas permanentes resultantes del proceso infeccioso (Granoff y Munson, 1986; Munson et al., 1989).

En 1931, Margaret Pittman publicó un trabajo en el que mostró mediante serología que *H. influenzae* podía presentarse de forma capsulada y/o no capsulada. Entre las cepas capsuladas identificó seis serotipos distintos designándolos con las letras **a, b, c, d, e, y f** de acuerdo con el constituyente de su polisacárido capsular (Pittman, 1931; Kilian, 1991; Gómez de León, 2001). Las cepas que carecen de cápsula son denominadas no tipificables (HiNT).

Generalidades.

ESTRUCTURA Y FISIOLÓGÍA

H. influenzae es una bacteria gram negativa, pequeña con morfología de coccobacilo (figura 1), inmóvil, no esporulada, anaeróbica facultativa que muestra un marcado pleomorfismo, especialmente en especímenes aislados de procesos patológicos. Presenta pruebas de indol, ornitina descarboxilasa y ureasa positivas, y la reacción de catalasa es variable (Campos, 1999).

Este microorganismo requiere para su desarrollo de los factores X (hemina o hematina), y V (NAD dinucleótido de adenina y nicotinamida), ambos factores presentes en la sangre. Existen otros factores nutricionales que estimulan el

crecimiento de *H. influenzae*, tales como ácido pantoténico, tiamina, uracilo, purina y cisteína (Wilson y Miles, 1975; Koneman et al., 1997). Dadas las características nutricionales que presenta *H. influenzae*, el requerimiento para su crecimiento *in vitro* debe incluir medios de cultivo selectivos y/o enriquecidos con los factores X y V (gelosa fildes, gelosa levintal, gelosa chocolate, gelosa sangre de caballo o de conejo y gelosa hemina bacitracina extracto de levadura), que promuevan su crecimiento, en detrimento del resto de la biota habitual del sitio donde se esta intentando su recuperación; además de un ambiente húmedo que contenga 5% de dióxido de carbono a una temperatura de 37°C (Sosa-Iglesias et al., 1992).

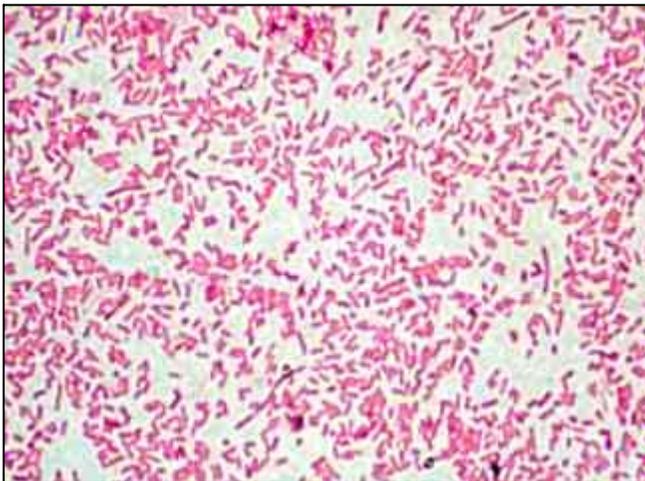


Figura 1. Morfología microscópica de *Haemophilus influenzae*, cocobacilos y bacilos cortos gram negativos con marcado pleomorfismo.

FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD

La superficie de muchas de las cepas de *H. influenzae* esta cubierta por una cápsula de polisacárido antifagocítica; además de ésta, existen otras estructuras superficiales tales como pilis, proteínas de membrana externa (PME) importantes en investigaciones epidemiológicas, lipopolisacáridos (LPS) con actividad de

endotoxina presentes en su membrana externa, y 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). Recientemente, en cepas no capsuladas se ha reconocido la habilidad de formar biofilms (tapete bacteriano envuelto en una matriz polimérica, adherente), dicha estructura es resistente a mecanismos de inmunidad y a antibióticos. Durante la década pasada se asoció la capacidad de producir biofilms con la de causar distintos tipos de infecciones en humanos (Murphy y Kirkham, 2002). Un aspecto importante además de causar daño mediante mecanismos de patogenicidad, radica en la constante emergencia de cepas resistentes a antibióticos. En 1977, se describió por primera vez la producción por parte de esta bacteria, de β -lactamasas (enzimas involucradas en la resistencia a ampicilina), la detección de estas enzimas es de gran importancia para la implementación de un tratamiento más adecuado (Wenger y Ward, 2004).

Importancia Clínica y Epidemiológica.

A partir de las observaciones pioneras de Pittman a principio de los años 1930s, y de los estudios realizados por diversos investigadores en los últimos 60 años, se ha confirmado la importancia del microorganismo en gran variedad de procesos infecciosos que se presentan principalmente en la edad pediátrica.

H. influenzae es causa importante de enfermedades sistémicas e infecciones respiratorias que afectan a niños. Dada su incidencia cobran mayor importancia en países en desarrollo, incluyendo a México (Gómez de León-Cruces y Cabrera-Contreras, 1992; Villaseñor-Sierra et al., 1996). *H. influenzae* del serotipo b (Hib), es el principal agente etiológico de meningitis bacteriana endémica en población infantil. El serotipo b, además de causar meningitis, es agente causal de otras enfermedades sistémicas en humanos, particularmente entre niños menores de cinco años tales como: neumonía bacteriémica, epiglotitis, septicemia, celulitis e infecciones osteoarticulares (Pittman, 1931; Robbins et al., 1996; Tang et al., 2001). Más del 90% de las enfermedades sistémicas por *H. influenzae* son causadas por las cepas con cápsula b (WHO, 2000). De estas entidades la meningitis es la más importante por su elevada morbiletalidad en niños menores, además de causar secuelas neurológicas graves (ceguera, sordera, parálisis, retraso mental, niveles de coeficiente intelectual bajos, así como problemas de conducta y del desarrollo) (Munson et al., 1989; Gómez de León et al., 1991; Carlone et al., 2002).

Las cepas de *H. influenzae* no tipificables, están a menudo involucradas en enfermedades agudas asociadas a sitios contiguos del tracto respiratorio, entre las que se incluyen: otitis media, sinusitis, conjuntivitis, bronquitis crónica pulmonar obstructiva, fibrosis quística, neumonía, y alveolitis entre otras (Murphy y Apicella, 1987). Además, durante las últimas décadas se ha confirmado que *H. influenzae* no tipificable es también causa de manifestaciones clínicas sistémicas como meningitis, que afectan tanto a niños como a personas inmunocomprometidas y a

adultos bajo ciertas condiciones clínicas (Bisgard et al., 1998; Gómez de León, 2001; Erwin et al., 2005).

La relevancia de *H. influenzae* tipo b como problema de salud pública estriba en la existencia del estado de portador asintomático, favoreciendo la transmisión bacteriana mediante gotas de saliva “flügge” a niños susceptibles, primordialmente en población cerrada (guarderías, orfanatorios y salas de lactantes en hospitales) donde existe una estrecha convivencia, reuniéndose así las condiciones óptimas para su transmisión (Villaseñor-Sierra et al., 1996; Montesano et al., 1997).

Cifras previas a la introducción de la vacuna a nivel mundial de *H. influenzae* b, indican que este microorganismo fue la principal causa de meningitis bacteriana y de otras enfermedades sistémicas entre niños menores de cinco años de edad. Aproximadamente 1 de cada 200 niños en este grupo de edad en la era pre-vacunal, desarrolló enfermedad sistémica por *H. influenzae* b con mayor incidencia entre los 6 y 12 meses (Peltola, 2000; Gómez de León, 2001). En Estados Unidos la incidencia anual estimada para meningitis fue de 50 a 60/100,000 habitantes (aproximadamente 20,000 casos) antes de la disponibilidad de las vacunas. Esta incidencia fue dos veces mayor que en países europeos (23/100,000). La tasa de incidencia en Europa fue cercana a la evidenciada en gran parte de Sudamérica, en Asia y en Oceanía (Peltola, 2000).

En México no se dispone de información precisa sobre la tasa de morbilidad por enfermedades producidas por *H. influenzae* antes de la liberación del

inmunógeno protector; sin embargo, existen informes que indican que diferentes entidades clínicas de *H. influenzae* fueron elevadas y por ende equiparables con las de poblaciones infantiles de otros países no desarrollados en los que tampoco se había introducido la vacuna (Sosa-Iglesias et al., 1998). Datos sobre la frecuencia de casos de meningitis bacteriana en niños menores de cinco años hospitalizados en el Distrito Federal y en la Ciudad de Puebla, indican que *H. influenzae* b se presentó con frecuencias de entre el 30% y el 45% en relación con otros agentes etiológicos bacterianos (Gómez de León et al., 1991; Sosa-Iglesias et al., 1992; Sosa-Iglesias et al., 1995).

Prevención Mediante la Introducción de Vacunas.

La vacunación, para la prevención de las enfermedades por *H. influenzae* b, comenzó en países industrializados a principio de los años 1970s (Robbins et al., 1986). Una vacuna constituida por el polisacárido capsular purificado (PRP polirribosil ribitol fosfato), principal determinante de virulencia y patogenicidad de este organismo, mostró en un ensayo clínico realizado en Finlandia eficacia del 90% entre niños de 18 a 71 meses de edad, pero no en lactantes. Resultados similares se evidenciaron en un estudio llevado a cabo en Estados Unidos y Canadá en el mismo periodo; sin embargo, en todos los casos se observó que la respuesta de anticuerpos séricos dirigida hacia el antígeno capsular b no confirió protección alguna en niños menores de 18 meses de edad, por lo que probó ser un inmunógeno pobre, además de no tener efecto en el estado de portador (Peltola, 2000). Por tal motivo, surgió la necesidad de desarrollar nuevas vacunas

contra este microorganismo para ampliar la respuesta inmune principalmente en niños menores de 18 meses, que constituyen el grupo de mayor riesgo para adquirir enfermedades sistémicas por *H. influenzae* b (WHO, 2000; Peltola, 2000; Wenger y Ward, 2004). Se diseñó una vacuna conjugada que consiste del polisacárido PRP acoplado químicamente a una proteína acarreadora: el toxoide tetánico (PRP-T). Su eficacia es resultante de respuestas timo dependientes, lo que induce una respuesta de memoria (Macías et al., 1996; Kelly et al., 2004). Ésta, se incorporó a los programas de vacunación infantil en algunos países europeos a partir de 1989 y en los Estados Unidos desde 1990 (Bisgard et al., 1998; Gómez de León, 2001). En México la introducción del biológico conjugado anti-Hib, se realizó en el año 1999 con un esquema de tres dosis (2, 4 y 6 meses), como parte del Programa Nacional de Vacunación (Gómez de León, 2001).

Con el uso de vacunas conjugadas, la incidencia de enfermedades sistémicas por *H. influenzae* b ha declinado dramáticamente, aunque fallas en la vacuna han sido detectadas sobre todo en términos de protección a largo plazo (Campos et al., 2004; Kelly et al., 2004; Cruces et al., 2006). Trabajos recientes confirman que el uso de esta vacuna se ha usado con eficacia en términos epidemiológicos, logrando con esquema de tres dosis protección superior al 90% contra infecciones sistémicas (Bisgard et al., 1998; Peltola, 2000; Gómez de León, 2001). En Estados Unidos de América hubo una reducción de 20,000 casos en 1987 a 227 para el 2000 (Romero-Steiner et al., 2004).

Existe poca información acerca de la epidemiología de *H. influenzae* b en la era post-vacunal en países poco industrializados. En particular en nuestro país la información acerca de la epidemiología de *H. influenzae* b después de la vacuna es nula. A pesar de la carencia de información en países en desarrollo, es posible que este patrón de disminución en las poblaciones de *H. influenzae* b sea similar a lo observado para países industrializados (Macías et al., 1996; Cruces et al., 2006). Sin embargo, en el concierto mundial, este microorganismo es aún causa de más de 2 millones de casos de enfermedad sistémica y es responsable de la muerte de 300,000 a 400,000 niños al año, las que ocurren principalmente en países que carecen de un calendario de vacunación adecuado (Peltola, 2000; Cruces et al., 2006).

Efecto de la Vacuna Conjugada sobre la Prevalencia de *H. influenzae* b.

Si bien la vacuna PRP-T representa un avance importante para el control de las enfermedades producidas por cepas de *H. influenzae* capsuladas b, no es de esperarse protección alguna en contra de cepas no tipificables ni hacia otros tipos capsulares (Bisgard et al., 1998; Erwin et al., 2005).

Estudios realizados por Barbour en 1996, evidenciaron que mediante la aplicación de la vacuna conjugada PRP-T, los eventos de transmisión se ven afectados y disminuidos dando lugar a la reducción de la tasa del estado de portador de la bacteria blanco. De hecho, en algunos países en los que se incluye esta medida de prevención, la protección parece extenderse a niños no vacunados

mediante inmunidad heredada. Este fenómeno ha sido atribuido parcialmente a ese tipo de inmunidad; aunque, diferentes aspectos moleculares sobre la bacteria y su relación compleja con el hospedero aún se desconocen (Barbour, 1996).

Con la eliminación virtual de las infecciones sistémicas por *H. influenzae* b y la reducción del estado de portador a partir del uso de la vacuna conjugada (Kelly et al., 2004), se ha especulado sobre la posibilidad de reemplazo del serotipo b por otros serotipos o por cepas no tipificables. Debido a que la protección conferida por la vacuna conjugada PRP-T, es específica hacia al serotipo capsular b incluido en la vacuna, algunos investigadores han sugerido que la reducción de portadores de este serotipo, pudiera dar lugar a espacios abiertos (nichos ecológicos) que pudieran ser ocupados por otros serotipos o por cepas no tipificables no incluidas en la vacuna, y emerger como importantes patógenos de niños (Booy y Kroll, 1997; Gómez de León, 2001). Además no debe excluirse un posible incremento en la incidencia de enfermedades sistémicas por otras bacterias nasofaríngeas (Booy y Kroll, 1997).

En teoría, la reducción en la tasa de infecciones por *H. influenzae* b podría dar lugar a interacciones biológicas (intraespecíficas e interespecíficas), provocando un eventual incremento en las enfermedades sistémicas por cepas no incluidas en la vacuna (Campos et al., 2004; Kapogiannis et al., 2005). Además, se ha postulado que el uso extensivo de la vacuna podría dar lugar al aumento de infecciones sistémicas, ocasionadas por mutantes espontáneas deficientes en

cápsula del serotipo b (cepas b⁻), dado que estas cepas tampoco son susceptibles a anticuerpos inducidos por la vacuna (Cerquetti et al., 2000).

Datos obtenidos de países industrializados en los últimos 15 años, muestran que algunos casos de enfermedades sistémicas por *H. influenzae* han estado asociados con cepas no tipificables y otros serotipos capsulares (c, d y principalmente a, e y f) (LaClaire et al., 2003; Kapogiannis et al., 2005). Sin embargo, hasta ahora, la vigilancia epidemiológica en países tales como: Estados Unidos, Gran Bretaña y Suiza no ha mostrado incremento significativo en infecciones de niños por otros serotipos ó cepas no tipificables (Adderson et al., 2001).

