



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

---

IDENTIFICACIÓN DE LOS LINAJES SERORESISTENTE Y  
SEROSENSIBLE DE *Moraxella catarrhalis* EN AISLADOS CLÍNICOS  
DE POBLACIÓN MEXICANA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACEÚTICO BIOLÓGICA

PRESENTA:

FRANCO MARTÍNEZ MARTHA NAYELY

ASESOR: Dra. CAROLINA MARÍA ANTONIETA ROMO GONZÁLEZ

COASESOR: M. en C. ANDREA ANGELA BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación de los linajes seroresistente y serosensible de *Moraxella catarrhalis* en aislados clínicos de población mexicana.

Que presenta la pasante: Martha Nayely Franco Martínez

Con número de cuenta: 305009980 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de Abril de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm\*

## **DEDICATORIAS**

Dedico este trabajo a:

José de Jesús Franco Cuellar y Martina Martínez Castro, mis padres agradeciendo infinitamente el haberme dado la vida, su amor, educación y apoyo incondicional encaminándome siempre a la superación

José Juan Franco Martínez mi hermano por su amor, confianza y apoyo.

Martha Nayely Franco Martínez por su capacidad, tenacidad, esfuerzo y amor propio para lograr con éxito cada una de las metas que se propone.

Alison Patiño Franco mi hija hermosa a quien amo infinitamente y por quien ejerceré con entereza mi carrera para darle lo mejor de mí y encaminarla siempre hacia la felicidad.

Gustavo Patiño Vaquero por su amor y apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTO**

Dra. Carolina Ma. A. Romo González por su dirección en la realización del presente trabajo, confianza, apoyo y amistad.

M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya por su dirección y colaboración en el presente trabajo.

Q.F.B Lucía Álvarez Núñez por haberme encaminado a lo largo de mi carrera siendo siempre un gran ejemplo a seguir.

Q.F.B. Yolanda Ibarra Ortega, amiga gracias por haberme invitado a la participación de este proyecto y por todo el apoyo que me has brindado.

Pablo Antonio Pérez García y David Olguín Luna mis grandes amigos con quien disfrute los mejores momentos en la carrera. Los quiero.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	6
1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	10
2.1. Características Microbiológicas de <i>Moraxella catarrhalis</i> .....	10
2.2. Clasificación Taxonómica.....	10
2.3. Epidemiología.....	12
2.4. Enfermedades Asociadas a <i>M. catarrhalis</i> .....	12
2.5. Variación Estacional.....	14
2.6. Infección Nosocomial.....	14
2.7. Sensibilidad a los Antibióticos.....	15
2.8. Aspectos Moleculares de <i>Moraxella catarrhalis</i> .....	16
2.8.1. Adhesión al Epitelio del Hospedador y Componentes de la Matriz	
Extracelular.....	17
2.8.1.1. Los OMPS.....	17
2.8.1.2. USPAS.....	17
2.8.1.3. MID/HAG.....	19
2.8.1.4. McaP.....	20
2.8.1.5. OMP CD.....	20
2.8.1.6. Proteína MhaC.....	20
2.8.2. Estructuras Expuestas a la Superficie.....	21
2.8.2.1. TFP.....	21
2.8.2.2. LOS.....	21
2.8.3. Invasión del Epitelio del Hospedador.....	22
2.8.4. Formación de Biofilm.....	22
2.8.5. Evasión del Sistema Inmune del Hospedador.....	23

2.8.6. Resistencia al Complemento.....	23
2.8.7. Inhibición de la Respuesta Proinflamatoria Inducida por TLR2.....	26
2.8.8. Adquisición de Nutrientes.....	26
3. HETEROGENEIDAD DE <i>Moraxella catarrhalis</i> .....	27
4. JUSTIFICACIÓN.....	30
5. HIPOTESIS.....	30
6. OBJETIVO GENERAL.....	30
6.1. Objetivos Particulares.....	30
7. MATERIAL Y METODOS.....	31
7.1. Obtención de Muestras Clínicas.....	31
7.2. Aislamiento, Identificación y Purificación de <i>M. catarrhalis</i> .....	33
7.3. Conservación de las Cepas de <i>M. catarrhalis</i> .....	36
7.4. Extracción de DNA.....	36
7.5. Determinación del Gen 16S rRNA por PCR.....	37
7.6. Determinación de Tipos 1, 2 Y 3 del 16S rRNA por RFLP.....	38
7.7. Clasificación de los Tipos del 16S rRNA.....	39
7.8. Clasificación de los Linajes.....	40
8. RESULTADOS.....	41
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	46
10. CONCLUSIÓN.....	48
11. ANEXO 1. RESULTADOS GLOBALES.....	49
12. ANEXO 2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	58
13. BIBLIOGRAFÍA.....	60

## **ABREVIATURAS**

AST+ X Agar Soya Trypticase más Extracto de Levadura

ATCC American Type Culture Collection

BHI Brain Heart Infusion

CEACAM Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule

CMI Concentración Mínima Inhibitoria

DNA Deoxyribonucleic Acid

ECM Extracellular Matrix

EPOC Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

FspBI (Bfal) *Flavobacterium species* RFL1

GM-CSF Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos

Hhal *Haemophilus haemolyticus*

ITIM Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

LOS Lipooligosaccharide

MAC Membrane Attack Complex

*M. catarrhalis* *Moraxella catarrhalis*

MhuA Proteína de Utilización de Hemoglobina A

MID/HAG *Moraxella* Immunoglobulin D-binding/Human-erythrocyte Agglutinin

MLST Multilocus Sequence Typing

MT Membrana Timpánica

Oca Oligomeric coiled-coil adhesins

OMPS Integral Outer Membrane Proteins

OM Otitis Media

OMP CD Outer Membrane Protein CD

PCR Polymerase Chain Reaction

PRRs Pattern Recognition Receptors

rRNA ribosomal Ribonucleic Acid

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism

TCA Tricarboxilic Acid

TFP Type IV Pili

TLRs Toll Like Receptors

TPS Two Partner Secretion pathway

USPAS Ubiquitous Surface Protein A Proteins

UspA1 Ubiquitous Surface Protein A Proteins 1

UspA2 Ubiquitous Surface Protein A Proteins 2

UspA2H Ubiquitous Surface Protein A Proteins 2 Hibrido

## 1. RESUMEN

*Moraxella catarrhalis* es un patógeno oportunista del humano,<sup>32</sup> diplococo Gram negativo, que causa infecciones del tracto respiratorio superior en niños e inferior en adultos.<sup>26</sup> Diversos estudios epidemiológicos indican que los aislados de *M. catarrhalis* son genéticamente diversos y como consecuencia se han descrito dos linajes filogenéticos distintos.<sup>9</sup> El primero es el serosensible, se caracteriza por moderada virulencia y lo componen cepas que son sensibles al complemento, estos aislados contienen el gen 16S rRNA con un patrón de restricción clasificado como tipo 2 y 3. El otro linaje es llamado seroresistente y se caracteriza por estar asociado con mayor virulencia, por su resistencia al complemento. Este tipo de cepas presentan 16S rRNA con un patrón de restricción tipo 1.<sup>9,67</sup> En México, *M. catarrhalis* no es considerada como un patógeno por lo tanto, no se ha descrito nada acerca del tipo de linaje que está presente entre los aislados de muestras clínicas que infectan a niños y adultos. El objetivo de este trabajo fue identificar los linajes seroresistente y serosensible en aislados clínicos de *M. catarrhalis*, mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), para determinar su prevalencia en población mexicana. Se obtuvieron aislados de *M. catarrhalis* provenientes de exudados faríngeos de 32 pacientes; de los cuales se realizó la extracción de DNA y la determinación del linaje mediante PCR y RFLP. El 68.8% de los aislados fue PCR positivo para el gen 16S rRNA y el 31.2% alguna (s) de sus clonas no amplificó el gen. De acuerdo al patrón de digestión por el RFLP 22 pacientes en los que se identificó un solo linaje el 9.1% corresponde al seroresistente, del cual el 100% fueron niños; el 86.4% fue serosensible, del cual el 57.9% fueron adultos y el 42.1% niños y el 4.5% fue indeterminado. De los 32 pacientes el 31.2% presentaron infección mixta en cualquiera de las siguientes combinaciones serosensible/seroresistente el 20%, serosensible indeterminado 10%, seroresistente/indeterminado 60%. Por otro lado el único paciente que fue indeterminado corresponde a un niño de 6 años. El linaje serosensible fue el más prevalente en toda la población; el seroresistente tiene alta prevalencia en niños. Se identificó infección mixta, presentando más de un linaje en un mismo paciente así como linaje indeterminado lo cual resulta interesante seguir estudiando para

analizar el grado de patogenicidad que puede estar causando. En la población de México se encontraron aislados de *M. catarrhalis* virulentos, por lo que es importante diagnosticar la bacteria en los pacientes, sugerir el tratamiento adecuado y llevar a cabo métodos de prevención para evitar el alojamiento y la resistencia en el hospedador.

## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1. Características Microbiológicas de *Moraxella catarrhalis*.

*Moraxella catarrhalis* es un patógeno oportunista exclusivamente del humano,<sup>32</sup> diplococo Gram negativo, no encapsulado, aerobio estricto, productor de las enzimas oxidasa, catalasa, DNAasa y lipasa, capaz de hidrolizar la tributirina, reductor de nitratos y nitritos y no fermentador de los carbohidratos (glucosa, sacarosa, maltosa, fructosa y lactosa).

Las colonias en agar sangre son no hemolíticas, blancas, opacas, circulares, de 2 mm de diámetro, convexas y de borde completo. La colonia permanece intacta cuando se empuja a través de la superficie del agar (puede ser desplazada como un disco de hockey).<sup>64</sup>

### 2.2. Clasificación Taxonómica de *Moraxella catarrhalis*.

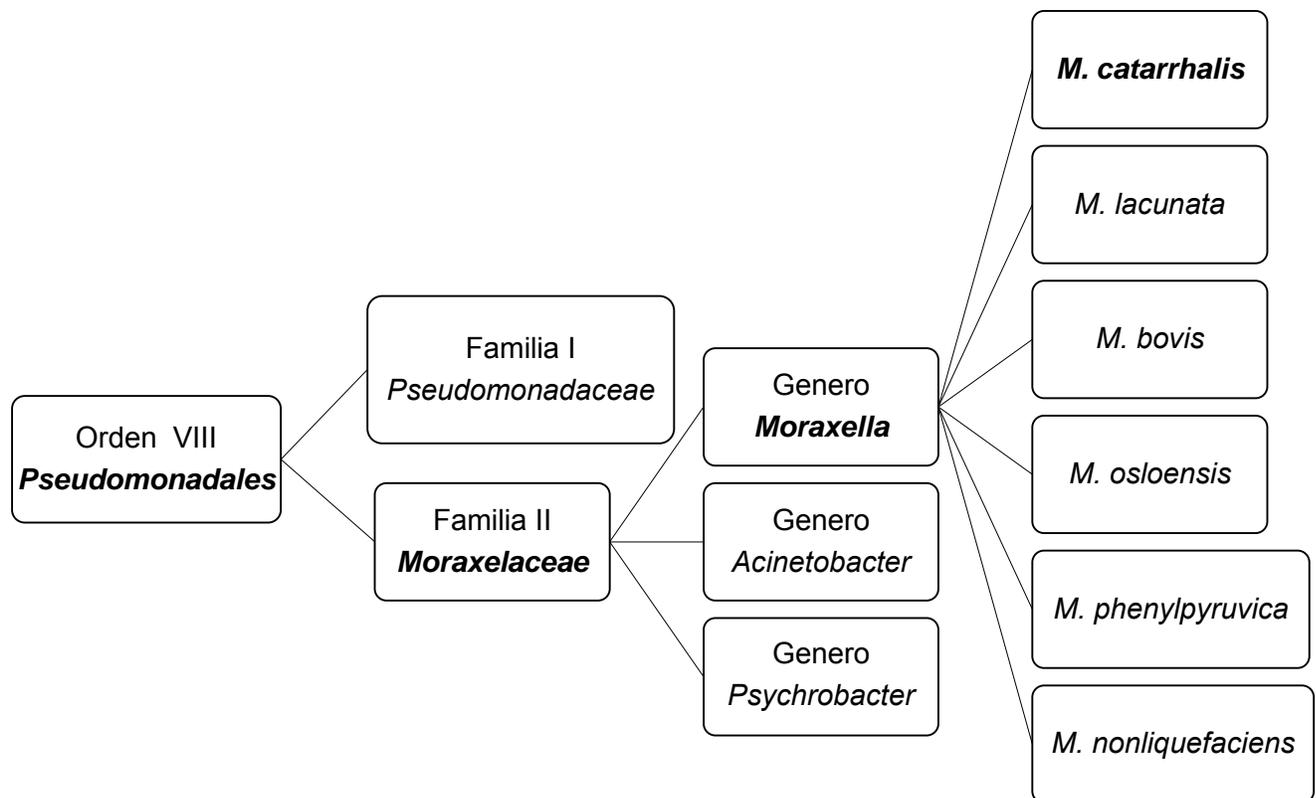
Inicialmente, *M. catarrhalis* había sido considerada como una bacteria comensal, que formaba parte de la flora normal nasofaríngea. Debido a su morfología, esta bacteria fue englobada en el grupo de las *Neisserias* no patógenas de la orofaringe. El nombre de esta especie ha cambiado a lo largo de los años así como su clasificación taxonómica.

*M. catarrhalis* fue descrita por primera vez en 1896 por Ghon y Pfeiffer y nombrada como *Micrococcus catarrhalis*. Posteriormente, se clasificó como *Neisseria catarrhalis* basándose en la similitud de sus características fenotípicas, morfología de las colonias y nicho ecológico con las especies de ese género.

Berger, en 1963 demostró que el género originario *Micrococcus catarrhalis* contenía realmente dos especies distintas: *Neisseria cinérea* y *Neisseria catarrhalis*. Ambas especies se podían distinguir entre sí por las pruebas bioquímicas de reducción de nitratos, nitritos y la hidrólisis de tributirina.

En 1970, basándose en la diferencia en el contenido de ácidos grasos y mediante estudios de hibridación de DNA, se demostró la escasa homología que existía entre *N. catarrhalis* y las llamadas "verdaderas" especies de *Neisseria*, estando, más cercana al género *Acinetobacter*. Así pues, fue reclasificada y transferida al género *Moraxella*. Actualmente, dicho género engloba cocos y bacilos cortos, los cuales están relacionados genéticamente; por eso, Bovre propone su división en dos subgéneros: *Branhamella*, que englobaría los cocos, y *Moraxella*, para los bacilos cortos.<sup>26</sup>

Así mismo, algunos autores prefieren el nombre de *Branhamella catarrhalis* debido a que, las otras especies de *Moraxella* son bacilos cortos y rara vez causan infección, mientras que *M. catarrhalis* son diplococos, la cual es considerada un importante patógeno. Por dicha diferenciación la nomenclatura de esta bacteria continúa siendo motivo de controversia entre los investigadores y es susceptible de sufrir nuevos cambios.