Uno de los primeros casos bien documentados sobre cepas no b invasivas (HiNT) en niños, fue informado en 1996 por Nizet et al. La cepa causal mostró poseer determinantes de virulencia, que no se encuentran entre cepas asociadas con enfermedades no invasivas ni de portadores asintomáticos (Erwin et al., 2005); lo anterior ha permitido a varios autores concluir que *H. influenzae* tiene amplias oportunidades de variar su genoma, lo que le confiere la posibilidad de causar infecciones sistémicas (Selander y Musser, 1990; Moxon et al., 1994). Se han generado varias publicaciones que describen casos adicionales sobre el incremento en la incidencia de enfermedades debidas a cepas no b (Booy y Kroll, 1997); no obstante cualquier incremento es menospreciable si se compara con el beneficio obtenido en la reducción de enfermedades por el serotipo b en la era de la vacuna (Gómez de León, 2001).

La incidencia y la distribución de la enfermedad por *H. influenzae* b varía considerablemente entre países. En general la incidencia es baja en países industrializados y alta en aquellos en vías de desarrollo (Sosa-Iglesias et al., 1992; Sosa-Iglesias et al., 1998; Peltola, 2000). Se ha señalado que en los primeros, las cifras bajas de reemplazo de serotipos después del uso de la vacunación ampliada con PRP-T, pudieran ser el resultado de un estado de portador pre-vacunal reducido de *H. influenzae* b (Barbour, 1996).

Si la interpretación anterior es correcta, el reemplazo de serotipos, podría mas bien ocurrir en regiones en las que la prevalencia de *H. influenzae* b fuera mayor como en México. Si bien el beneficio obtenido por el uso de la vacuna conjugada PRP-T se basa en la reducción de la tasa de portador del serotipo b, la posibilidad de reemplazo en comunidades como la nuestra (con mayor prevalencia) podría representar una ventaja adicional. Esta reflexión se basa en las siguientes consideraciones: se ha propuesto que los incrementos en la prevalencia de los serotipos no incluidos en la vacuna, inducen competitivamente una reducción en la prevalencia del serotipo b vacunal, entonces mediante el reemplazo (medido como un incremento en la tasa de portador de las cepas no vacunales), se reducen las posibilidades de reexposición de todos los miembros de una comunidad al serotipo b (Barbour et al., 1996; Gómez de León, 2001).

Si bien la probable eliminación de enfermedades por *H. influenzae* b es alentadora, no significa el fin de *H. influenzae* como patógeno. La evaluación, vigilancia y estudio seroepidemiológico de los cambios en las asociaciones de

serotipos causales de enfermedad sistémica, deben ser objeto de investigaciones tendientes a determinar la importancia creciente de un nuevo ambiente eco-epidemiológico, dada la dinámica poblacional que puede presentarse después de la medida inmunoprofiláctica.

Sistemas de Caracterización para la Identificación de *H. influenzae*.

En el contexto anterior surge la necesidad de identificar rápida y eficazmente las cepas capsuladas de *H. influenzae*, las cuales expresan uno de los seis polisacáridos capsulares antigénicamente distintos (Figura 2). La síntesis, la elaboración y el depósito en la superficie bacteriana del polisacárido capsular son factores importantes para la patogénesis de *H. influenzae* (Moxon y Kroll, 1988). Sólo un pequeño porcentaje de cepas aisladas del tracto respiratorio de portadores posee polisacárido capsular, la mayoría son cepas no tipificables. La presencia de cápsula puede detectarse a la observación de colonias crecidas en gelosa de algún medio transparente por ser translúcidas e iridiscentes.

A nivel bioquímico, la inmunotipificación y los estudios estructurales se han empleado para distinguir la estructura capsular (Tang et al., 2001). En este sentido, en 1976, Kilian describió un método que permite diferenciar cepas de *H. influenzae*, dada su capacidad de sintetizar las enzimas ornitina descarboxilasa, ureasa y triptofanasa; que permiten identificar 8 biotipos: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII. Esta clasificación ha permitido establecer una correlación entre el biotipo y la patogénesis del microorganismo, como es el caso de *H. influenzae* b biotipo I, que se relaciona con meningitis; o cepas de HiNT del biotipo IV relacionadas con

sepsis neonatal. Si bien existe una relación entre el tipo capsular y alguno de los biotipos (Fusté et al., 1996), algunos autores han referido discrepancias acerca de dicha relación (Sosa-Iglesias et al., 1998; Koneman et al., 1997).

Tradicionalmente, la determinación de serotipos capsulares de cepas de *H. influenzae* se realiza por aglutinación en placa, prueba que se basa en reacciones antígeno-anticuerpo para la identificación serológica de cepas capsuladas y no capsuladas. Sin embargo, inconsistencias observadas en resultados obtenidos de diversos laboratorios han mostrado que esta técnica ofrece errores en sus resultados (Shively et al., 1981; LaClaire et al., 2003). De ahí la necesidad de contar con un método inequívoco para la tipificación capsular de *H. influenzae*.

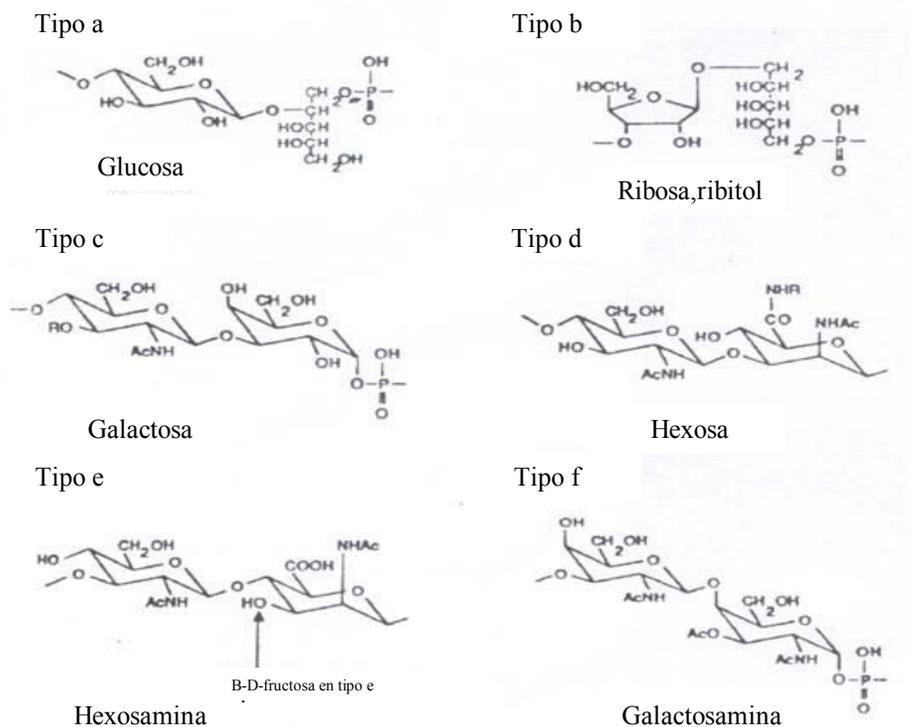


Figura 2. Estructura y composición diferencial del polisacárido capsular de *H. influenzae* (serotipos a-f)
Adaptado de Tang et al., 2001.

Como resultado de la elucidación de las bases genéticas para la expresión capsular de este microorganismo, Falla y colaboradores (1994), desarrollaron una técnica de tipificación capsular mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El sustento teórico de dicha técnica estriba en la presencia del locus *cap* ribosomal que contiene el grupo de genes necesarios para la síntesis y expresión de la cápsula en *H. influenzae*. El locus *cap* en los seis tipos capsulares comparte una organización común que consta de tres regiones, denominadas región 1 a 3; las regiones 1 y 3 son comunes para todos los tipos capsulares y la región 2, codifica específicamente para cada tipo de cápsula (tipo-específico a-f) (Kroll et al., 1989; Kroll et al., 1991; Falla et al., 1994).

La región 1 comprende un grupo de cuatro genes (*bex A, B, C, D*). El locus *bexA* codifica para una proteína involucrada en la exportación del material capsular del citoplasma hacia la superficie celular (Kroll y Moxon, 1988; Kroll et al., 1990). La región 2 contiene genes involucrados en la biosíntesis capsular, esta región es cápsula tipo-específico. La región 3, por analogía con *Neisseria meningitidis*, comprende dos genes involucrados en la translocación de la cápsula a través de la pared celular (Figura 3) (Tang et al., 2001).

Dada la importancia epidemiológica para población infantil, la mayoría de la información generada ha sido en torno al serotipo b. Los genes responsables de la síntesis de cápsula del serotipo b, están localizados en un segmento de ADN de cerca de 50 kb.

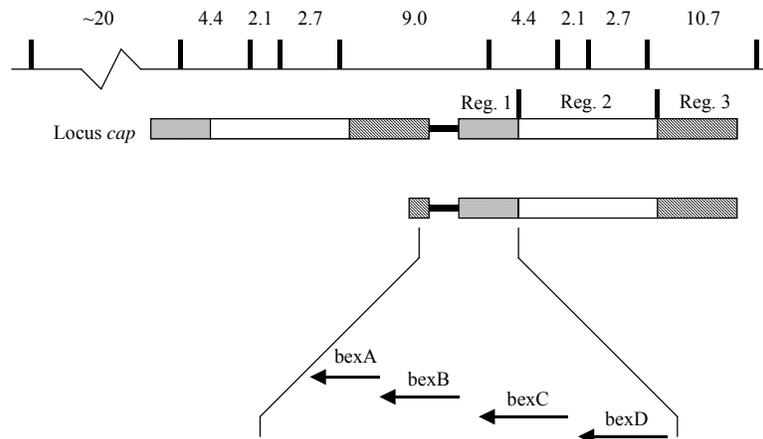


Figura 3. El locus *cap* en *H. influenzae* b. El locus *cap* cromosomal se muestra en la parte superior del diagrama. Las líneas verticales dividen al locus en fragmentos (tamaño en kb indicado encima). Las barras de bajo de la línea del cromosoma representan fragmentos de 18 kb repetidos en tandem. En la parte duplicada de la derecha se muestra el grupo de genes que comprenden *cap*: regiones 1, 2 y 3. La parte inferior del diagrama muestra en detalle los genes *bex A, B, C, D* representados por flechas. Adaptado de Kroll, 1992.

En particular, las cepas de *H. influenzae* b que se asocian más frecuentemente con infecciones sistémicas presentan en la región *cap* una secuencia duplicada de ≈ 18 kb, arreglo que resulta predictivamente inestable, y mutantes deficientes en cápsula se presentan con frecuencias de entre 0.1% y 0.5% (Hoiseth et al., 1986). Mediante la secuenciación de *cap* se ha evidenciado que se trata de un elemento transposon en el cual cada una de las copias de *cap* está flanqueada por el elemento de inserción IS1016 (Kroll et al., 1991). Este arreglo facilita la amplificación de los genes de capsulación por recombinación homóloga intragenómica con réplicas de hasta 5 copias. De esta forma la ganancia ó pérdida de segmentos repetidos modula la cantidad de polisacárido a sintetizar. Interesantemente la reducción de dos a una sola copia resulta en un fenotipo deficiente en cápsula. Esto se debe a una deleción de aproximadamente 1.2 kb en el extremo de uno de los duplicados ocasionando la pérdida de la mayor parte de

IS1016 y casi todo el contenido del gen *bexA* (esencial para la exportación del polisacárido capsular). En el estado duplicado, por lo tanto, solo la copia funcional de *bexA* se pierde. Bajo estas circunstancias, la cápsula es aún sintetizada pero no exportada, generando mutantes de *b* deficientes en cápsula, cepas b^- (Figura 4). Este evento puede favorecer la persistencia microbiana mediante la evasión de anticuerpos anti-capsulares del sistema inmune (Kroll y Moxon, 1988; Kroll et al., 1988; Corn et al., 1993; Tang et al., 2001).

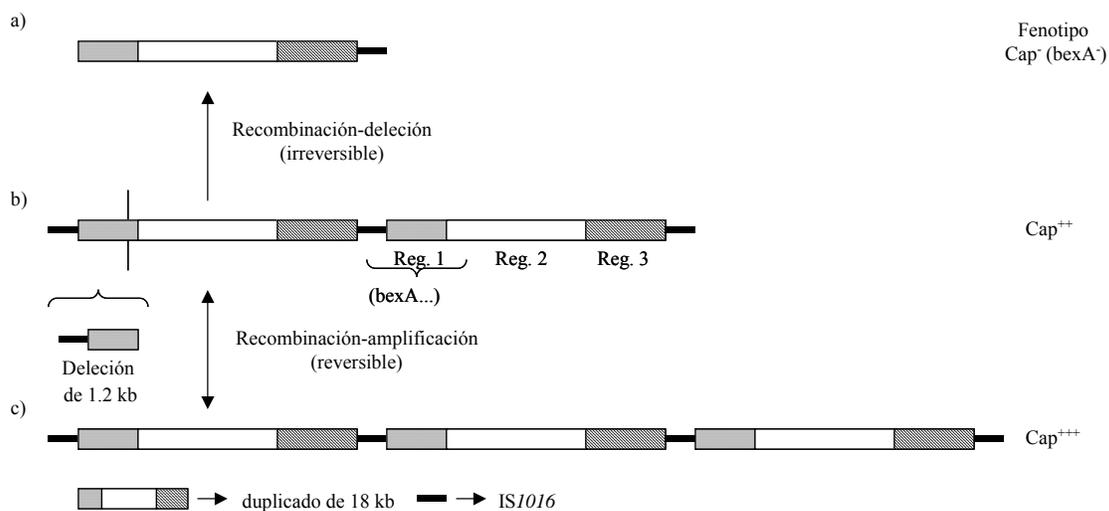


Figura 4. *Cap* como elemento transposon en *H. influenzae b*. Esquema general de amplificación y reducción de *cap* por recombinación homóloga. a) Se muestra una copia repetida de 18 kb del locus *cap*. b) *Cap* repetido en tandem. Cada una de las copias de *cap* está flanqueada por el elemento de inserción IS1016. La delección de aproximadamente 1.2 kb en el extremo de uno de los duplicados ocasiona la pérdida de la mayor parte del elemento de inserción y casi todo el fragmento de la región 1, la cual contiene a *bexA*. La reducción a una copia de *cap* (flecha de un sentido), genera mutantes deficientes en cápsula (cepas b^-). c) La presencia de IS1016 también facilita la amplificación de los genes capsulares con replicas de hasta 5 copias (flecha de doble sentido). Modificado de Roche y Moxon, 1995.

Los genes capsulares de *H. influenzae* han sido exitosamente amplificados por PCR. Las secuencias de ADN para los iniciadores del gen *bexA* diseñadas por van Ketel et al., (1990), han sido usadas para distinguir entre cepas capsuladas y no capsuladas. Sin embargo, estos iniciadores no permiten distinguir entre tipos

capsulares diferentes o entre mutantes de b (b⁻) y cepas no capsuladas. Para discriminar entre los seis tipos capsulares un segundo PCR fue implementado para la distinción entre secuencias de ADN tipo-específicas, y cepas b⁻ y no tipificables (Falla et al., 1994).

Con el advenimiento de la técnica de genotipificación capsular por PCR, el número de trabajos sobre caracterización de cepas ha ido en aumento. Recientemente se utilizó esta técnica según un trabajo realizado en los Estados Unidos para resolver las discrepancias entre los resultados obtenidos por aglutinación en placa. Se evidenció que solo el 30% de las cepas caracterizadas como *H. influenzae* b por aglutinación, poseían los genes necesarios para la expresión de la cápsula, lo que implica que se pueden tener resultados falsos positivos acerca de la prevalencia de *H. influenzae* b cuando se determina el serotipo por el método convencional (La Claire et al., 2003).

En la era post-vacunal el enfoque de interés para países desarrollados según la mayoría de las publicaciones recientes, va dirigido a la vigilancia de casos invasivos por cepas no b, así como de las posibles fallas de la vacuna (Cerquetti et al., 2000; Adderson et al., 2001; Campos et al., 2004; Kapogiannis et al., 2005). No obstante, en nuestro país no contamos con las estadísticas sobre incidencia, ni con vigilancia la adecuada.

En países en desarrollo en los que se aplica la vacuna conjugada y en los que aún no se aplica, la información sobre infecciones por *H. influenzae*, y la

prevalencia de portadores es escasa o nula y es obtenida de las bases de datos generadas por el Sector Salud de cada país, con base en casos de ingreso a hospitales por enfermedad invasiva atribuible a *H. influenzae* b (Dickinson et al., 2001; Ovalle et al., 2003; Cruces et al., 2006; Freitas y Merchan-Hamann, 2006).

Dada la importancia epidemiológica que tiene este microorganismo para la población infantil de México y aunado al hecho de que la caracterización de cepas se efectúa por el método tradicional identificándolas solo como tipo b ó no tipificable, sin informar sobre la presencia de otros serotipos. Es necesario evaluar y vigilar cuidadosamente los cambios en los tipos causales de enfermedad invasiva usando pruebas más sensibles y específicas. El empleo de dichas pruebas permitirá determinar con certeza, la identidad de las cepas de *H. influenzae* patógenas y de posibles fallas de la vacuna, así como los cambios que dan lugar al nuevo ambiente eco-epidemiológico, dada la inmunización extensiva contra *H. influenzae* b, en nuestro país.

JUSTIFICACIÓN

Con la virtual eliminación de las infecciones sistémicas por *H. influenzae* b y la reducción en el estado de portador a partir del uso de la vacuna conjugada, se ha especulado sobre la posibilidad de reemplazo del serotipo b por otros serotipos o por cepas no tipificables, no incluidas en la vacuna, y emerger como importantes patógenos de niños. En México se ha implementado un programa de prevención y control mediante inmunoprofilaxis en el que se considera la elaboración y la aplicación de la vacuna conjugada PRP-T de *H. influenzae* b, desde 1999. En nuestro país la información sobre infecciones por estas cepas, y la prevalencia de serotipos antes y después de la introducción de la vacuna anti-Hib es nula. Tradicionalmente la determinación de serotipos capsulares de *H. influenzae* se realiza por el método de serología por aglutinación en placa (SAP). Sin embargo, se ha informado sobre inconsistencias entre resultados obtenidos por SAP en diferentes laboratorios. Lo anterior hace necesaria la utilización de métodos más sensibles y específicos para evaluar y vigilar los cambios en los tipos causales de enfermedades por *H. influenzae* ante la aplicación de la vacuna en nuestro país.

Por lo tanto, este estudio está orientado a la genotipificación capsular de cepas aisladas de niños Mexicanos antes y después de la introducción del inmunógeno protector.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar al polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* en una población de cepas aisladas de niños antes y después de la introducción de la vacuna conjugada PRP-T en México, mediante SAP y PCR.

Objetivos particulares

- ❖ Analizar la expresión del polisacárido mediante serología por aglutinación en placa (SAP).
- ❖ Determinar la distribución de la expresión del gen *bexA* del locus *cap* para exportación, por PCR.
- ❖ Identificar la distribución de los tipos capsulares a, b, c, d, e, f y b⁻ mediante la detección del componente tipo-específico por PCR.
- ❖ Evaluar la correlación entre los resultados obtenidos mediante los métodos de SAP y PCR.
- ❖ Analizar la distribución de genotipos entre cepas de portadores y de casos para población pre-vacunal y post-vacunal.

MATERIAL Y MÉTODOS

La Estrategia experimental para la tipificación de cepas de *H. influenzae* de niños vacunados y no vacunados antes y después de la introducción del biológico conjugado anti-Hib en México fue la siguiente.

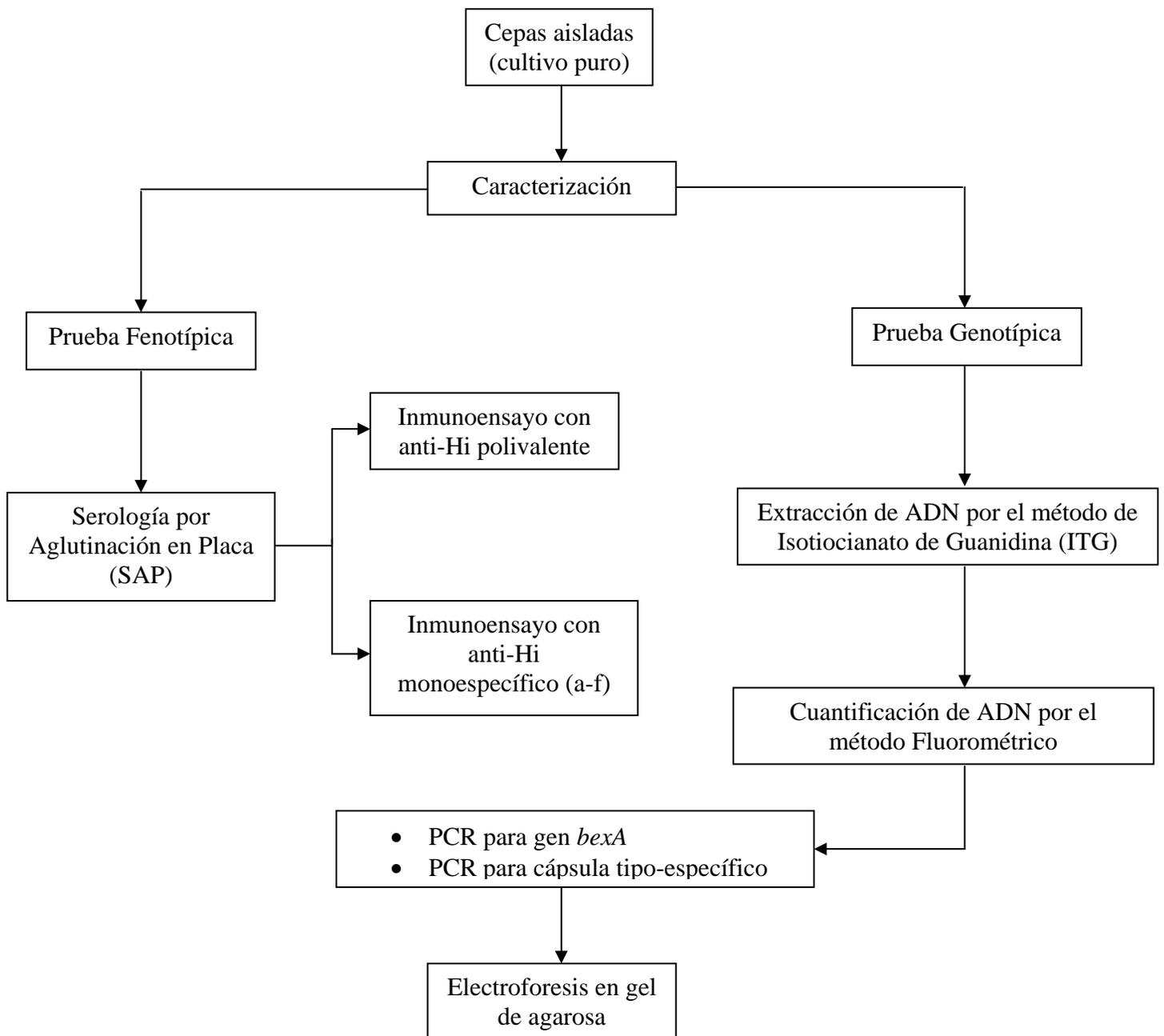


Figura 5. Esquema general de trabajo.

Población de Estudio y Material Biológico.

Se realizó un estudio transversal, descriptivo, en el que se analizaron un total de 111 cepas de *H. influenzae* de niños Mexicanos de 5 años y menores. De estas 38 fueron de origen clínico (líquido cefalorraquídeo, sangre y secreciones), y 73 fueron de portadores asintomáticos. Del total de las cepas, 54 fueron de vacunados y 57 de no vacunados. Las muestras colectadas para el presente estudio, proceden del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas CICM, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla BUAP, del Centro Médico de Occidente en Jalisco CMO, IMSS y del Instituto Nacional de Pediatría INPed, SSA, de la Ciudad de México. El material biológico se ha recibido en el laboratorio a partir del 2004.

Las cepas para el primoaislamiento fueron sembradas en los laboratorios de origen, en medio Gelosa Chocolate preparado con hemoglobina bovina (Difco Laboratories), extracto de levadura (Sigma-Aldrich), polienriquecimiento (Bioxon) y bacitracina 2.5UI/mL (Sigma-Aldrich), en placas Petri. Se incubaron durante 18-24 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Se colocaron en bolsas estériles y fueron transportadas en un recipiente de unicel sin refrigerante hasta nuestro laboratorio en la UNAM. Se mantuvieron a temperatura ambiente, tomando en cuenta que no transcurrieran más de 4 horas hasta su procesamiento.

Las cepas se resembraron empleando la técnica de estría cruzada en base de Gelosa Infusión Cerebro-Corazón (BHI) (Bioxon) suplementado con fluido de

Fildes al 3.5% (a partir de sangre de caballo desfibrinada) (Hemoderivados) en placas Petri conteniendo agar al 1.1% (Merck). Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 24 horas. Con el fin de conservar el cepario, las cepas una vez crecidas en cultivos puros, se cosecharon y se almacenaron en caldo BHI suplementado con glicerol al 1.5%, leche descremada al 15% y fluido de Fildes al 2.5%. Se congelaron a -70°C, para estudios posteriores.

BACTERIAS DE REFERENCIA

Tres cepas de referencia de *H. influenzae* capsuladas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC por sus siglas en inglés), positivas para *bexA*, fueron usadas como controles positivos. Se incluyeron dos controles negativos de referencia, de los géneros *Actinobacillus* y *Pasteurella* procedentes de la colección de cepas del Departamento de Producción Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia MVZ., UNAM. El criterio de esta selección radica en el hecho de que son géneros relacionados filogenéticamente con *H. influenzae* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cepas de referencia de *H. influenzae* y otros géneros relacionados

Especies	Identidad	Control
<i>Haemophilus influenzae</i> (Hi)	ATCC 33930*	Positivo
<i>Haemophilus influenzae</i> (Hi)	ATCC 49247*	Positivo
<i>Haemophilus influenzae</i> (Hi)	ATCC 49766*	Positivo
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (App)	Appl-1 ^{a**}	Negativo
<i>Pasteurella multocida</i> (Pm)	PmA-3 ^{**}	Negativo

* ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo.

** Colección de la Facultad de MVZ, UNAM.

Serología por Aglutinación en Placa (SAP).

Los cultivos crecidos durante 18 a 24 horas de *H. influenzae* fueron tipificados por serología, utilizando antisuero polivalente que incluye anticuerpos hacia los componentes capsulares a, b, c, d, e y f, para determinación de cepas capsuladas y/o no capsuladas. (Difco, Laboratories). Se prepararon suspensiones de las bacterias por identificar en solución salina estéril (SSE) al 0.85%. Para cada cepa se colocó una gota de la suspensión en un círculo marcado en el portaobjetos, se agregó una gota del antisuero polivalente, se homogeneizó con un aplicador de madera y se agitó con movimientos rotatorios por espacio de un minuto. Simultáneamente se trabajó un testigo negativo con la suspensión y agua purificada estéril. La aglutinación positiva (formación de grumos) en presencia del antisuero polivalente, identificó a cada cepa evaluada como capsulada. En los casos en que no se observó aglutinación con este antisuero, las cepas se consideraron como *H. influenzae* no tipificable.

A las cepas con aglutinación positiva para el suero polivalente, se les realizó aglutinación con anti-Hi mono-específicos para los tipos capsulares a, b, c, d, e y f.

Extracción de ADN por el Método de Isotiocianato de Guanidina (ITG).

Se cosecharon las colonias crecidas en un tercio de la placa de Petri, durante 18-24 horas en Gelosa BHI-Fildes, se suspendieron en 500 μ L de solución

reguladora TE 1X (Tris-Base 50mM, EDTA 50mM) pH 7. Se centrifugaron a 3500 rpm durante 3 min a 20°C. El sobrenadante se decantó y el sedimento se homogeneizó en el líquido remanente en vortex. Al sedimento se le agregaron 500µL de Isotiocianato de Guanidina 5mM en EDTA 0.1M (Sigma-Aldrich) y se mezcló perfectamente con micropipeta, se añadieron 25µL de N-lauril-sarcocina al 10% y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Transcurrido este tiempo se mezcló suavemente por inversión. Se adicionaron 250µL de acetato de amonio 7.5M a cada tubo y se incubaron en hielo durante 10 min.

Esta suspensión se mezcló por agitación rotatoria durante 2 min con 550µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 3500 rpm durante 7 min a 15°C (este último paso se repitió dos veces). El sobrenadante acuoso se transfirió a tubos Eppendorf y se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol. El ADN precipitado observable a simple vista se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente el precipitado se centrifugó a 12000 rpm durante 7 min a 4°C y se decantó el sobrenadante; se añadieron 0.7mL de etanol al 70% y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 min a 4 °C , se eliminó el sobrenadante y se dejó secar al aire durante 10-15 min. El ADN se resuspendió en 70µL de agua desionizada estéril y se incubó a 65°C durante una hora, para su posterior cuantificación (Boom et al., 1990).

Determinación de la Concentración de ADN por el Método Fluorométrico.

La concentración fue evaluada con un fluorómetro DyNA QUANT 200 (Hofer, Pharmacia) empleando una longitud de excitación a 365nm y emisión a 460nm. Se preparó una solución de ensayo Hoechst (H33258) 0.1µg/mL en TNE 1X con 10µL de H33258 (10mg/mL), 10mL de TNE 10X en 90mL de agua desionizada estéril. Se preparó una solución estándar de ADN (Calf Thymus DNA) 100µg/mL a partir del stock 1mg/mL, añadiendo 100µL de ADN, 100µL de TNE 10X (Tris-Base 100mM, EDTA 10mM, NaCl 2M) pH 7.4 en 800µL de agua desionizada estéril.