**Figura 1.** Clasificación taxonómica de *M. catarrhalis*.

### **2.3. Epidemiología.**

*M. catarrhalis* ha sido descrita exclusivamente en humanos, siendo capaz de colonizarlos sin causar enfermedad, motivo por el cual se clasificó como comensal. El foco primario de colonización es el tracto respiratorio humano, aunque ocasionalmente se ha aislado también del tracto genital.

Esta bacteria coloniza la superficie de la mucosa de la nasofaringe y las vías respiratorias mediante la formación de biofilm,<sup>32</sup> causando infecciones del tracto respiratorio superior en niños e inferior en adultos.<sup>26</sup>

Es considerada la tercera causa bacteriana de otitis media (OM) en niños, después de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* y en adultos es la segunda causa después de *H. influenzae*, de las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).<sup>68</sup>

La OM es una de las infecciones más comunes de la infancia, casi dos tercios de los niños padecen por lo menos un episodio y un tercio llega a sufrir tres o más por año, en algunos de los primeros años de su vida. Desde hace aproximadamente 10 años esta infección se encuentra dentro de las primeras 20 causas principales de enfermedad en México ocupando el lugar 6 con 724 906 casos y una tasa de incidencia de 695.60. Para el año 2008 se mantuvo en el mismo lugar con 666 493 casos y tasa de incidencia 624.744. Se ha demostrado que la colonización por *M. catarrhalis* se establece en edades muy tempranas y disminuye paulatinamente hacia la edad adulta.<sup>34</sup>

### **2.4. Enfermedades Asociadas a *M. catarrhalis*.**

En los últimos veinte años se ha identificado como patógeno causal de una diversidad de procesos infecciosos como otitis media, sinusitis, conjuntivitis, bronconeumonía, tos persistente, laringitis y queratitis. Además, puede dar lugar a enfermedades sistémicas como bacteriemia, sepsis, endocarditis, meningitis e infección urinaria complicada en pacientes con enfermedad neoplásica, asma, bronquiectasias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer de pulmón y en

aquellos con alteraciones del sistema inmunológico.<sup>34</sup> Otros factores de susceptibilidad son la edad avanzada, el tabaquismo, las viriasis respiratorias recurrentes, el tratamiento con corticoides y la inmunodepresión generada por una neoplasia o por procesos asociados a un déficit en la producción de anticuerpos. La presencia de estos factores hace que el aislamiento de *M. catarrhalis* tenga significado patológico.<sup>20</sup>

La otitis media (OM) es la infección supurada del oído medio, asimismo, denota inflamación de la cubierta mucoperióstica. La membrana timpánica (MT) inflamada se presenta opacificada, protuyente o con ambas características. Según su tiempo de evolución, la enfermedad puede subdividirse en:

- a) aguda, el proceso dura no más de tres semanas
- b) subaguda, la infección perdura de tres semanas a tres meses
- c) crónica, la enfermedad se prolonga durante más de tres meses.<sup>39</sup>

La patogenia de la OM consiste en la migración de patógenos bacterianos de la nasofaringe al oído medio a través de la trompa de Eustaquio; por lo tanto, los patrones de colonización en la nasofaringe son determinantes importantes de la otitis.<sup>45</sup> Aunado a ello, la trompa de Eustaquio de los niños es más corta y horizontal, tiene menor soporte cartilaginoso<sup>39</sup> lo que la hace más susceptible a la colonización por este patógeno.

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se caracteriza por la limitación del flujo aéreo la cual no es totalmente reversible y es usualmente progresiva. Se asocia con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones y la vía aérea; cuyos factores de riesgo más importantes son la exposición a partículas nocivas, gases principalmente derivados del consumo de tabaco y exposición al humo de leña. La EPOC es causada por la enfermedad de la vía aérea pequeña (bronquiolitis obstructiva) y por la destrucción del parénquima (enfisema). La inflamación crónica ocasiona un “remodelamiento” de la vía aérea y en consecuencia el estrechamiento de la vía aérea pequeña. Las infecciones por *M. catarrhalis* se producen por la propagación del microorganismo desde su hábitat

normal en la orofaringe. Por esta razón es frecuente su participación en infecciones mixtas junto a otras bacterias de la flora orofaríngea. Sin embargo este hecho disminuye el significado patogénico de *M. catarrhalis* en una infección respiratoria y es posible que su presencia incremente la patogenicidad de las otras bacterias. Una vez que la orofaringe está colonizada por *M. catarrhalis*, los factores predisponentes descritos anteriormente favorecen la colonización del árbol traqueobronquial, donde su aclaramiento por los mecanismos de defensa de la vía aérea son más lentos que el de otras bacterias colonizantes.<sup>20</sup>

### **2.5. Variación Estacional.**

La incidencia de infecciones respiratorias por *M. catarrhalis* y el aislamiento de este patógeno a partir de muestras clínicas son significativamente más elevadas en otoño e invierno (46%) que en primavera y verano (9%). Esto sugiere la posible participación de una infección vírica como desencadenante de su mecanismo de patogenicidad.<sup>17</sup>

A pesar de su estrecha asociación con un solo sitio de la colonización en un único hospedador, *M. catarrhalis* está expuesta a las fluctuaciones de temperatura. La respiración del aire frío reduce la temperatura nasofaríngea de 34 o 35 °C a temperatura ambiente para < 25 °C dentro de varios minutos en el caso de los adultos. En consecuencia, vivir en un clima frío, exponer la flora a frecuentes y rápidos cambios de temperatura; favorece que *M. catarrhalis* responda a este desafío mediante mecanismos adaptativos que protegen su integridad funcional contra un choque de frío.<sup>26</sup>

### **2.6. Infección Nosocomial.**

Actualmente existen pruebas convincentes de que la propagación de *M. catarrhalis* dentro de las salas de hospital puede conducir a importantes brotes de infección nosocomial; así mismo muestran la persistencia del organismo en el medio ambiente, propiciando su adquisición y prolongando la duración de la estancia.<sup>16</sup>

## 2.7. Sensibilidad a los Antibióticos.

*M. catarrhalis* ha adquirido una amplia capacidad para producir enzimas  $\beta$ -lactamasas.<sup>15</sup> Aproximadamente el 100% de los aislados clínicos *M. catarrhalis* son betalactámicos resistentes, lo que subraya la necesidad de desarrollar alternativas de tratamiento, incluyendo la necesidad de fabricar una vacuna *contra M. catarrhalis* para favorecer la formación de anticuerpos y evitar su manifestación.<sup>32</sup>

La primera cepa de *M. catarrhalis* productora de  $\beta$ -lactamasas fue descrita en 1976. A finales de la década de los 90, el porcentaje de este tipo de cepas aumento entre el 90 y 95%, cifras que han incrementado hasta el momento. La razón de esto, no ha sido establecida y, aunque se ha atribuido al uso de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, el incremento de cepas productoras de estas enzimas en otras especies como *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae* no ha sido tan espectacular. Las  $\beta$ -lactamasas (BRO) presentes en *M. catarrhalis* son de dos tipos, diferenciables mediante enfoque isoeléctrico, y cuyo origen es desconocido. Las dos enzimas son fenotípicamente similares y se han designado BRO-1 (llamada anteriormente Ravasio-*type*) y BRO-2 (1908-*type*). Las BRO hidrolizan la penicilina, ampicilina y amoxicilina. BRO-1 es la más frecuente, estando presente en aproximadamente, el 90% de cepas productoras. BRO-1 y BRO-2 producen un aumento de 25 y cuatro veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) para ampicilina, respectivamente, en comparación con cepas no productoras de  $\beta$ -lactamasas.<sup>17</sup> Se cree que es debido a los niveles altos de producción de BRO-1 tres veces más que BRO-2, que a diferencia en la actividad intrínseca de la enzima.

Las  $\beta$ -lactamasas BRO sólo se han encontrado en *M. catarrhalis* y en dos especies relacionadas: *M. lacunata* y *M. nonliquefaciens*. Se ha demostrado la transferencia por conjugación de BRO entre cepas de *M. catarrhalis*, y *M. nonliquefaciens*. Se han comunicado aislamientos de cepas productoras de otra  $\beta$ -lactamasa, denominada BRO-3 y una cepa productora de  $\beta$ -lactamasa TEM-1 mediada por plásmido.<sup>17</sup>

Las cepas de *M. catarrhalis* son uniformemente sensibles a las quinolonas,

amoxicilina/ácido clavulánico, cefalosporinas como ticarcilina y piperacilina, macrólidos cloranfenicol y amino glucósidos. Los porcentajes de resistencia al cotrimoxazol varían ampliamente, según las series. Se han comunicado casos aislados de cepas resistentes a las tetraciclinas, eritromicina, fluoroquinolonas, macrólidos, piperacilina y a algunas cefalosporinas.<sup>17</sup>

### **2.8. Aspectos Moleculares de *Moraxella catarrhalis*.**

El reconocimiento de *M. catarrhalis* como un importante patógeno humano ha estimulado la investigación sobre sus mecanismos moleculares de patogénesis. Un paso crítico en la colonización y la infección es la adhesión al epitelio del tracto respiratorio.<sup>45</sup> La bacteria posee receptores específicos que le permiten adherirse al epitelio y a componentes de la matriz extracelular (ECM), también se ha observado que puede ser capaz de invadir las células epiteliales del hospedador lo que puede provocar la evasión de la respuesta inmune, entre los cuales, contrarrestar los efectos de algunas proteínas del complemento. Sin embargo, aunque ataca la superficie de la mucosa epitelial del hospedador, esta bacteria es capaz de interactuar y/o competir con la flora normal logrando sobrevivir bajo condiciones de cambio y limitación de nutrientes, lo que puede propiciar la formación de microcolonias y biofilm.<sup>23</sup>

Podemos resumir que sus aspectos moleculares en relación a su patogénesis constan básicamente de su adhesión e invasión al epitelio humano, formación de biofilm, evasión de la respuesta inmune del hospedador y forma de adquisición de sus nutrientes.

### **2.8.1. Adhesión al Epitelio del Hospedador y Componentes de la Matriz Extracelular (ECM).**

La adhesión a las superficies mucosas está mediada por la unión de varias macromoléculas de *M. catarrhalis* a receptores de superficie en células blanco eucariotas o a los componentes de la ECM. Al ser una bacteria Gram negativa su membrana externa comprende fosfolípidos, lipooligosacáridos (LOS), proteínas integrales de la membrana externa (OMPs) y lipoproteínas.

La adhesión es un evento multifactorial mediado por muchas macromoléculas identificadas como adhesinas, incluyendo OMP como las proteínas de la superficie A (UspAs), inmunoglobulina D (IgD), la proteína de unión hemaglutinina (MID/Hag), proteína adhesión (MGAP), OMP CD, Hag filamentosa (FHA), (Mha), y estructuras expuestas en la superficie, tales como los pili de tipo IV (PTF) y oligosacáridos (LOS).

#### **2.8.1.1. Los OMPS**

Las principales proteínas de membrana externa que tiene *M. catarrhalis* son UspAs y MID/Hag, las cuales son clasificadas como autotransportadores triméricos, también conocidos como proteínas Oca (Oligomeric coiled-coil adhesins), este grupo de autotransportadores son considerados como factores de virulencia en otras bacterias como *Yersinias spp.* (proteína YadA) y *H. influenzae* (proteína Hia).<sup>2</sup>

#### **2.8.1.2. UspAs**

Las UspAs son proteínas multifuncionales con importantes propiedades de adhesión, se dividen en tres grupos principalmente: UspA1 (88 kDa), UspA2 (62 kDa), y UspA2H (92 kDa).<sup>33</sup>

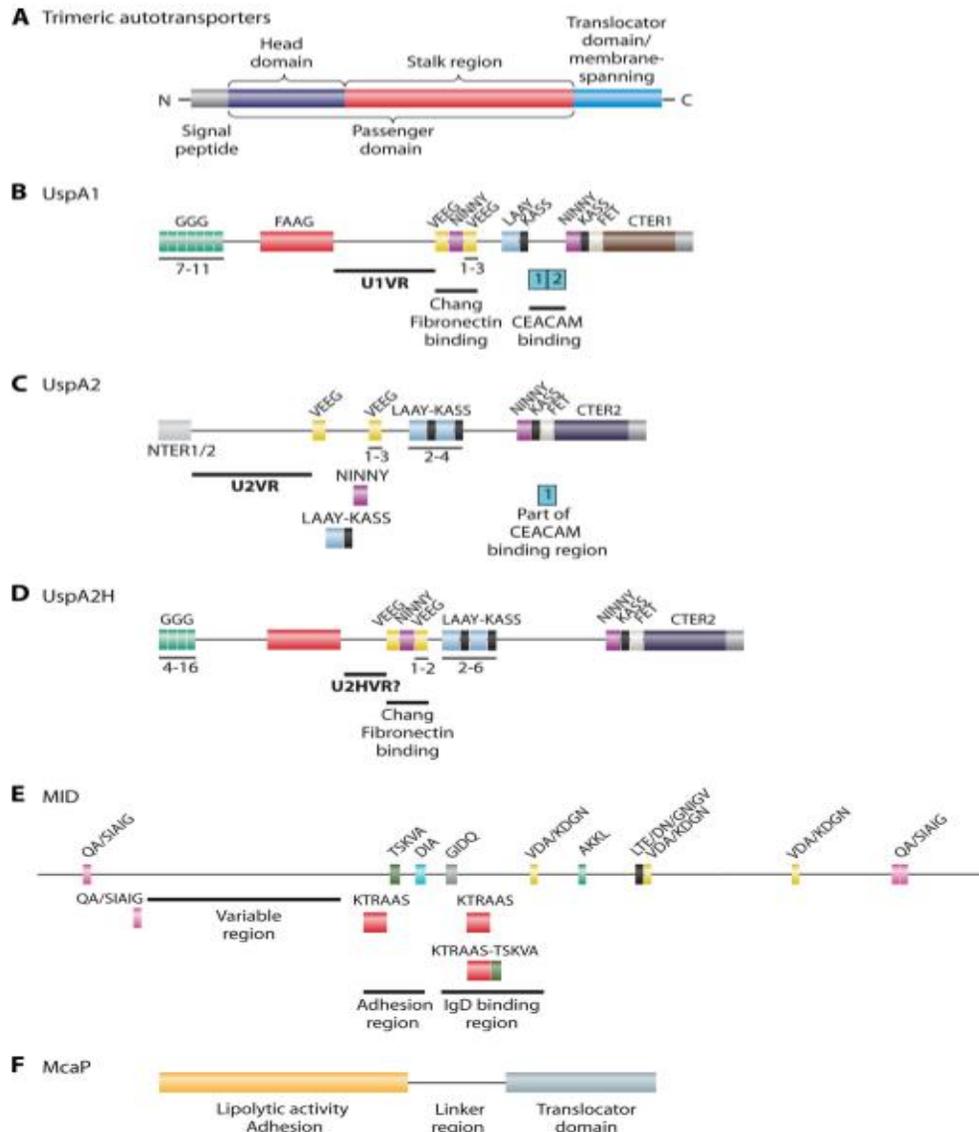
Las proteínas UspA1 y UspA2H de diferentes aislados son divergentes, pero muestran algunos casetes de secuencias de aminoácidos que son compartidos entre ellos, esta variabilidad principalmente se concentra en la región N-terminal. Por el contrario, la región C-terminal de estas proteínas aparentemente se mantiene conservada.