1. Para medir las concentraciones de los ADNs problemas. Se agregaron 2mL de la solución de H33258 0.1µg/mL en TNE 1X a una celda, se introdujo la celda a la cámara del fluorómetro como blanco.
2. Se agregaron 2µL de ADN Estándar (100µg/mL) para calibrar.
3. Para tomar la lectura de la muestra problema (*), se agregaron 2mL de la solución H33258 y 2µL de ADN problema a la celda, se homogeneizó por pipeteo, y se registró la lectura.

Para cada muestra se repitieron los pasos desde (*).

PCRs para el Gen *bexA* y Cápsula Tipo-Específico a, b, c, d, e y f.

Iniciadores para el PCR. Un par de iniciadores de aproximadamente 20 pb (HI1-HI2), específicos para el gen *bexA*, fue usado para distinguir entre cepas

capsuladas y no capsuladas de las 111 cepas de la población de estudio. Las cepas resultantes con genotipo *bexA* positivo fueron seleccionadas para someterse a un segundo PCR con uno de los seis pares de iniciadores: a1-a2; b1- b2; c1-c2; d1-d2; e1-e2, y/o f1-f2 en ensayos independientes (Cuadro 2). Estos últimos son específicos para los tipos capsulares a hasta la f. Posteriormente, a las cepas no tipificables por genotipificación con los iniciadores HI1-HI2 se les realizó un tercer PCR con el par de iniciadores b1-b2 (los cuales son específicos para el tipo capsular b), para detectar mutantes deficientes en cápsula b (cepas b⁻). Se consideró como tipo b⁻, si ésta dio un resultado negativo por PCR con los iniciadores HI1-HI2, pero dio resultado positivo para iniciadores b1-b2 (Falla et al., 1994).

Volumen de la reacción. El volumen de la reacción fue de 25µL y contenía 0.9µL de cada iniciador (concentración: 25µM), 2.5µL de regulador de amplificación 10X (Tris-HCl 200mM pH 8.4, KCl 500mM), 2µL de dNTP's mix (concentración: 2.5mM c/u), 2.5µL de MgCl₂ (concentración: 25mM), 4µL de ADN (concentración ~33ng/µL), 1µL de *Taq* DNA polimerasa (0.5 UI/µL) (Sigma-Aldrich), 3.73µL de glicerol al 50% y 7.47µL de agua desionizada estéril.

Condiciones de amplificación. La mezcla fue procesada durante 35 ciclos en un termociclador programable (Techne, TC-312). Los parámetros del ciclo consistieron de 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineación a 60°C, y 1 min de extensión a 72°C; seguido de un ciclo de alargamiento final a 72°C durante

10 min. Las condiciones usadas fueron descritas previamente por Falla et al., (1994), excepto que la temperatura de alineación fue disminuida a 55°C y se aumentó el tiempo de extensión a 2.5 min cuando los iniciadores específicos para cápsula e fueron empleados (LaClaire et al., 2003). Para evaluar la especificidad del PCR para el gen *bexA*, se incluyeron dos cepas bacterianas (*App* y *Pm*) que están relacionadas filogenéticamente con *H. influenzae*. Además, se incluyó en cada ensayo de PCR, un control de reactivos en ausencia de ADN.

Cuadro 2. Iniciadores para el gen *bexA* e iniciadores cápsula tipo-específico a-f

Nombre del iniciador	Secuencias (5' a 3')*	Tipo capsular	Tamaño (pb)
a1	CTACTCATTGCAGCATTTGC	a	250
a2	GAATATGACCTGATCTTCTG		
b1	GCGAAAGTGAACCTTTATCTCTC	b	480
b2	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA		
c1	TCTGTGTAGATGATGGTTCA	c	150
c2	CAGAGGCAAGCTATTAGTGA		
d1	TGATGACCGATAACAACCTGT	d	250
d2	TCCACTCTTCAAACCATTCT		
e1	GGTAACGAATGTAGTGGTAG	e	1350
e2	GCTTTACTGTATAAGTCTAG		
f1	GCTACTATCAAGTCCAAATC	f	450
f2	CGCAATTATGGAAGAAAGCT		
HI-1	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC	a-f	343
HI-2	TGTCCATGTCTTCAAATGATG		

*Falla et al. (1994). PCR for Capsular Typing of *Haemophilus influenzae* J. Clin. Microbiol., **32**:2382-2386

Electroforesis en Gel de Agarosa al 2%.

Se preparó solución de carga con colorante con 0.02gr de agarosa, 0.1mL de Tris-HCl 1M pH 8, 0.2mL de EDTA 0.5M, 1.1mL de glicerol y 1mg de azul de bromofenol en 10mL de agua desionizada estéril.

A cada 12 μ L del producto de amplificación por PCR, se agregaron 2 μ L de amortiguador de carga. Los productos se corrieron en geles de agarosa al 2% en TBE 1X y se visualizaron en una solución que contenía Bromuro de Etidio a una concentración de 1 μ g/mL. La electroforesis se realizó a 80mV, 15W y 75mA, durante 1 hora. Los fragmentos de amplificación se compararon con los de los controles positivos y con los pesos moleculares de un estándar de 100 pb (Invitrogen).

Análisis de Sensibilidad y Especificidad.

Considerando los resultados de PCR como los datos de referencia, se evaluó la sensibilidad y especificidad de la prueba antigénica utilizando un cuadro de 2 x 2. El calculo fue determinado con base a verdaderos positivos (vp), falsos positivos (fp), verdaderos negativos (vn), y falsos negativos (fn).

		PCR		
		(+)	(-)	
SAP	(+)	vp-a	Fp-b	Sensibilidad= $a/(a+c)$
	(-)	fn-c	Vn-d	Especificidad= $d/(b+d)$

Distribución de Frecuencias y Análisis Estadístico.

Se realizó un análisis descriptivo simple y se determinaron los serotipos más frecuentes entre los grupos de portadores y de casos para población de cepas pre-vacunales y post-vacunales, mediante un análisis de frecuencias. Las frecuencias entre los diferentes grupos se sometieron a un análisis de varianza aplicando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U, con un valor crítico de $p < 0.050$. Todos los datos fueron analizados usando el programa estadístico SPSS versión 13.0.

RESULTADOS

Caracterización de las Cepas por Serología.

Mediante el método de aglutinación en placa se encontró que de las 111 cepas examinadas con antisuero polivalente, 40 (36%) fueron capsuladas, y 71 (64%) no tipificables (HiNT). De las cepas con cápsula, 22 fueron del serotipo b y 18 de cápsulas distinta de b. El empleo de antisueros monoespecíficos a, c, d, e y f permitió establecer el tipo de cápsula entre las 18 cepas no b. Dos fueron serotipo a y 16 serotipo f (Cuadro 3). No se obtuvieron cepas positivas con los antisueros c, d y e.

Cuadro 3. Distribución de serotipos de *H. influenzae* por el método de SAP

Tipo	Serología n=(111)	
	No.	(%)
a	2	1.8
b	22	19.8
f	16	14.4
*NT	71	64.0

*NT, cepas no tipificables

Genotipificación Capsular por PCR.

El empleo de este método permitió generar productos de amplificación de 343 pb en 45 cepas cuando se incluyeron los iniciadores HI1-HI2 específicos para el

gen *bexA* (Figura 6). Posteriormente, estas cepas se sometieron a un segundo PCR con c/u los 6 pares de iniciadores cápsula tipo-específico. Los resultados mostraron que entre estas cepas, 3 presentaron secuencias de ADN específicas que amplificaron con los iniciadores a1-a2 (Figura 7), 18 cepas evidenciaron secuencias de ADN específicas que amplificaron con los iniciadores b1-b2 (Figura 8). En presencia de los iniciadores e1-e2 para biosíntesis de cápsula e, solamente amplificó 1 cepa (Figura 9), e interesantemente 23 cepas probaron poseer secuencias de ADN específicas que amplificaron con f1-f2 (Figura 10). Las 66 cepas negativas para *bexA* se sometieron a un PCR adicional en el que se emplearon los iniciadores b1-b2 para detección de mutantes de b. Ninguna de las 66 cepas NT resultó positiva para estos iniciadores.

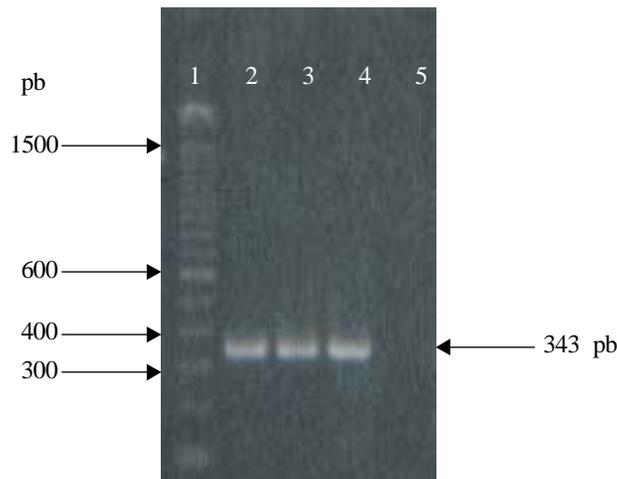


Figura 6 Productos de amplificación para el gen *bexA*. Carril 1, marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2, 3 y 4, fragmentos amplificados de 343 pb de tres cepas de Hi con los iniciadores HI1-HI2; carril 5, *Actinobacillus pleuropneumoniae* como control negativo.

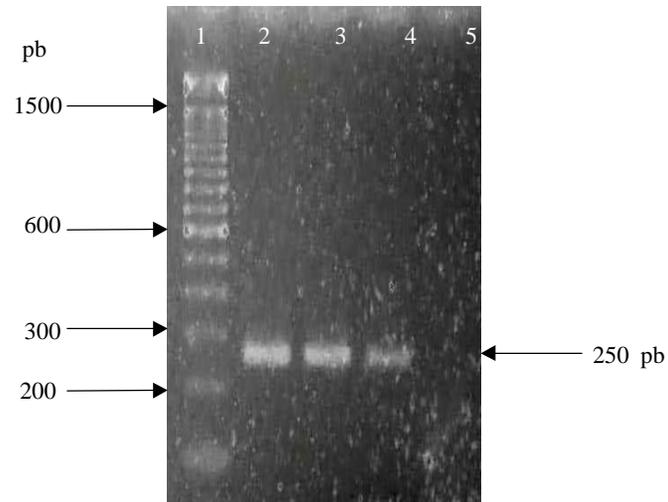


Figura 7. Productos de amplificación para cápsula a. Carril 1, marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2, 3 y 4, fragmentos amplificados de 250 pb de tres cepas de Hi con los iniciadores a1-a2; carril 5, cepa no tipificable (HiNT) como control negativo.

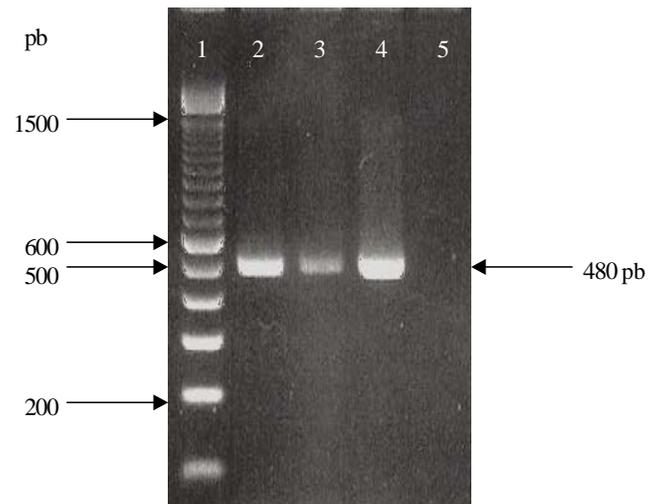


Figura 8. Productos de amplificación para cápsula b. Carril 1, marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 2, 3 y 4, fragmentos amplificados de \approx 480 pb de tres cepas de Hi con los iniciadores b1-b2; carril 5, *Pasteurella multocida* como control negativo.

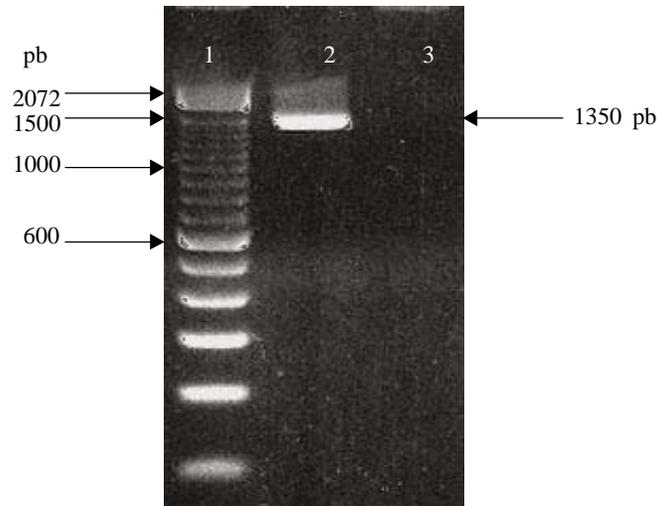


Figura 9. Productos de amplificación para cápsula e. Carril 1, marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2, fragmento amplificado de 1350 pb de una cepa de Hi con los iniciadores e1-e2; carril 3, cepa no tipificable (HiNT) como control negativo.

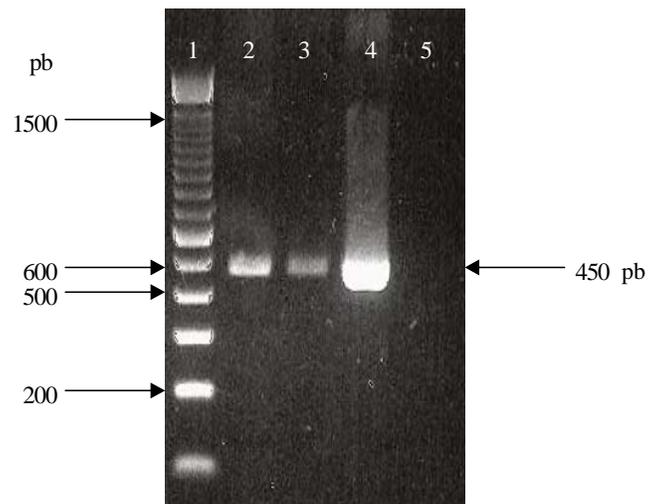


Figura 10. Productos de amplificación para cápsula f. Carril 1, marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2, 3 y 4, fragmentos amplificados de 450 pb de tres cepas de Hi con los iniciadores f1-f2; carril 5, cepa no tipificable (HiNT) como control negativo.

De las 111 cepas analizadas por la técnica de genotipificación capsular por PCR, se determinó que 45/111 (40.5%) cepas fueron capsuladas y están representadas por los tipos capsulares a, b, e y f, las cuales evidenciaron fragmentos de ADN con pesos moleculares de: 250, 480, 1350 y 450 pares de bases (pb), respectivamente. El tipo capsular más frecuente fue el f con el 51.1% (23/45) de las cepas, seguido del serotipo b con el 40% (18/45), el serotipo a con el 6.7% (3/45) y finalmente el serotipo e con el 2.2% (1/45). Sesenta y seis cepas fueron no tipificables (HiNT); de estas ninguna fue mutante de b (cepas b⁻).