Algunos grupos de investigadores han estudiado el papel funcional de las UspAs en la adhesión a líneas celulares humanas y han observado que UspA1 se puede unir a células epiteliales de la conjuntiva Chang<sup>11, 33</sup> células epiteliales de laringe Hep-2, células epiteliales alveolares tipo II A549<sup>10, 29</sup> también se puede unir a componentes de la EMC como fibronectina y laminina.<sup>62</sup>

La expresión de los genes que codifican para las UspA1 y UspA2 se han asociado con los diferentes subtipos del 16S rRNA. Las cepas con niveles de expresión normales de dichas proteínas son tipo 1, y las cepas con expresión insignificante son predominantemente de tipo 2 y 3. Esta caracterización sirve como marcador para clasificar filogenéticamente a las cepas de *M. catarrhalis*.<sup>43</sup>

Se ha observado que la expresión de *uspA1* puede estar inducida por “choque de frío” (26 °C) en las cepas de los tres subtipos del 16S rRNA.<sup>26</sup> En un reporte se ha mencionado que UspA1 se une al receptor CEACAM1 en células epiteliales humanas.<sup>28, 29</sup> Esta glicoproteína es expresada en una gran variedad de células epiteliales y endoteliales así como en leucocitos.<sup>21,25</sup> Curiosamente el blanco del receptor CEACAM también es característico de patógenos de mucosas como *H. influenzae* y *N. meningitidis*.<sup>28</sup> Sin embargo, algunos aislados de *M. catarrhalis* carecen de los motivos que permiten la unión a este receptor, por lo que presentan diferentes propiedades de adhesión.

La unión de UspA1 a CEACAM1 se ha propuesto induce apoptosis en células epiteliales de pulmón, lo cual puede contribuir a la patogénesis de EPOC y enfisema por la inducción secundaria de inflamación.<sup>46</sup> Además la interacción de *M. catarrhalis* con este receptor permite suprimir la respuesta inflamatoria del hospedador.<sup>57</sup> Sin embargo, UspA2 no es capaz de unirse a este receptor. Hasta ahora se sabe que UspA2H (un híbrido de UspA1 y UspA2) se encarga de mediar la unión a células Chang ya que también puede unirse a fibronectina.



**Figura 2. Estructura molecular y dominios funcionales de *M. catarrhalis* proteínas triméricas autotransportadoras.** (A) Representación esquemática de los elementos básicos de las proteínas triméricas autotransportadoras. (B, C, y D) Las proteínas UspA. Los diversos cassettes de secuencias, conocidos como dominios funcionales, se indican CTER1 y CTER2, regiones C-terminales 1 y 2, respectivamente; NTER 1 y 2, en la región N-terminal media. (E) MID. Se indican los tipos de secuencias compartidas entre MID variantes, y las regiones implicadas en la adhesión e IgD vinculantes. (F) Elementos Básicos estructurales del MGAP.<sup>68</sup>

### 2.8.1.3. MID/Hag.

MID una proteína de 200 kDa también referida como Hag se ha encontrado que es responsable de la unión de *M. catarrhalis* con IgD y para la estimulación de linfocitos B. MID es un estimulante mitógeno de linfocitos B que inicia la producción de IgD.<sup>22</sup>

Básicamente MID/Hag es una proteína multifuncional que juega un papel importante en la patogénesis de *M. catarrhalis* por ejemplo, los aislados que expresan MID aglutinan eritrocitos humanos y se adhieren a células A549.<sup>18</sup> Hag se puede unir a células epiteliales de oído medio<sup>12, 31</sup> células epiteliales de pulmón NCIH292 y células Chang.<sup>12, 51</sup> Se ha observado que si no está presente en las cepas la adherencia es baja, aunque estén otras adhesinas. También es clasificada como un autotransportador con un dominio traslocador y otro común N-terminal del cual depende la actividad de adhesión y unión a la IgD.

#### **2.8.1.4. McaP**

La proteína McaP de 62 kDa, otro factor de adherencia, es una proteína autotransportadora convencional, donde su dominio N-terminal presenta actividad lipolítica (como una esterasa)<sup>63</sup> y esta región sirve también para su adhesión.<sup>37, 63</sup> Es una proteína altamente conservada en cuanto a su secuencia entre los aislados de *M. catarrhalis*. Sin embargo, el papel exacto de esta proteína en la patogénesis aún no se ha dilucidado. Se conoce que las fosfolipasas están involucradas en un rango diverso de funciones celulares, induciendo respuesta inflamatoria en el hospedador, cambiando la composición de la membrana y alterando las cascadas de señalización.<sup>56</sup> La importancia de su actividad para la patogénesis actualmente es desconocida.

#### **2.8.1.5. OMP CD**

OMP CD es una proteína tipo porina de 46 kDa altamente conservada, que también juega un papel importante en el proceso de adhesión.<sup>45</sup> Esta proteína funciona como una adhesina tanto para mucina de oído medio<sup>38, 54</sup> como de células A549.<sup>31</sup>

#### **2.8.1.6. Proteína MhaC**

Las proteínas MhaC, MhaB1 y MhaB2 muestran tener función de Sistema de secreción tipo TPS (Two Partner Secretion). Este sistema pertenece al igual que los autotransportadores a la familia de sistemas de secreción tipo V.<sup>8, 52</sup> El sistema TPS está ampliamente distribuido entre las bacterias Gram negativas y la mayoría está

involucrado en la secreción de proteínas de virulencia, las cuales están implicadas en la adhesión en bacterias como *Bordetella pertusis* y *Neisseria meningitidis*.<sup>30, 55</sup> La proteína MhaC permite el transporte de MhaB1 y MhaB2 a través de la membrana externa. Estas proteínas son altamente conservadas y expresadas entre algunos aislados de *M. catarrhalis*.<sup>8</sup>

## **2.8.2 Estructuras Expuestas a la Superficie.**

Básicamente las estructuras que están involucradas en la adhesión son TFP (Type IV Pili) y LOS.

### **2.8.2.1 TFP.**

Esta estructura es un polímero filamentosos expuesto a la superficie compuesto de un ensamble de proteínas pilina, el cual tiene una amplia gama de funciones celulares entre las que se encuentran la competencia natural, la adhesión a células del hospedador, formación de biofilm y motilidad.

El TFP cumple un papel crucial en la patogénesis, ya que la pérdida de esta estructura reduce la virulencia de algunas bacterias Gram negativas.<sup>14</sup> En el caso de *M. catarrhalis*, la pérdida del gen *pilA* (codifica la principal subunidad de pilina del TFP), provoca una reducción significativa de la adherencia a células Chang y también reduce la capacidad de colonizar la nasofaringe en modelo animal (Chinchilla), esto sugiere que TFP promueve la unión a la superficie de la mucosa. Además ensayos *in vitro* indican que la formación de microcolonias y biofilm fueron derogados en cepas mutantes de *pilA*.<sup>41</sup>

### **2.8.2.2. LOS.**

Esta estructura es el principal componente de la membrana externa y se considera importante para la virulencia de *M. catarrhalis*. Se compone de un núcleo de oligosacáridos y de lípido A. El cual posee una forma distinta al típico lipopolisacárido de los patógenos entéricos Gram negativos, esta diferencia radica en que carecen de las cadenas de polisacáridos del antígeno O de cadena lateral. En base a su LOS, *M. catarrhalis* posee tres serotipos, el más prevalente es el

serotipo A (72%) seguido por el serotipo B y C (21% y 2% respectivamente). Existen diferencias significativas entre los serotipos A y B entre los aislados de niños y adultos, presentándose una disminución en la incidencia del serotipo A en adultos.<sup>67</sup> Cabe mencionar que las estructuras LOS que presentan algunos patógenos de tracto respiratorio como *N. meningitidis* y *H. influenzae* son muy importantes para la adhesión a sus células blanco que se encuentran en su hospedador. Los genes involucrados en la síntesis de LOS en *M. catarrhalis* son *lpxA*, *lpxL*, *lpxX* y *kdtA*. El papel del LOS en la adhesión de esta bacteria continua en discusión ya que la alteración o su ausencia puede conducir a la disminución de la integridad de la membrana, pudiendo afectar la superficie donde se encuentran otras adhesinas.<sup>61</sup>

### **2.8.3. Invasión del Epitelio del Hospedador.**

La adhesión de las células epiteliales a la matriz extracelular es un paso esencial para la patogénesis de *M. catarrhalis*. Como se ha mencionado, diversas moléculas participan en el proceso de adhesión, después de este paso parece que esta bacteria puede invadir algunas células del hospedador, lo cual le permite evadir la respuesta inmune humoral y celular, así como los efectos del tratamiento con antibióticos.