Correlación entre los Resultados por SAP y PCR para Tipificación Capsular.

El cuadro 4 muestra la correlación entre los resultados de la prueba antigénica y la técnica de tipificación capsular por PCR.

Cuadro 4. Correlación entre los resultados de tipificación capsular de las 111 de *H. influenzae* por SAP y PCR

Tipos	No. de cepas por SAP	*Tipo capsular resultados por PCR					
		Concordancia con SAP		Discrepancia con SAP			
		No.	%	Cepas NT		Cepas capsuladas	
		No.	%	No.	%	No.	%
a	2	2	100	0	0	0	0
b	22	18	81.8	4	18.2	0	0
e	0	0	0	0	0	0	0
f	16	16	100	0	0	0	0
NT	71	62	87.3	0	0	**9	12.7
Total	111	98	88.3	4	3.6	9	8.1

*Resultados positivos: *bexA*⁺, además de segmento tipo-específico⁺.

**Identificadas como tipo a (1), tipo e (1) y tipo f (7).

En este estudio, se encontraron diferencias entre los resultados de la prueba antigénica (SAP) y los del método de PCR; 98 (88.3%) de las 111 cepas, analizadas por serología concordaron con los resultados obtenidos por PCR. De las 13 cepas restantes cuyos resultados por serología y PCR difirieron (11.7%), se encontraron dos tipos de inconsistencias. En la primera, 4 de las 13 cepas resultaron positivas con algún serotipo particular por serología, aunque negativas para el gen *bexA* y secuencia tipo-específico por PCR. En este sentido, de las 22 cepas tipificadas por serología como tipo b, solo 18 (81.8%) fueron positivas para cápsula b por PCR, las otras 4 (18.2%) fueron NT con la misma prueba. El segundo tipo de inconsistencia se presentó en la identificación de 9 cepas no capsuladas (NT) por serología, que, por PCR resultaron capsuladas: 1 fue positiva para cápsula tipo-específico a, 1 para tipo e y 7 para tipo f.

Con base en los datos mostrados en el cuadro 4, se analizó la correlación entre ambos métodos. Considerando los resultados por PCR los datos de referencia, la sensibilidad y la especificidad de la prueba antigénica para la determinación de los serotipos en este estudio fueron del 80% y 93.9%, respectivamente.

Análisis de grupos de portadores y de casos entre cepas pre-vacunales y post-vacunales.

La confirmación del genotipo capsular de las cepas del estudio mediante el método de PCR, permitió generar información confiable sobre las diferencias entre los grupos de portadores y de casos antes y después de la vacunación con PRP-T

en México. De las 57 cepas pre-vacunales, la frecuencia de cepas capsuladas fue menor (42.1%) que la de cepas no tipificables (57.9%). La proporción de cepas capsuladas y no capsuladas entre las 54 cepas post-vacunales fue de 38.9% y de 61.1%, respectivamente. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias de cepas capsuladas y no capsuladas antes y después de la vacunación con PRP-T ($p < 0.050$).

Las cepas más frecuentes en el grupo de portadores de la población pre-vacunal fueron las no tipificables con 33.3% (19/57); las cepas capsuladas estuvieron representadas por 6 cepas de Hif (10.6%) y 2 de Hib (3.5%). En el grupo de portadores de la población post-vacunal se observó un patrón diferente. Las cepas con cápsula estuvieron representadas por los tipos a, e y f, con frecuencias de 3.7% (2/54), 1.9% (1/54) y 20.4% (11/54), respectivamente. Es importante puntualizar que en la población de cepas post-vacunales Hib no estuvo. Además, Hia y Hie no se presentaron entre cepas pre-vacunales. Las cepas no tipificables estuvieron representadas mayoritariamente (59.2%) en la población de cepas post-vacunales aisladas de portadores (Cuadro 5).

Se observó un ligero decremento entre las cepas b de casos cuando se contrastaron los grupos de cepas pre-vacunales (10/57) con el de post-vacunales (6/54). Al comparar las poblaciones de cepas aisladas antes y después de la vacunación; según la presencia de cápsula b, esta diferencia se hace más notoria, con 12 y 6 cepas, respectivamente. Las cepas de HiNT se presentaron

mayoritariamente (24.6%) en la población de cepas pre-vacunales recuperadas de casos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Distribución de frecuencias de cepas capsuladas y no capsuladas entre los grupos de portadores y de casos para población pre-vacunal y post-vacunal

Tipos capsulares	Cepas Pre-vacunales (N=57)				*Cepas Post-vacunales (N=54)			
	Portadores		Casos Clínicos		Portadores		Casos Clínicos	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
a	0	0	0	0	2	3.7	1	1.9
b	2	3.5	10	17.5	0	0	6	11
e	0	0	0	0	1	1.9	0	0
f	6	10.6	6	10.5	11	20.4	0	0
NT	19	33.3	14	24.6	32	59.2	1	1.9
Total	27	47.4	30	52.6	46	85.2	8	14.8

*El análisis estadístico realizado con la prueba de Mann-Whitney, evidenció diferencia significativa ($p < 0.050$) entre cepas capsuladas y NT de población pre-vacunal con respecto a la post-vacunal; encontrando en esta última un aumento en portadores y la disminución en el caso de Hib.

DISCUSIÓN

En la era pre-vacunal la mayoría de las cepas de *H. influenzae* causantes de infección invasiva fueron mas bien del tipo b, mientras que las cepas HiNT y capsuladas no b fueron menos frecuentes (Peltola, 2000). Después de la introducción de la vacunación por conjugados anti-Hib, la incidencia por cepas b disminuyó substancialmente (Wenger y Ward, 2004). En este estudio, se muestran resultados de tipificación a nivel serológico y molecular de cepas de *H. influenzae* de niños Mexicanos aisladas antes y después de la introducción del inmunógeno protector.

En trabajos anteriores se ha informado sobre las diferencias entre resultados sobre tipificación de *H. influenzae*, obtenidos mediante los métodos de SAP y de PCR (Falla et al., 1994; LaClaire et al., 2003). En el presente trabajo se encontró una discrepancia del 11.7% entre ambas pruebas, en contraste con el 40% según un estudio de LaClaire et al. (2003). Cabe mencionar, que la discrepancia encontrada en nuestro estudio, pudiera ser mayor, ya que en el estudio multicéntrico dirigido por LaClaire con participación de 7 laboratorios, se encuentran cifras más altas. En este estudio solamente 18 de las 22 cepas que aglutinaron con antisuero b mediante SAP poseían los genes necesarios para la expresión de la cápsula. En congruencia con este hallazgo, se han publicado datos sobre este tipo de error (Bokermann et al., 2003; Hidalgo et al., 2003). En un sentido opuesto, 9 cepas identificadas como no tipificables mediante SAP, resultaron ser capsuladas a, e y f por PCR tipo-específico; este resultado confirma

el hallazgo de Ishiwada et al. (2004) en el que se evidencia esta situación a solo una de las cepas de su estudio. Estas discrepancias podrían no ser resultado de mecanismos de regulación en la expresión genética, sino pudiera deberse a aglutinaciones inespecíficas que dan lugar a falsos positivos, y/o una baja discriminación al emplear antisuero polivalente resultando en falsos negativos.

Las diferencias entre los resultados obtenidos por los dos métodos sugieren que la identificación realizada en instituciones hospitalarias en México y en el mundo empleando serología por aglutinación en placa, es equívoca, en la presente investigación se observaron inconsistencias en la determinación de serotipos evaluada por el método tradicional. Estudios potenciales del Sector Salud sobre vigilancia a partir de la vacunación debieran tomar en cuenta datos como estos, para no informar resultados sesgados y sobreestimaciones para Hib. El bajo poder discriminante del antisuero polivalente evidenciado aquí, y mencionado por otros autores (Bokermann et al., 2003; Ishiwada et al., 2004) da lugar a falsos negativos entre cepas de *H. influenzae* no tipificables, que en realidad son positivas para cápsula tipo-específico. Lo anterior obliga a sugerir la eliminación de la prueba polivalente como un “screening” previo al empleo de los sueros monovalentes.

La detección equívoca de cepas positivas para cápsula b mediante serología con antisuero polivalente, confirmadas como no capsuladas por PCR, es indicativa de conclusiones equívocas. Esta situación adquiriría mayor relevancia si se tratase de identificar individuos con fallas a la vacunación contra Hib.

Recientemente en varios estudios se ha confirmado la existencia de mutantes de b (Falla et al., 1994; Bokermann et al., 2003). En contraste con esos trabajos pero en congruencia con LaClaire et al. 2003, Campos et al. 2004 y Weltman et al. 2005, aquí no se detectó la presencia de mutantes deficientes en cápsula (cepas b⁻). Lo anterior no descarta la posibilidad de que algunas cepas b⁻ circulen entre las poblaciones de *H. influenzae* en México.

La inmunización masiva contra Hib, ha disminuido la incidencia de infecciones por este serotipo (Peltola, 2000; Gómez de León, 2001; Wenger y Ward, 2004). Si bien nuestra muestra se limita al número de cepas que conforman nuestro cepario, éste revela dicha circunstancia, ya que las cepas b se encuentran más bien presentes entre el grupo pre-vacunal. En este estudio la frecuencia del serotipo b entre cepas post-vacunales fue baja (11%), estudios realizados con muestras similares en Canadá muestran el mismo patrón, indicando que esta situación no es por causa azarosa (Tsang et al., 2006). Presuponiendo que las incidencias de infecciones invasivas por Hib en países no desarrollados en la era pre-vacunal (entre 150 y 460/100,000 anuales en niños menores de 5 años) (Peltola, 2000) fueron equiparables a las de nuestra población infantil, podemos considerar entonces que la vacunación con PRP-T en México ha presentado beneficio en la reducción del tipo b de nuestra población.

En contraste con nuestros resultados, en un estudio realizado en 53 cepas de niños Japoneses, se evidenció que 88.7% de las cepas aisladas de pacientes fueron tipo b, en donde hasta el 2004 no se había liberado la vacuna conjugada

(Ishiwada et al., 2004). Lo anterior sugiere que la vacunación con PRP-T ha presentado un efecto favorable en términos de respuesta inmunológica en la población infantil Mexicana.

A partir del uso de la vacuna, las infecciones invasivas causadas por cepas no b y por HiNT han cobrado mayor importancia de estudio (Booy y Kroll, 1997; Cerquetti et al., 2000; Kapogiannis et al., 2005). La presencia de cepas f y de otras cápsulas entre la población de cepas post-vacunales aquí, sugiere una situación semejante. En Estados Unidos la incidencia de cepas f se ha incrementado después de la vacunación, del 1% en 1989 al 17% en 1994 (Urwin et al., 1996). En comparación con el presente estudio las frecuencias del tipo f del grupo de portadores de la población post-vacunal presentan un incremento (20.4%) con respecto a la población pre-vacunal (10.6%); aunque se desconocen las estadísticas reales en México, el comportamiento del tipo f, en nuestra muestra, indica la circulación significativa de este tipo; en adición, considerando en su conjunto a todas las cepas no b, se observa una tendencia a su incremento entre poblaciones de cepas de *H. influenzae* en México. En ninguna de las publicaciones para nuestro país que preceden a este trabajo se menciona dicha circunstancia. Considerando que *H. influenzae* f es básicamente clonal (Omikunle et al., 2002) y aunado al hecho de que en buena medida las cepas de Hif se han identificado como β -lactamasas positivas, se sugiere monitorear las tendencias en la distribución de este serotipo. Es importante puntualizar que las cepas de Hif y Hie según informes previos para otros países (Urwin et al., 1996; Cerquetti et al., 2003; Campos et al., 2003; Campos et al., 2004) han circulado preferencialmente

entre adultos y en menor medida entre niños. Sería útil describir la situación actual sobre todo del serotipo f como causa de infecciones en adultos en México, y como fuente de transmisión a población infantil.

La frecuencia de cepas de HiNT en España fue del 73.3% en la era post-vacunal (Campos et al., 2004); estas cepas también se presentaron mayoritariamente (61.1%) entre las cepas post-vacunales de nuestra colección. Es importante mencionar que una cepa capsulada tipificada por PCR (negativa por SAP) como Hia, fue causa de infección sistémica (caso de meningitis) en población post-vacunal. En otros estudios a quedado confirmada la importancia reciente adquirida por el tipo a en términos de virulencia. La duplicación del gen de la cápsula y la delección en el gen capsular *IS1016-bexA*, son dos factores determinantes de patogenicidad. Sin embargo, la enfermedad invasiva por Hia ha sido documentada en ausencia de la delección del gen *IS1016-bexA* (Adderson et al., 2001). Recientemente, en Estados Unidos se presentaron dos casos de enfermedad invasiva por cepas de Hia con genes capsulares duplicados y delección parcial del gen *IS1016-bexA*, que ocurren típicamente entre cepas de Hib (Kapogiannis et al., 2005). La secuenciación a nivel de *cap* de la cepa de Hia de este trabajo, sería deseable a fin de generar información sobre características moleculares de cepas invasivas del tipo a con virulencia incrementada, que pudieran estar circulando en nuestro país.

Si bien nuestra muestra no fue diseñada en su origen para contemplar estado de portador, las frecuencias de cepas pre-vacunales de *H. influenzae* no

tipificables 70.4%, muestra cierta concordancia con los resultados de otros estudios para México, en los que la frecuencia para las no tipificables varió entre el 88% y el 92%; no así para serotipos distintos de b, en donde la frecuencia para el presente estudio fue del 22.2%, en tanto que en los otros estudios, varió entre el 4 y el 6% (Sánchez, 1996; Villaseñor et al., 1996).

De acuerdo con diferentes autores las cepas que han dado lugar a casos de enfermedad invasiva antes y después de la vacunación son principalmente capsuladas b (Booy y Kroll, 1997; Cerquetti et al., 2000; Peltola, 2000; Gómez de León, 2001; Campos et al., 2004; Wenger y Ward, 2004; Kapogiannis et al., 2005). Aquí esta misma distribución se repite, ya que de los 21 casos invasivos, 14 fueron atribuidos a Hib, de estos la mayoría se presentaron en población pre-vacunal. Las cepas no tipificables de casos en este estudio, fueron causantes de infecciones respiratorias agudas (66.7%), varios autores han evidenciado que las cepas de HiNT se asocian primordialmente (90%) con este tipo de afecciones (Falla et al., 1993; Luong et al., 2004).

Según estos resultados, en México deben establecerse programas de vigilancia basados en estudios longitudinales que determinen la presencia de casos debidos a *H. influenzae* b; además de detectar cualquier alteración en el incremento de infecciones causadas por otros tipos y cepas no tipificables en la población infantil. Es necesario informar con veracidad los resultados en el Sector Salud, utilizando no sólo el método tradicional por SAP, sino también técnicas moleculares más sensibles y específicas como la que aquí se propone (PCR). Aunque la

introducción de esta técnica sería difícil en términos económicos y de capacitación de personal en los laboratorios de las instituciones hospitalarias, su uso podría ser más bien implementado en laboratorios de referencia como un indicador verdadero de cepas de *H. influenzae*.