Algunos estudios sustentan este evento de invasión a diferentes tipos de células epiteliales por parte de la bacteria.<sup>58</sup> En formación de diferentes fenotipos de las líneas celulares se han observado, por ejemplo, la formación de lamelopodios y filopodios después de la adhesión de *M. catarrhalis*, los cuales indican un mecanismo como macropinositosis de invasión celular. Se ha identificado que algunas adhesinas así como el LOS, son esenciales para llevar a cabo este evento. Sin embargo, este mecanismo aún no está bien estudiado en esta bacteria.

### **2.8.4. Formación de Biofilm.**

Se ha demostrado que la formación de biofilm es un importante proceso involucrado en la colonización y persistencia de microorganismos que infectan las mucosas.<sup>13</sup> La capacidad de *M. catarrhalis* para formarlo ha sido demostrada por ensayos *in vitro*.<sup>49, 50</sup> La formación de biofilm *in vivo* también se ha observado en el oído medio

de pacientes con Otitis Media.<sup>24</sup> Investigaciones han permitido saber qué genes están involucrados en su formación, por ejemplo, la presencia de *uspA1* tiene un efecto positivo, mientras la presencia de *hag* tiene un efecto negativo.<sup>50</sup> Recientemente, se han observado a los aislados con *uspA2* positivos son más eficientes formando biofilm.<sup>67</sup>

Algunos estudios indican que la formación de biofilm es mayor en las cepas aisladas de niños (5 años de edad), y adultos (20 años de edad), los cuales muestran una menor incidencia de *uspA2*. La formación de microcolonias y biofilms *in vitro* se ha investigado usando mutantes de *pilA*, estos muestran que su formación depende de TFP.<sup>41</sup> El factor Hfq (Host factor q), es una proteína reguladora altamente conservada entre las cepas de *M. catarrhalis*. La cual funciona probablemente como una chaperona; ya que cepas mutantes de este gen alteran la composición de las proteínas de membrana, Por lo tanto, estas cepas pueden generar una ventaja en el sistema de formación de biofilm de una manera indirecta.<sup>4</sup>

#### **2.8.5. Evasión del Sistema Inmune del Hospedador.**

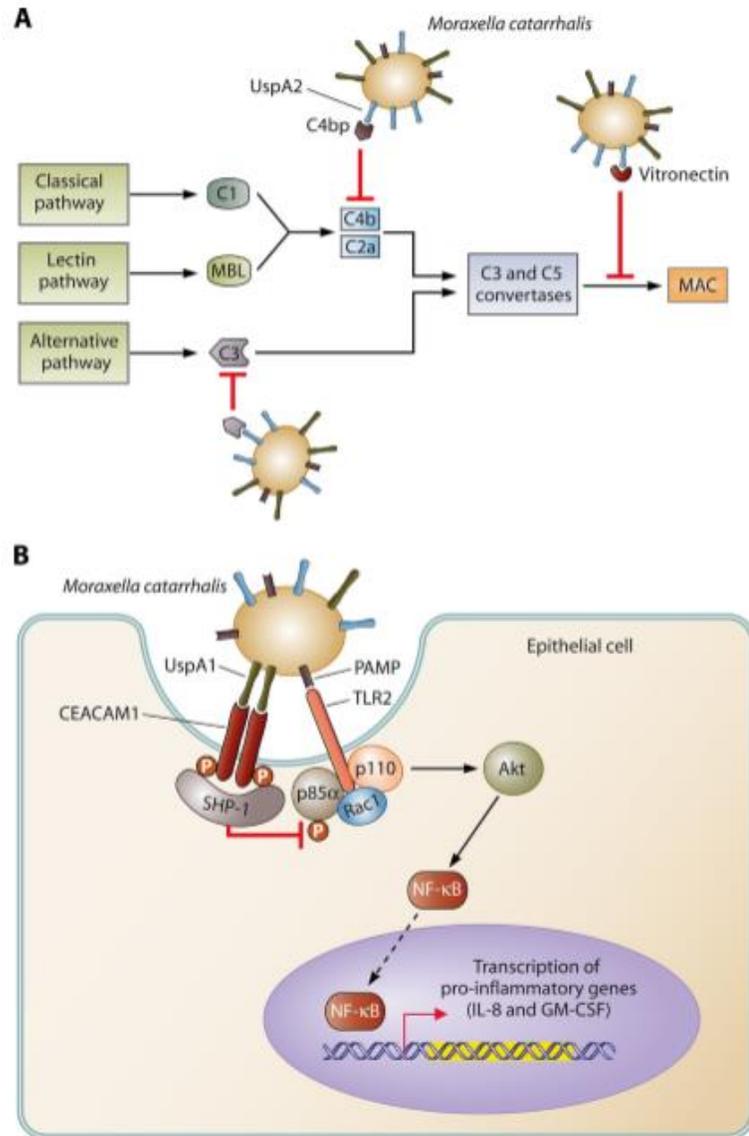
Inicialmente la barrera para combatir a los patógenos es el sistema inmune innato, el cual es la primer línea de defensa inespecífica utilizada por el hospedador para protegerse de los microorganismos. Entre los componentes de este sistema se encuentran los PPRs (Pattern Recognition Receptors) los cuales incluyen a los TLRs (Toll Like Receptors), receptores tipo NOD y de manosa en los macrófagos, así como el sistema del complemento. Sin embargo, *M. catarrhalis* tiene mecanismos que pueden modular esta primer línea de defensa y poder persistir en su hospedador.<sup>7</sup>

#### **2.8.6. Resistencia al Complemento.**

Un aspecto importante de la patogenicidad entre la mayoría de los aislados de *M. catarrhalis* provenientes de pacientes con OM y EPOC es la sobrevivencia a la muerte mediada por el suero humano.<sup>66</sup> Se han observado los factores importantes responsables de la evasión del complemento son UspA,<sup>3</sup> OMP CD,<sup>31</sup> OMP E,<sup>45</sup> CopB<sup>27</sup> y el LOS. Por ejemplo, la proteína UspA2 es capaz de unirse a algunas

proteínas del complemento como C3,<sup>47</sup> C4,<sup>48</sup> y vitronectina,<sup>6, 42</sup> inhibiendo la vía, alternativa, clásica y la etapa terminal del sistema del complemento mediante el bloqueo de la unión a la membrana de C5b-7 y la inhibición de la polimerización de C9, y eventualmente inhibir la formación de la MAC.<sup>44, 60</sup>

Respecto al LOS se ha observado que las cepas mutantes en los genes relacionados con su síntesis, son más sensibles a la actividad bactericida del suero humano, por el hecho de permitir a la membrana ser más permeable y frágil, lo cual propicia una mayor vulnerabilidad al ataque de las proteínas del complemento. Por lo tanto, el LOS es una estructura importante en la virulencia de *M. catarrhalis* ya sea directa o indirectamente contribuyendo a la adhesión así como a la evasión del sistema inmune.