El monitoreo alternativo de cepas de *H. influenzae* a partir de este método, permitiría proporcionar identificación inequívoca en la evaluación y vigilancia de los cambios en las asociaciones causales de enfermedad por *H. influenzae*, así como las posibles fallas de la vacuna.

CONCLUSIONES

1. La detección de serotipos por SAP evidenció cepas capsuladas a, b y f, y cepas no tipificables.
2. La detección del gen *bexA* y del componente tipo-específico del locus *cap* permitió identificar a los tipos capsulares a, b, e y f, así como cepas NT. No se encontraron cepas b⁻.
3. Los resultados generados por SAP y PCR mostraron discrepancia del 11.7% (detección errónea de 13 cepas por serología).
4. La técnica de genotipificación capsular provee una prueba inequívoca para la determinación de tipos capsulares de cepas de *H. influenzae*, dada su mayor sensibilidad y especificidad que la prueba antigénica.
5. El análisis de tipificación molecular evidenció diferencias entre la distribución de cepas antes y después de la introducción del inmunógeno protector.
6. Se observó un ligero decremento entre las cepas b, al comparar las poblaciones aisladas antes y después de la vacunación.
7. En este estudio las cepas capsuladas no b consideradas en su conjunto, mostraron cierta tendencia al incremento en la población post-vacunal, lo cual podría sugerir concordancia con la hipótesis de reemplazo.
8. Las cepas capsuladas b y las HiNT se asociaron mayoritariamente con enfermedad sistémica y respiratoria, respectivamente.

CONSIDERACIONES RELEVANTES Y PERSPECTIVAS

- ❖ Si bien se desconocen en México las estadísticas sobre las frecuencias del tipo f, el comportamiento de éste en nuestra muestra indica la circulación significativa y con tendencia a su incremento entre poblaciones de cepas de *H. influenzae* en nuestro país. Es importante puntualizar que las cepas de Hif según informes previos para otros países, han circulado preferencialmente entre adultos y en menor medida entre niños. Sería útil describir la situación actual de este tipo como causa de infecciones en México, y como fuente de transmisión de adultos a población infantil.

- ❖ Los datos sobre el incremento en el estado de portador de las cepas capsuladas no b y NT de *H. influenzae*, sugieren concordancia con la hipótesis de reemplazo de tipos. Eventos de reemplazo (medidos como un incremento en la frecuencia de las cepas no vacunales), reducirían las posibilidades de reexposición de todos los miembros de una comunidad al serotipo b.

- ❖ Si bien los datos sobre la frecuencia del serotipo b apuntan hacia una reducción, se requiere de estudios adicionales que incluyan un número mayor de cepas de *H. influenzae*.

- ❖ La evaluación, vigilancia y estudio seroepidemiológico de los cambios en las asociaciones de serotipos causales de enfermedad por *H. influenzae*, deben ser objeto de investigaciones tendientes a determinar la importancia creciente

en un nuevo ambiente eco-epidemiológico, dada la dinámica poblacional que puede presentarse después de la medida inmunoproláctica. El monitoreo alternativo de cepas de *H. influenzae* a partir de la genotipificación capsular por PCR, permitiría proporcionar identificación inequívoca al respecto, así como las posibles fallas de la vacuna.

CAMPOS J, ROMÁN F, PÉREZ-VÁZQUEZ M, OTEO J, ARACIL B, CERCENADO E, THE SPANISH STUDY GROUP FOR *Haemophilus influenzae* TYPE E. :

Infections due to *Haemophilus influenzae* serotype e: microbiological, clinical, and epidemiological features.

Clin Infect Dis 2003; **37**:841-845.

CAMPOS J, HERNANDO M, ROMÁN F, PÉREZ-VÁZQUEZ M, ARACIL B, OTEO J, LÁZARO E, DE ABAJO F, THE GROUP OF INVASIVE *HAMOPHILUS* INFECTIONS OF THE AUTONOMOUS COMMUNITY OF MADRID, SPAIN. :

Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b.

J Clin Microbiol 2004; **42**(2):524-529.

CARLONE G M, PERKINS B A, POPOVIC T, ROSENSTEIN, ROMERO-STEINER S. :

Haemophilus influenzae type b, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Corynebacterium diphtheriae* vaccines.

En: Manual of Clinical Laboratory Immunology. Rose N R, Hamilton R G, Detrick B (eds.). 6th, ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C, USA., p 418-431, 2002.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. :

Haemophilus influenzae type b.

En: Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe S (eds.). 9th, ed. Public Health Foundation, Washington, D.C, USA., p 111-123, 2006.

CERQUETTI M, CIOFI DEGLI ATTI M L, RENNA G, TOZZI A E, GARLASCHI M L, MASTRANTONIO P, THE HI STUDY GROUP. :

Characterization of non-type b *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients with invasive disease.

J Clin Microbiol 2000; **38**(12):4649-4652.

CERQUETTI M, CIOFI DEGLI ATTI M L, CARDINES R, SALMASO S, RENNA G, MASTRANTONIO P, THE HI STUDY GROUP. :

Invasive type e *Haemophilus influenzae* disease in Italy.

Emerg Infect Dis 2003; **9**(2):258-261.

CORN P G, ANDERS J, TAKALA A K, KÄYHTY H, HOISETH S K. :

Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are frequently amplified.

J Infect Dis 1993; **167**:356-364.

CRUCES R P, DONOSO F A, CAMACHO A J, LLORENTE H M. :

Infecciones invasoras por *Haemophilus influenzae* tipo b después de la incorporación de la vacuna conjugada al programa ampliado de inmunizaciones en Chile.

Rev Chil Infect 2006; **23**(1):50-54.

DICKINSON F O, PÉREZ A E, GALINDO M A, QUINTANA I. :

Impacto de la vacunación contra *Haemophilus influenzae* tipo b en Cuba.

Rev Panam Sal Pub 2001; **10**(3):169-173.

ERWIN A L, NELSON K L, MHLANGA-MUTANGADURA T, BONTHUIS P J, GEELHOOD J L, MORLIN G, UNRANTH W C T, 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. :

Characterization of genetic and phenotypic diversity of invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*.

Infect Immun 2005; **73**(9):5853-5856.

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. :

Population-based study of non-typable *Haemophilus influenzae* invasive disease in children and neonates.

Lancet 1993; **341**(8849):851-854.

FALLA T J, CROOK D W, BROPHY L N, MASKELL D, KROLL J S, MOXON E R. :

PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*.

J Clin Microbiol 1994; **32**(10):2382-2386.

FREITAS H S, MERCHAN-HAMANN E. :

Impact of anti-Hib conjugate vaccine on the incidence of *Haemophilus influenzae* meningitis in Brazil's Federal District: results of a three-year follow-up.

Rev Panam Salud Publica 2006; **19**(1):33-37.

FUSTÉ M C, PINEDA M A, PALOMAR J, VIÑAS M, LOREN J G. :

Clonality of multidrug-resistant nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*.

J Clin Microbiol 1996; **34**:2760-2765.

GILSDORF J R, McCREA K W, MARRS C F. :

Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization.

Infect Immun 1997; **65**(8):2997-3002.

GILSDORF J R. :

Antigenic diversity and gene polymorphisms in *Haemophilus influenzae*.

Infect Immun 1998; **66**(11):5053-5059.

GILSDORF J R, MARRS C F, FOXMAN B. :

Haemophilus influenzae: genetic variability and natural selection to identify virulence factors.

Infect Immun 2004; **72**(5):2457-2461.

GÓMEZ DE LEÓN P, CABRERA-CONTRERAS R, CRAVIOTO A. :

Haemophilus influenzae b: una revisión sobre los determinantes de patogenicidad y de la respuesta inmune a la infección.

Sal Pub Mex 1991; **33**:504-512.

GÓMEZ DE LEÓN-CRUCES P, CABRERA-CONTRERAS R. :

Vacunas contra *Haemophilus influenzae* b: presente, pasado, futuro.

Sal Pub Mex 1992; **34**:274-286.

GÓMEZ DE LEÓN P, MOLINARI J L, CABRERA R, GÓMEZ D, CRAVIOTO J, CRAVIOTO A. :

Serum response to outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b in Mexican children with or without evidence of invasive disease.

Immunol Infect Dis 1995; **5**:238-243.

GOMEZ DE LEON P. :

Distribución de las secuencias del Consenso Itergénico Repetitivo Enterobacteriano entre cepas de *Haemophilus influenzae* aisladas de casos de enfermedad y de una población de niños vacunados. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias. UNAM. México. 2001.

GRANOFF D M, MUNSON R S Jr. :

Prospects for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease by immunization.

J Infect Dis 1986; **153**(3):448-461.

HIDALGO M, PARRA C, OVALLE M V, AGUDELO C I, CASTAÑEDA E. :

Correlación entre la tipificación capsular de aislamientos colombianos de *Haemophilus influenzae* por el método de aglutinación en lámina y la técnica de PCR.

Biomédica 2003; **23**:208-212.

HOISETH S K, MOXON E R, SILVER R P. :

Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are part of an 18-kilobase tandem duplication.

Microbiology 1986; **83**:1106-1110.

ISHIWADA N, CAO L D, KOHNO Y. :

PCR-based capsular serotype determination of *Haemophilus influenzae* strains recovered from Japanese paediatric patients with invasive infection.

Clin Microbiol Infect 2004; **10**:895-898.

KAPOGIANNIS B G, SATOLA S, KEYSERLING H L, FARLEY M M. :

Invasive infections with *Haemophilus influenzae* serotype a containing an *IS1061*-*bexA* partial deletion: possible association with virulence.

Clin Infect Dis 2005; **41**:e97-e103.

KELLY D F, MOXON E R, POLLARD A J. :

Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines.

Immunology 2004; **113**:163-174.

KILIAN. :

Haemophilus influenzae.

En: Manual of Clinical Microbiology. Balows A, Hausler W J, Herrmann K, Insenberg H D, Shadomy H J (eds). American Society for Microbiology, Washington DC., p 463-470, 1991.

KONEMAN E W, ALLEN S D, JANDA W M, SCHRECKENBERGER P C, WINN W Jr C (Eds). :

Haemophilus.

En: Diagnostic Microbiology. 5^a, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. USA., p 363-393, 1997.

- KROLL J S, MOXON E R. :
Capsulation and gene copy number at the cap locus of *Haemophilus influenzae* type b.
J Bacteriol 1988; **170**(2):859-864.
- KROLL J S, HOPKINS I, MOXON E R. :
Capsule loss in *H. influenzae* type b occurs by recombination-mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export.
Infect Dis Unit 1988, **53**:347-356.
- KROLL J S, ZAMZE S, LOYNDS B, MOXON E R. :
Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*.
J Bacteriol 1989; **171**(6):3343-3347.
- KROLL J S, LOYNDS B, BROPHY L N, MOXON E R. :
The bex locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export.
Mol Microbiol 1990; **4**(11):1853-1862.
- KROLL J S, LOYNDS B M, MOXON E R. :
The *Haemophilus influenzae* capsulation gene cluster: a compound transposon.
Mol Microbiol 1991; **5**(6):1549-1560.
- KROLL J S. :
The genetics of encapsulation in *Haemophilus influenzae*.
J Infect Dis 1992; **165**(1):s93-s96.
- LaCLAIRE L L, TONDELLA M L C, BEALL D S, NOBLE C A, RAGHUNATHAN P L, ROSENSTEIN N E, POPOVIC T, THE ACTIVE BACTERIAL CORE SURVEILLANCE TEAM MEMBERS. :
Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing.
J Clin Microbiol 2003; **41**(1):393-396.
- LUONG D, ISHIWADA N, TAKEDA N, KOHNO Y. :
Serotypes of *Haemophilus influenzae* strains isolated from pediatric patients with respiratory tract infections.
Tohoku J Exp Med 2004; **202**:245-254.
- MACÍAS P M, RODRÍGUEZ W M, SALTIGERA S P. :
Programa de actualización continua en pediatría inmunizaciones. Parte b Libro 5. ed. Academia Mexicana de Pediatría, A.C e Intersistemas, S.A de C.V. México, D.F., p 28-31, 1996.
- MONTESANO C R, FERREIRA G E E, GONZÁLEZ G M A. :
Manual para la vigilancia epidemiológica de las infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae*. Publicación técnica No. 20 de la DGEPI/SPCE, SSa. México, 1997.
- MOXON E R, KROLL J S. :
Type b capsular polysaccharide as a virulence factor of *Haemophilus influenzae*.
Vaccine 1988; **6**(2):113-115.

- MOXON E R, RAINEY P B, NOWAK M A, LENSKI R E. :
Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria.
Current Biol 1994; **4**(1):24-32.
- MUNSON R S Jr, KABEER M H, LENOIR A A, GRANOFF D M. :
Epidemiology and prospects for prevention of disease due to *Haemophilus influenzae* in developing countries.
Rev Infect Dis 1989; **11**(3):S588-S597.
- MURPHY T F, APICELLA M A. :
Nontypable *Haemophilus influenzae*: a review of clinical aspects, surface antigens, and the human immune response to infection.
Rev Infect Dis 1987; **9**(1):1-15.
- MURPHY T F, KIRKHAM C. :
Biofilm formation by nontypable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili.
Microbiology 2002; **2**:1-8.
- MURRAY P, ROSENTHAL K, KOBAYASHI G, PFALLER M. :
Microbiología Médica. 4th, ed. Elsevier Science, España., p 312-317, 2002.
- NIZET V, COLINA K F, ALMQUIST J R, RUBENS C E, SMITH A L. :
A virulent nonencapsulated *Haemophilus influenzae*.
J Infect Dis 1996; **173**(1):180-186.
- OMIKUNLE A, TAKAHASHI Sh, OGILUIE Ch, WANG Y, RODRIGUEZ A, St GEME III, ADDERSON E. :
Limited genetic diversity of recent invasive isolates of non-serotype b. Encapsulated *H. influenzae*.
J Clin Microbiol 2002; **40**(4):1264-1270.
- OVALLE M V, AGUDELO C I, MUÑOZ N, CASTAÑEDA E, GALLEGO C R, NÚÑEZ S, JARAMILLO E, PORTILLA V E, CANO M, GARTNER M, ALVAREZ M H, MORA G, RINCÓN P, UZETA M. :
Vigilancia de los serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Haemophilus influenzae* en Colombia, 1994-2002.
Biomédica 2003; **23**:194-201.
- PELTOLA H. :
Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates.
Clin Microbiol Rev 2000; **13**(2):302-317.
- PITTMAN M. :
Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*.
J Exp Med 1931; **53**:471-492.