**Figura 3.** *M. catarrhalis* tiene estrategias mediadas por las OMPs UspA para evadir la respuesta inmune. **(A) Inhibición de sistema del complemento.** Tanto UspA1 y UspA2 tienen un papel en la resistencia al suero, el cual es dominado principalmente por UspA2. La proteína UspA2 se une a C4b lo cual permite a *M. catarrhalis* inhibir la vía clásica del complemento. UspA2 también previene la activación de la vía alterna del complemento absorbiendo C3 del suero. Además, UspA2 interviene en la etapa terminal del sistema del complemento con MAC (membrane attack complex/complejo de ataque a la membrana) mediante la unión con la proteína vitronectina la cual es un componente regulador del complemento. **(B) Inhibición de la respuesta proinflamatoria TLR2-NF- $\kappa$ B.** La proteína UspA1 es el blanco de las moléculas CEACAM1 en la célula epitelial del hospedador. *M. catarrhalis* utiliza la unión de CEACAM1 mediada por UspA1 para contrarrestar la respuesta proinflamatoria mediada por TLR-2. *M. catarrhalis* media la activación de PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) con el TLR2 resultando en el reclutamiento de la subunidad reguladora p85 $\alpha$  de PI3K y finalmente en la transcripción de genes proinflamatorios, los cuales son regulados mediante la vía NF $\kappa$ B. La unión de UspA1 a CEACAM1 da un incremento de la fosforilación de residuos de tirosina del dominio citoplasmático ITIM de CEACAM1 y subsecuentemente para el reclutamiento de SHP-1, este inhibe la fosforilación de p85 $\alpha$ , por lo tanto bloquea la activación de respuesta proinflamatoria mediante la activación de la vía PI3K–Akt–NF- $\kappa$ B.<sup>68</sup>

### **2.8.7. Inhibición de la Respuesta Proinflamatoria Inducida porTLR2.**

*M. catarrhalis* en la superficie de la mucosa parece activar una respuesta inmune inflamatoria mediante la activación de TLR2, el cual está presente en la membrana de las células epiteliales respiratorias.<sup>59</sup> *M. catarrhalis* conlleva a la iniciación de una cascada de reacciones que terminan en la transcripción de genes proinflamatorios, que codifican para IL-8 y factor activador estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.<sup>3, 57, 58, 59</sup> Sin embargo, investigadores han mostrado que *M. catarrhalis* es capaz de colonizar la superficie de la mucosa sin activar TLR2 a través de la inhibición de esta vía mediante el receptor CEACAM1.<sup>57</sup> Este mecanismo involucra un dominio presente de la proteína UspA1, el cual se une a un dominio en el receptor CECAM1.<sup>29</sup> Este hecho permite y facilita la colonización de esta bacteria a la superficie epitelial del hospedador.

### **2.8.8. Adquisición de Nutrientes.**

La adquisición de nutrientes es indispensable para la colonización de las superficies de las mucosas. El crecimiento de *M. catarrhalis* requiere algunas condiciones ambientales y de nutrientes específicos. Por ejemplo, esta bacteria no puede crecer bajo estrictas condiciones anaeróbicas.<sup>1</sup> Sin embargo, las enzimas involucradas en el metabolismo anaerobio están presentes, lo cual le confiere la característica de crecer bajo condiciones microaerofílicas. *M. catarrhalis* no es capaz de utilizar carbohidratos exógenos porque no posee las enzimas necesarias para transportar y procesar estos compuestos tiene incompleta la vía *Embden Meyerhof Parnas*, así como el ciclo de las pentosas y las vías de *Entner Dourdoroff* están ausentes.

El hierro es un nutriente clave involucrado en algunos procesos bacteriológicos pero no está libremente disponible dentro del hospedador, porque está en complejo con la hemoglobina, hemo transferrina o lactoferrina. La lactoferrina es el principal acarreador de hierro en la superficie de las mucosas, mientras que la transferrina lo es en el suero, el secuestro de hierro es una línea importante de defensa contra bacterias patógenas.<sup>53</sup>

*M. catarrhalis* adquiere hierro con la ayuda de algunas proteínas de unión a este nutriente expuestas en la superficie como LbpA y LbpB (proteínas de unión a Lactoferrina), TbpA y TbpB (proteínas de unión a Transferrina),<sup>14</sup> y la proteína MhuA (proteína de utilización de hemoglobina).<sup>19</sup> Investigaciones han mostrado que la cepa ATCC 25240 es capaz de utilizar la lactoferrina y la transferrina humana como fuentes de hierro. Además el TFP expuesto en la superficie de la bacteria parece ser importante para crecer bajo condiciones limitantes de hierro, se ha encontrado que el gen *pilA* parece ser regulado por un represor transcripcional responsable de hierro.<sup>41</sup>

### **3. Heterogeneidad de las Especies de *M. catarrhalis*.**

Estudios epidemiológicos indican que los aislados de *M. catarrhalis* son genéticamente diversos y como consecuencia existen dos linajes filogenéticos distintos.<sup>9</sup> Recientemente, la existencia de estos ha sido confirmada a través de la secuencia de multilocus (MLST).<sup>69</sup> El primero de estos dos linajes filogenéticos, conocido como serosensible, se caracteriza por moderada virulencia y lo componen cepas que son sensibles a la muerte mediada por complemento. El otro más virulento llamado seroresistente, está compuesto por cepas resistentes al complemento y con una amplia habilidad para adherirse a células epiteliales.<sup>9</sup>

El linaje seroresistente se compone predominantemente por aislados que contienen el gen 16S rRNA tipo 1, y los que poseen el gen 16S rRNA tipo 2 y 3 pertenecen al linaje serosensible.<sup>9,65</sup> Los patrones tipo 1, 2 y 3 del 16S rRNA son obtenidos mediante el uso de enzimas de restricción en base a la técnica de RFLP.

Existen asociaciones entre el tipo de linaje y algunos genes que codifican para factores de virulencia de *M. catarrhalis*, como el gen *uspA1* (codifica una proteína de membrana de la familia de UspA. Entre el 87 y 99% de los aislados que contienen el gen *uspA1* se han encontrado asociados a adherencia y al linaje seroresistente y entre el 23 y 36% de los aislados que contiene este gen son linaje serosensible. No hay diferencias entre la prevalencia del gen *uspA2* y los linajes seroresistente y serosensible.<sup>9</sup> Lo cual resulta contradictorio ya que *uspA2* está

asociado con la resistencia al suero. Sin embargo, puede ser concebible ya que la expresión de *uspA2* en los aislados serosensibles puede estar inhibida. Otros investigadores han encontrado que la resistencia al suero está ligada a *uspA2* pero esto no es una propiedad inherente de todas las variantes de *uspA2*.<sup>5</sup>

El gen *hagA1* codifica una adhesina denominada HagA, el cual se ha encontrado ausente en casi todos los aislados pertenecientes al tipo 2 y 3, mientras en el caso de los del tipo 1 se encuentra prácticamente presente en todos los aislados.<sup>67</sup>

Respecto a la asociación entre el linaje con los serotipos A, B y C del lipooligosacaridos (LOS) existentes en *M. catarrhalis*, se ha descrito que el serotipo B se encuentra exclusivamente en aislados tipo 1.<sup>67</sup> Tomando en cuenta estos hallazgos se puede considerar que los genes de virulencia de *M. catarrhalis* son más prevalentes en aislados que contienen el 16S rRNA tipo 1 pertenecientes al linaje seroresistente.