- ROBBINS J B, SCHNEERSON R, SZU S C, YANG Y H. :
Prospects for polysaccharide-protein conjugate vaccines.
Ann Sclavo Collana Monogr 1986; **3**:213-232.
- ROBBINS J B, SCHNEERSON R, ANDERSON P, SMITH D H. :
The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Prevention of systemic infections, especially meningitis, caused by *Haemophilus influenzae* type b. Impact on public health and implications for other polysaccharide-based vaccines.
JAMA 1996; **276**(14):1181-1185.
- ROCHE J R, MOXON E R. :
Phenotypic variation of carbohydrate surface antigens and the pathogenesis of *Haemophilus influenzae* infections.
Trends Microbiol 1995; **3**(8):305-309.
- ROMERO-STEINER S, SPEAR W, BROWN N, HOLDER P, HENNESSY T, GÓMEZ DE LEÓN P, CARLONE G M. :
Measurement of serum bactericidal activity specific for *Haemophilus influenzae* type b by using a chromogenic and fluorescent metabolic indicator.
Clin Diagn Lab Immunol 2004; **11**(1):89-93.
- SÁNCHEZ S. :
Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella.
HAP Intl. Conf 1996; **49**:40.
- SELANDER R, MUSSER J. :
Population genetics of bacterial pathogenesis.
En: Molecular basis of bacterial pathogenesis. Iglewski B, Clark V (eds). Academic Press, San Diego, CA., p 11-36, 1990.
- SHIVELY R G, SHIGEI J T, PETERSON E M, DE LA MAZA L M. :
Typing of *Haemophilus influenzae* by coagglutination and conventional slide agglutination.
J Clin Microbiol 1981; **14**(6):706-708.
- SOSA-IGLESIAS E G, GIONO C S, ESCOBAR G A. :
Manual de procedimientos para el aislamiento e identificación de *Haemophilus*.
Publicación técnica No. 19 del INDRE. México, 1992.
- SOSA-IGLESIAS E G, GONZÁLEZ-MANCILLA S, JUÁREZ-AHUACTZIN E, LÓPEZ-MERINO A, CORONA-REYES D. :
Haemophilus influenzae infections in 2 hospitals in the city of Puebla, Mexico.
Rev Latinoam Microbiol 1995; **37**(3):189-199.
- SOSA-IGLESIAS E G, ANAYA-MEDINA A, PORTILLO-GÓMEZ L, BERMÚDEZ-GARCÍA G, GUTIÉRREZ-CAZARES Z, JUÁREZ-AHUACTZIN E, MANCILLA-GONZÁLEZ S. :
Biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* of clinical isolates from Mexican children.
Arch Med Res 1998; **29**(2):133-136.

- TANG C M, HOOD D W, MOXON E R. :
Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* infections.
En: Principles of bacteriol pathogenesis. Graisman E (ed.). ed. Academic-Press, San Diego, California. USA., p 675-716, 2001.
- TSANG R S, MUBAREKA S, SILL M L, WYLIE J, SKINNER S, LAW D K. :
Invasive *Haemophilus influenzae* in Manitoba, Canada, in the postvaccination era.
J Clin Microbiol 2006; **44**(4):1530-1535.
- URWIN G, KROHN J A, DEEVER-ROBINSON K, WENGER J D, FARLEY M M. :
Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* f: clinical and epidemiologic characteristics in the *H. influenzae* serotype b vaccine era. The *Haemophilus influenzae* study group.
Clin Infect Dis 1996; **22**(6):1077-1078.
- vAN KETEL R J, DE WEVER B, vAN ALPHEN L. :
Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification.
J Med Microbiol 1990; **33**(4):271-276.
- VILLASEÑOR-SIERRA A, HERRERA-BASTO E, VÁZQUEZ-SALAZAR P, ARROYO-MORENO J A, SANTOS-PRECIADO J I. :
Prevalencia de estado de portador de *Haemophilus influenzae* en niños de Ciudad Nezahualcóyotl, Estado de México, México.
Sal Pub Mex 1996; **38**:87-93.
- WELTMAN G, FOSSATI M S, CORREA C, REGUEIRA M, MOLLERACH M. :
PCR-based capsular typing of *Haemophilus influenzae* isolates non-typeable by agglutination.
Rev Argent Microbiol 2005; **37**(4):199-202.
- WENGER J D, WARD J I. :
Haemophilus influenzae vaccine.
En: Vaccines. Plotkin S A, Orenstein W A, Offit P A (eds.). 4th, ed. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA., p 229-268, 2004.
- WILSON S G, MILES. :
Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. 6th, ed. London: Arnold., p 1017-1035, 1975.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. :
Introduction of *Haemophilus influenzae* type b vaccine into immunization programmes; Management guidelines, including information for Health workers and parents. ed, Expanded Programme on Immunization of the Department of Vaccines and Biologicals. Geneva, Switzerland., 2000.

ANEXO 1

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 ₂ O	723.75 mL
Fildes	26.25 mL

Disolver el agar y la base de caldo BHI en H₂O. 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 ₂ 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 ($\approx 50 \mu\text{L}$) de fluido de Fildes. Conservar a -70°C hasta su uso.

REACTIVOS DE USO GENERAL

SOLUCIONES:

Tris-Base 1M

Tris-Base	2.11 g
H ₂ O	100 mL

Esterilizar a 121°C/15 min.

EDTA 0.5M

EDTA	18.5 g
H ₂ 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

Regulador Tris-EDTA (TE) para dilución de ADN

Tris-Base	10 mM
EDTA	1 mM

Acetato de amonio 7.5M

CH ₃ -CO ₂ NH ₄	29.49 g
H ₂ O	500 mL

N-Lauril-sarcosina 10%

N-Lauril-sarcosina	2.0 g
H ₂ O	20 mL

Hidróxido de Sodio (sol. saturada)

NaOH	35 g
H ₂ O	60 mL

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

Solución Hoechst (H33258) 1 mg/mL

Colorante H33258	10 mg
H ₂ O	10 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 H₂O. 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 ADN (Calf-Thymus ADN 1 mg/mL)

ADN	10 mg
Regulador TE 10X	1 mL
H ₂ O	9 mL

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

Stock ADN	100 µL
TNE 10X	100 µL
H ₂ 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 ₂ 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

Agarosa	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 H₂O. 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.

Estándar de peso molecular 100 pb (1 µg/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 ₂ O	10 µL

Regulador para corrimiento de geles de agarosa, TBE 5X

Tris-Base	54 g
Ácido Bórico	27.5 g
EDTA 0.5M	20 mL
H ₂ O	60 mL

ANEXO 2

Secuencias completas de los iniciadores del locus *cap* para cápsula tipo-específico (a-f) de *Haemophilus influenzae*.

Características: Localización/Propiedades

Organismo: *Haemophilus influenzae*

Tipo de molécula: ADN genómico

Cepa: RM107

db_xref: taxón:727

Cromosoma: Grupo de genes capsulares tipo a

Clon: pAD2

Unión de los iniciadores: a1-37..56 y a2-1..20

Observación: PCR iniciadores a1 y a2

```

1 TCTGATGACA TTTTAGAAGA AAATGCTATT GATAAACTAC TCATTGCAGC ATTGCTGAA
61 AATGCGGATT ATATTTACGG TGGCATCAA AAATTTAATA AAGAA

```

```

1 CAGAAGATCA GGTCAATATC TTCAATATAT TTT

```

Organismo: *Haemophilus influenzae*

Tipo de molécula: AND genómico

Cepa: RM135

db_xref: Taxón:727

Cromosoma: Grupo de genes capsulares tipo b

Clon: pAD2

Unión de los iniciadores: b1-2246..2268 y b2-5706..5727

Observación: PCR iniciador b1 y b2

```

1 TTTCTCATTG ATTTATCATC TCACAAGTAA GGAATACAAG TGCTTAAATT TGCAAATCGG
61 CTGCAATCC ACCACACCTC TATGCGTAAA CACAGTCGGA AGAGTATAGC ATTTATTCTA
121 AAGGGGAAAA ATATTATTCA CTGTGACTGT CTTTATACAA ATTATATACT TCGAAAAATT
181 ATGCAATATA ATATTTCTAA ATAATCAAGG TTAACATTTT AACACCCATC TATAAGAAAA
241 ATGATATAAT TGCAAGAATG GATAGCAGGG TTATTCATTA AATGTTAAAA ATAAAGTAGA
301 TTTTGAATT TCCCTGAAA AAACGTGTAT GTTTGGCTAC ATTTTTGCCT ATAAAAAACC
361 AAAATAGTTG GGTGTTTAAAC ATTGTTTCTA CTCTTACCTA AACGTATTTC CAATTAATCT
421 CTGGAGAATT AATATGAATA AAAATAAAAA CATAGGAATC ATTCTAGCTG GTGGTGTGG
481 CTCTCGTATG GGATTGGGCT ACCCAAACA ATTCTCAAAA ATTGCAGGCA AAACGCGCT
541 GGAGCATACT CTTGCCATTT TCCAAGAACA TAAAGAAATT GATGAAATTA TCATCGTTTC
601 TGAGCGTACC TCTTATCGTC GTATTGAAGA TATCGTATCA AAGCTGGATT TTTCCAAAGT
661 TAATCGTATT ATTTTGGTG GTAAAGAACG CTCTGATTCT ACTCTTCTG CAATCACAGC
721 TCTTCAAGAT GAACCAGAAA ATACGAAATT AATCATTCAT GATGCTGTAC GACCTTACT
781 AGCGACTGAG ATAATCTCTG AATGTATTGC GAAATTAGAT AAGTACAATG CTGTAGATGT
841 GGCTATTCCT GCAGTTGATA CCATTGTTCA TGTTAATAAT GATACCCAAG AAATTATTAA
901 AATTCCTAAG CGTGCTGAAT ACTACCAAGG CCAAACCCA CAAGCATTTA AACTAGGCAC
961 GCTAAAAAAA GCTTACGATA TTTATACACA AGGTGGCATC GAAGGTACTT GTGATTGTTT
1021 TATTGTGTTA AAAACCCTAC CTGAAGAAAG AGTTGGTATC GTTTCAGGTT CTGAAACCAA
1081 CATTAAATTA ACTCGCCAG TTGATCTTTT TATCGCTGAT AAATTATTC AAAGCCGTAG
1141 TCATTTTTCA CTACGTAATA TCACCTCTAT TGATCGCCTA TATGATATGA AAGATCAGGT
1201 ATTAGTTGTT ATTGGTGGAA GCTATGGTAT TGGCGCGCAT ATTATCGATA TTGCAAAAAA
1261 ATTTGGAATT AAAACATATA GCCTTAGTCG TTCAAATGGT GTCGATGTTG GTGATGTTAA
1321 GTCTATTGAA AAAGCATTCG CAGAAATTTA CGCAAAGAA CACAAAATAG ACCATATCGT
1381 AAATACTGTC GCGGTGTTAA ATCATAAAAC GTTAGTATCA ATGTCTTATG AAGAAATTTT
1441 AACTAGTACT AATGTAAACT ACACGGGCAT GATTAATGCT GTGATAACGG CTTATCCTTA
1501 CTTAAAACAA AACTATGGTA GTTTTTTAGG TTTACATCA AGCTCGTATA CACGAGCCG
1561 TCCATTCTAT GCTATTTACT CTTCTGCAA AGCAGCTGTG GTAAACTTAA CTAAGCCAT
1621 CTCTGAAGAA TGGTTACCGG ATAATATTAA AATTAACCTG GTTAATCCAG AGAGAACAAA

```

1681 AACACCAATG AGAACCAAGG CATTTCGGTAT TGAACCTGAA GGTACATTAC TTGATGCTAA
1741 AACAGTAGCT TTTGCCTCTC TTGTCGTA CT TGCTAGCCGC GAGACGGGTA ACATCATTTGA
1801 TGTGTATTA AAAGATGAAG AATATATTAC CAATATTTTA GCTGATCTCT ATAAATAAAC
1861 TTGAGTAAGT CTGTTATGGC TATCCCCCCC TATTTTATTT ATTTGGACAC CAAGATTATT
1921 GGTGCGGTAA AGCAACAAT TACTTTTTTTT GAACATGGCG TGTTCCTCG TGAAAACACG
1981 ATCATTTTAG TAAAAAAGTA TAAACATAAG TCCGCTAAAA TCATTGAGCG AGCTTTAAAT
2041 AAAGCTTCTC TCAACTATCA TTTTGTGAAT GCTGCATATC TTGATGCATT GAAAGAAGGT
2101 GTAATTTTCT ACCCATTTAA TGCACAATCT AATTGTCGTG CAGTAGCAAA CCGTAACTTT
2161 ACTCATATTT TTATTACTCA TGGGGAAAGT AATAAAATTA CTTCAGTTAA ACCGATTGTA
2221 CGTATTTTAT ATCATGTTAT TACCGCAGGT AATGCCGGCA TAGATCGCTT GATTGCTCAT
2281 AAAATCTTCT CTCAATATGA TGTGAGGCT GGAAGAATTA TTCTTATGGG CGATACTTTT
2341 ATCGGAAAAA CCGGTCTAGA CCACACAGGT AAAGGCATTC CCGCCATCTT CTATGTGCCA
2401 ACATGGGAAG GTGGCATAGA ACAAGAAAAC TATTCAAGCT TGTCTTATGT AGGGCAAGTA
2461 ACAAACACCT TGCTCCTATT AAGTAAACAC TATCAAATCA ATGAAATCGT TATTCGACCA
2521 CATCCGAATA CAGGACATCG TCTGCAAAAT TATCATCAAT TTTTAATGGA TATTGTAATA
2581 ACACTTTTAC ATAAAGGATT AAAGGTGACA TTATATAAAC CTCATGTAGG GCTTACATTC
2641 TCACAAGCTT GGAACACTAG ACGAAATGGG GGTACATTAA CTTCCGATTT AAGCAAAATTT
2701 TATGCAATTA TTGGGCTTTG TGATATTTCA GCTATAGAAA GTCAATTTAT AAATGAAAAAT
2761 ATTTTCTATT ATTTATTTTG TTCAAAAAGCA CAAAAAGAAT ATTTAATTAG TTTAAAAAAC
2821 AGCCAATACT ATAAAACAAA TACTCTCACT TTTGGTGAGA AGCTTTATTT TCACCATATA
2881 TCAAAAGACG ATTTTATCA ACTTCGCAAT TATATGATAG AACAAAAATTA TTTGAATATT
2941 CCACTTAATC AACGAATTGA ACAACTTCTA GCAAAATTAAT ATCAATTATA AAGGTACATT
3001 TTATTATGAA AACTTGGTTA TTTGGCTCTT ATGCTTGGCA AGGAAATCCT AAGGCTTTAT
3061 TCCTGTATAT GCTTGTAAAT TGTAAGAAA CCCACGAATG CTGGTGGGTT CGAGACAACG
3121 AAGAAAAGCAT GAAAGATATA AAAAAATCTA CTGGCTTAAA AAACATTACG TTTACCATA
3181 GTGAAAAGC TAAAGAACTT TTCCCTCATG CCGACGTTTA CGTAACAGAA AACTTCCGTG
3241 AAAGTTATCC AGTTTACATG AATGAAAATA TCAAAGTTTT CAACACATGG CATGGCGTTG
3301 GTTAAAAACA TATTGAATTA GCATTAGGCA TGAATTCAGT ATTAGCTGAA AGCATTGTTT
3361 GAAAAATATG TCGAAACTAT GATATCTACA AAAATAATGT ATTTGTTCTT ACAACATCGC
3421 AAGCAATGGA AGATCACTTC CTTGAAGATA TGGCGATCAG TAAAGAACTA ATTTCCGCG
3481 GGAAATACCC TCGCAATGCA GTTTATGGTC CTAATGGGAT CCATACCTAT GATATCAATA
3541 CGCTTTTACC AAAAAATAAA AGCCAATATA GCCAACTAT TCTTTTCTGC CCAACTTATC
3601 GTATTGGTGC AATCCAAGGT GTTTTAAATA GCCTATTACC AGATTTTGCT AAAC TTGAAG
3661 AAGTTTGCCG TCATAAAAAT CAACTATTCA TCGTTAAAGT TCACCCGTTT ATGAAGAAAG
3721 ATAATTACTT CGCTGAAATG AGTGAAAAAT ATAAAGATAG TGAATACATC CTATTTTGGA
3781 ATGATGACTA TGATATTTAT GAGGCATTC AATTCTATCGA TCTCGCGATT ATTGACTATT
3841 CAAGTACTTT TTATGATTTA TTAGATGCTG GCGTTGAAA ATTCATTCGT TATGTACCTG
3901 ACTTAGATGA ATACCAGAAT GATCTTGAGC TAATTGGCGA TTATGCCGAT TTAACAGAAG
3961 GTCGCATCGT TAAATCATTC CAACAATTAT TAAATTGTTT AGATAATGCC AACATTAATA
4021 TCATTTCAAC AAAAAGAAAA CAATATCTTA TGGATTATTT CTTTGGATTT AAGAAAGAAA
4081 ATAAATCAAT GGAATCTTTA ATTGCAGATG TTGATAATTG CCAATTACAA CCAAAATCGT
4141 TAAAAGAACT CCATACATTT GATATTTTTG ATACCTTAAT TCGCCGCTCG TCATTACGTC
4201 CATTTAGTAT TTTTGACTAT GTACGCATA AAGCTAAAGC ATCAGGTATC AAATTTCCCG
4261 TTGCATTTGAC TGAAAATTGG ATCAATGTAC GTAACCGTGC TGAACACGAT GTGCGGATA
4321 TCATGCGTAA AACAACGTTT GAGCGTCAAT CAGATAAAAT TGAGATTACA TTAGACGATA
4381 TCTACACTCG CTTGCAAAAA AATCTATTAC TTACCGATGA ACAAACGAT TTCTTAAAAAC
4441 AAGCTGAAAT TGAAGCTGAA ATTGCTCATG TTGAGCCAAT TCAAAAACGA ATTAACATC
4501 TCTTCTCGTT AAAAGCGAAA GGACATGATG TAGCCATGGC TAGCGATATG TACTTGCTG
4561 AAGACGTAAT TTATAAAATG TTAGATCGTG CGGATACTCG TTTACGTGAA ATTCCACTTT
4621 ATCTTTCAAG TACGATTGGC TACCAAAAAT CAACTGGGAA ATTATAACCA CACATCTTTT
4681 TCGACTTAGA TTACCAATAT AGCCGTTGGA CACACTATGG CGATAACAAA CACGCTGATG
4741 GTTCTGTTCC TCGCCGCTTT GGTATTCAAA CTGCAGTGCA TGATATTGAT GATTTTATCC
4801 CATTTGAAAA TGCAATGGTT AATGCAATGG ATAACTATAA CCGCTATCCA GCTTACCAGC
4861 TTGCAACTAA GATGCATCGT TACCGCACAC AGCTTGTTC AAAAAATGGT TTCGGTAATA
4921 CCTATTTTGA AACCAAATAT TACAACATG CTTATGTAGG CGCCTCTTTT GTTCCTTATA
4981 TCAACTGGGC AATTAAGAT GCAATTAAC GCGGCTATGA AACCATTTAC TTTATCTCTC
5041 GCGATGGGCA TTTCTTAAAG CAAATTGCTG ACAAATTTAT TGAATTCGT GGCATAACG
5101 TAAAAACAAA ATATATCTAC GGTTCACGTA AAGCATGGCG TTTACCTTCT TTCATTACCA
5161 AAGTTGATGA TGAACCTTC TGGCAATTTT GTAACCTTGT CGGTATGGAT AGCTTTGAAG
5221 ATTTGGTGAA AGCCAGTTAT TTAAGCGAAA GTGAACCTTT ATCTCTCTT CCTGAATTTG
5281 AAAGTTTACG TCATGCCAAA CACCTTCGTG GTGAAATAGC TGAAAACATT CGTAAAAATTT
5341 TCAAAAATTC ACCCGCTTAC CATGAGAAAG TGTTAGCGAT CGCCGCTGAA AAACGCAAAA
5401 TGGTACGCCA ATACATTCAA CAAGAAATTA ATCCAAAAGA AAAATTTGCG TTTGTTGAAT

5461 TCTGGGGGCG AGGCTATACA CAAGATACCT TTGGTCGTCT GCTAAATGAT GCCTTTGGTA
5521 AAGAAGTAAA AAACCCATTC TATTATGTCA GAAGTTTTAC TGATGATATG GGTACATCTG
5581 TTCGCCATAA CTTCATCTTA GCACCACAAA ACTTCTCATT CTTCGAGCCT ATTTTTCAC
5641 AAACCCATA CGACAGTATT CCTGATTACT ACGAAGAAAA AGGCAGAATT GAACCAATTA
5701 TTAATCACCAG AGATAGAAGC GTAAGCGATC TCATTTTCGGA AGGGTTATTA AAATTTACAG
5761 AAGATTACTT AGCACTCAAT ACGCAAGACG AAGATTACTT TGATGCAGCA TTATCGCAAT
5821 TTAACTATCA ATATCAGTTA AATACACCAA ATGATCAAT TATTTGCAAT GTATTCACTG
5881 AATTA AAAAGA TAACATTTCA AGTTTTGGTG TAGAAAAACC TTATGCACCA GCATTAACGC
5941 TGAAACAGCT TGAAAGTATC ACCTCTAAAC AAGAGCTGGA TAAACTGACT CAATCAATTC
6001 CTATCTCACT CTCAAAAAGT GATGTAAAAA TAATTGATTA TTATAATAAA ATTCAGAAAA
6061 ACTATAATTT ACCGGCATAT AACAGCACAC CAATGCGTAA AGCTTATGCA GTAAACCCAT
6121 TAGAACATA TGTTTGGAGC ACACAGGTTT CATTTAGAGT ACTTTCATTA AAACAAAACA
6181 GCTTCTATTT AGATGTGAGT TTTGCTGAAA CGACCAAACG AAAAGATATT TTCTTAAAAG
6241 AATTA AATGA AATCGATGTT ATTGCCGTTG ATTGGTTAAA AGGCGGGGTT CCGCGTTTAT
6301 TAACAGAGCA CGGATATATT ACGGCTCATA AAGACTGGGT AAAAAAATCA TTTAATGATG
6361 AAAAAACCAA TAATATTGAA GAACCTAAGG TAAAAAATAA AGAGAAAAGT AAGGTACTAG
6421 AAGTAAATAC TACTGTAACC AATAACAATA AACAAGCTAT TGGTAAGTTA GATAATAATA
6481 TTGATAAGTC AAATAAAGAG CAGAAGAAAC GTAAGCTAGC TAGAAATCCT TATGCTTTT
6541 TCAATGATTC TAAAAAACCT ATATTAAATA GTCTTAAGCA TTTATTTAAT GAGAGCCATT
6601 CCTTAGGCAG ACTTCTAAGT AGGATTGTTA GAAAAACACT TAACCATGAT TAATAATCAG
6661 GACAATTTAA TGAATATTAA AAATATAGCA ATTAACTTTT CATCTAAAAA AGATTTTCTA
6721 AATAATTTTG GTAAAAATTA TAATGAAAAA ACGAGCTTAT CCATAATAAA TAAAAACGAG
6781 ATTATTATAA AAGGTAAAAA AAATGATAAT TCTCTTAACT TTACTTTTAT AAAAAATAAA
6841 AAATATTTAA AACCTGGGAA GACTTAACT ATTTCCGTGT ATTTTATCT TAATAAAAAA
6901 ATATCTAAAA CATTACCTTT TGATGTTCCCT AAAATTGCTT TTGATTGTAC AATTAATGGA
6961 AAAGATAACT TTGACTATCA ATCTAGCTCA TCTATTCCTA ATGAAGTGGG AGTTTGGCAT
7021 AAATCTTTGA CCGTCAAAGT TCCTAAAAAT TGTTCTAATG CATGGTTTAG AATTTATGTG
7081 GGAATAGAAA AAGATGCTGG CGAATTATTA ATAAAAATA TTTTTATATC AGAGAATAAC
7141 TTTGATTTCA TTTACTTAAA TAATCTATTC TATCACAATG AAGATAATGA TACTTTTCT
7201 TTATTATCTG ATTTCAAAGA AAATATATTT GAAAAATGTA ATGATGTATC TTATCTCTTT
7261 AGAAATGGAC ACTACACATT CGTCAACTCA ATCATTAAAA ATATTAATGA TAGTGCAATA
7321 AGAAAAAAT TTAAGTTATA TTTAGTTATG TCAAAAGAAA ATGTATCGGG TACATTAGCT
7381 TACTTTAACA ATATTAAAAA TGAACCTAAC GAGCAAGATT CTGTTTTAGC TTCTGACGCA
7441 ATACATTTTT TTGCTAGAAA TTTAAAATGG GACACAATTA AAGATATAGT AAATTTTTTC
7501 GATAAAAAAG GATTGTACCA CAACTGCATA GAATATTTAT ATGAGAAGGC TCAGCTTTAT
7561 AGAAGATTAA AAGATAAAGA AAATGAATTA AAATACTATA ATCTTGCAAT ATCCATAGAT
7621 GAAAAATAAA ATCCAAATAT AAATTGGAAT CTATTTTTTG ATAGTAATA TCCAGGTCTA
7681 AGCTATAGAA GAGATGAATT AAAGTTTATT CTAGAAAAC TATCAGACAT ACAGAGAATT
7741 GCCGATTCCT ATCCTTCTTC TCATATCAAC TTTAAAGAAT CGCCAGTTTT TGCTTTTGG
7801 GATCAAGGAT ATGATAACGC GCCGCTCATA GTAAAATCTA TGATAGACAG AATGAAAATA
7861 ATATATGGTA ATAAACTGGT ATTTCTTACT GGAGAACTA TAGAGGCTTA TATAGATATA
7921 CCGGCTAGAA TAGAAAGTTT CAGAGAATCT AAAAGAGCCT TTTTCTCAGA TTATATTCGT
7981 ACAGAATTAT TATTGAGATA TGGTGGTACT TGGATAGATT CAACTGTATT CACAACGAAT
8041 CAATTTTATA AAGAGAATTT AGAAATATTA GAAAAAATG ATAATAATCT ATATGTACTA
8101 AGAATTCCTG AAAATCCATA CCGAATTTCT AATTGGTTTT TATCAACAAA CCAAACGGA
8161 AATAGAATAC TGGCTTTAAT GTATGCAACT ATGTTGATTT TTGCTGAAAA AAGAAACAGT
8221 CTATTTGAAT ATTATCAATA CCATACCTTT TTTGAAATCT TAACACAGTT AGATAAACAA
8281 GCTAATGAAG ACTTTCATAA AAATTATAGA AATAACTATC AACCTTATGC ACATGATGTG
8341 TTA AAAAAT TTAGAAATGA TTGGGATAGA GAGTTATTTA ATAAACTAAT TGCTTGCTGT
8401 CCAATACAAA AACTGACATA TAAATCTAAT TTATTACACT TAAGAACACA TTCTTTTAC
8461 AAAACTATTA TTAGAAATGC AGCTTTTTTA TAAAAGCCAA TCTAAACTTT TACTTAAGCA
8521 GTCATATTTT CATGATTTTT TCAAAATGCT GAAAAACATG ACCGCACTTT TACCCAGGAT
8581 AACTAGAATA AAATCACCAT GCCAACTGCA CTGATTTTTCT CGCACGGAAT CAAAAAAT

Organismo: *Haemophilus influenzae*
 Tipo de molécula: AND genómico
 Cepa: RM127
 db_xref: Taxón:727
 Cromosoma: Grupo de genes capsulares tipo c
 Clon: pJSK77
 Unión de los iniciadores: c1-34..53 y c2-17..36
 Observación: PCR iniciadores c1 y c2

```

      1 AATTATTAAA CTTTAAAAAT AATATATTTA TTATCTGTGT AGATGATGGT TCAGTAGATG
    61 CAGCTAAGAT TATTAAAAAA TGGCAGCGTA AATATCCTAA AAAATATCAC ATATATCTAT
   121 AA
      1 AAATATCAGA GAATGTTCAC TAATAGCTTG CCTCTGTTT
  
```

Organismo: *Haemophilus influenzae*
 Tipo de molécula: AND genómico
 Cepa: RM128
 db_xref: Taxón:727
 Cromosoma: Grupo de genes capsulares tipo d
 Clon: pJSK68
 Unión de los iniciadores: b1-7..27 y b2-133..152
 Observación: PCR iniciadores d1 y d2

```

      1 TTTTATTGAT GACCGATACA ACCTGTTTAA ATTTAAGAAT GGTGTAAAA CTCTTCTTAG
    61 TGCTGAATTA AAAAATACTG ATTTCTTAGA TAAAAATCAA CATAACGGAG AAATAATTTC
   121 TGGATTCTCT GA AGAATGGT TTGAAGAGTG GAAAA
  
```

Organismo: *Haemophilus influenzae*
 Tipo de molécula: AND genómico
 Cepa: RM129
 db_xref: Taxón:727
 Cromosoma: Grupo de genes capsulares tipo e
 Clon: pFTe3
 Unión de los iniciadores: e1-22..41 y e2-27..46
 Observación: PCR iniciadores e1 y e2

```

      1 GTTGAAAACA AACCGCACTT TGTAACGAA TGTAGTGGTA GTTAGATATG AAAGGGATCT
    61 GGTAATTTAA GATAA
      1 AGTTAATGTT AATGTTGTTA TACATAGGCTT TACTGTATAA GTCTAGAA
  
```

Organismo: *Haemophilus influenzae*
 Tipo de molécula: AND genómico
 Cepa: RM130
 db_xref: Taxón:727
 Cromosoma: Grupo de genes capsulares tipo f
 Clon: f1-pFTf1 y f2-PFTF4
 Unión de los iniciadores: f1-23..42 y f2-32..51
 Observación: PCR iniciadores f1 y f2

```

      1 TTATCTTGGG TATAAGGTTA TTGATTGGA CTTGATAGTA CCAAAAACAG AGGCCTATTT
      1 TCGACGGTAT CGATGAATCA AAGAGAATAA ACGCAATTAT GGAAGAAAGC TTTCTATTTT
    61 AAGAAGGAAA AGAAGTAAAA GTATATAATG CTGGAGTATC TGGTTCTA
  
```