Mediante herramientas de genética de poblaciones (filogenética y análisis Bayesiano) se ha mostrado que el linaje seroresistente se caracteriza por su alta tasa de recombinación homóloga y mutación de genes que las del serosensible. Una recombinación entre dos clonas muestra que un grupo ancestral no era virulento y que podría haber infectado a mamíferos previo a 70 millones de años y después infecto al humano. El linaje seroresistente se extendió hace 5 millones de años en una población importante, lo cual coincide con la expansión de los homínidos, la cual pudo darse a la par con el hospedador y adquisición de más factores de virulencia.<sup>69</sup>

En una colección de 268 *M. catarrhalis* aisladas de las diversas regiones geográficas, el 83% resultaron pertenecer a la subpoblación seroresistente. Es naturalmente competente para la transformación, que a su vez conduce a la recombinación homóloga frecuente.<sup>69</sup>

La competencia natural y la alta recombinación en el linaje seroresistente pudieron haber dado lugar a la adaptación del humano desde hace muchos años. Además,

se ha descrito que ambos linajes pueden estar presentes en el mismo nicho de su hospedador, lo que resulta en una genética secundaria de contacto.<sup>68</sup>

#### **4. Justificación.**

*M. catarrhalis* se asocia generalmente con infecciones de las vías respiratorias superiores en los niños e inferiores en adultos. Sin embargo, en México no es considerada la importancia de esta bacteria en aislamientos de muestras clínicas que infectan a estos dos grupos de edad. Por lo cual, se investigaron en aislamientos de *M. catarrhalis* de población mexicana los linajes serosensible o seroresistente, los cuales tienen asociación con el grado de virulencia de la bacteria, para evaluar su relevancia como un posible patógeno, tomando en cuenta la importancia que se le ha atribuido en los últimos años en otros estudios a nivel mundial.

#### **5. Hipótesis.**

Si el linaje seroresistente está asociado a mayor virulencia, entonces el linaje serosensible se encontrara con más frecuencia en los aislados clínicos de población mexicana.

#### **6. Objetivo.**

Identificar los linajes seroresistente y serosensible en aislados clínicos de *M. catarrhalis*, mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), para determinar su prevalencia en niños y adultos de población mexicana.

##### **6.1. Objetivos Particulares.**

- Identificar el gen 16S rRNA en los aislados clínicos de *M. catarrhalis*, mediante PCR para identificar al tipo que corresponde.
- Identificar el tipo 1, 2 y 3 del 16S rRNA, por medio de RFLP, para clasificar al linaje que pertenece.

- Comparar la prevalencia de los linajes seroresistente y serosensible de *M. catarrhalis* entre niños y adultos, a través de los resultados obtenidos, para valorar la importancia de la bacteria en población mexicana.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS.

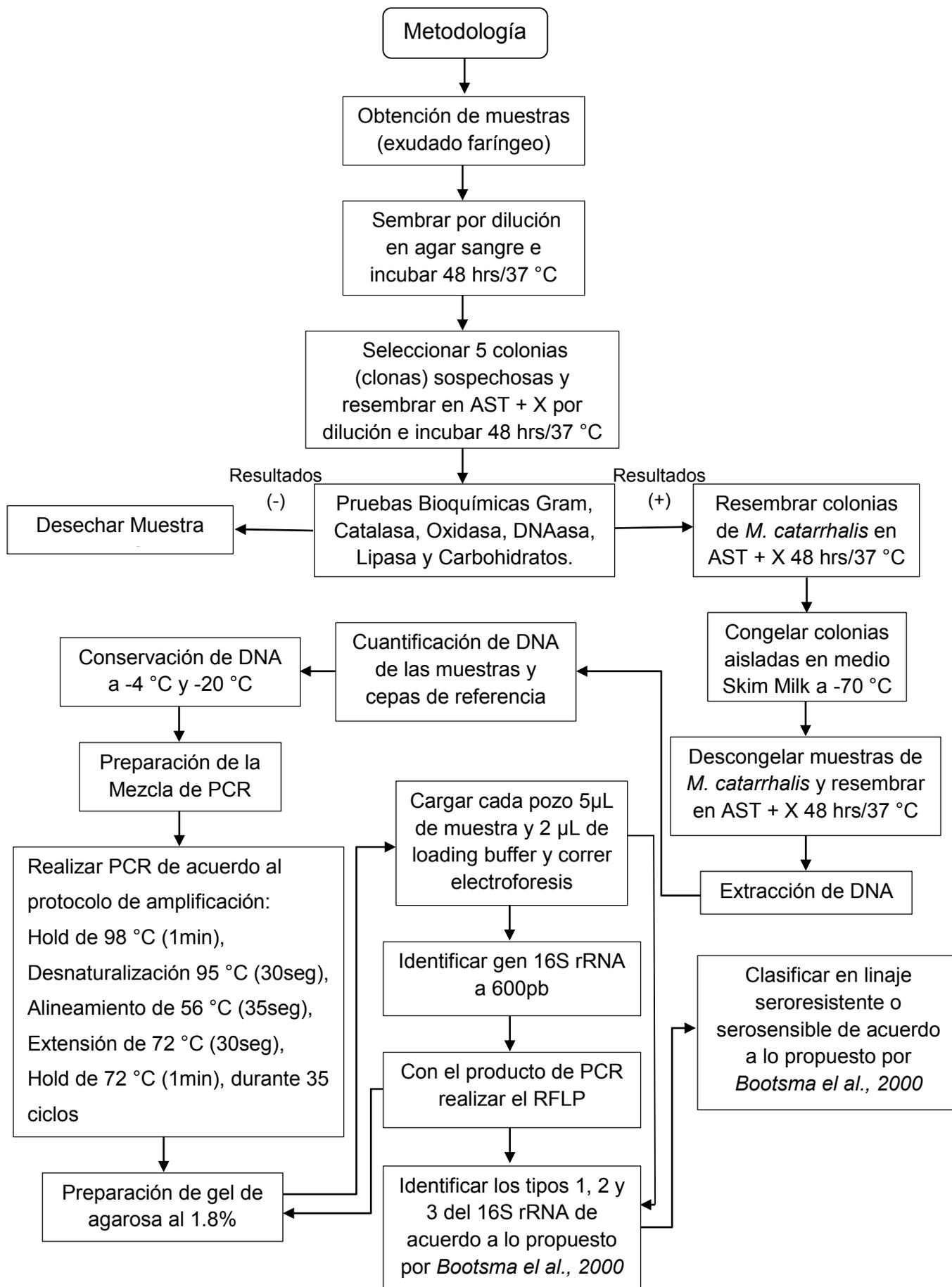
### 7.1. Obtención de Muestras Clínicas.

A los pacientes que llegaban a realizarse un exudado faríngeo en las Unidades de Medicina Familiar N° 63, 64 se les invito a participar en el estudio. Las muestras se recolectaron durante un periodo de 1 año.

El paciente se presentó en ayunas y sin aseo bucal, y en condiciones estériles se procedió a tomar la muestra, sentado cómodamente, con la cabeza inclinada hacia arriba, con un abatelenguas se sujetó la lengua y se tomó un hisopado de las amígdalas, el cual fue depositado en un tubo con caldo BHI.



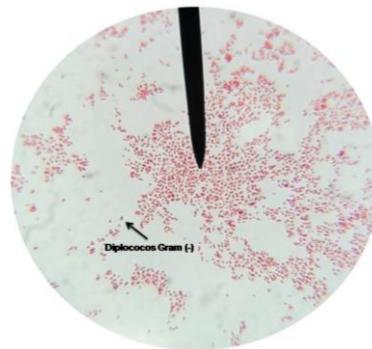
**Figura 4.** Obtención de muestras en medio BHI.



## 7.2. Aislamiento, Identificación y Purificación de *M. catarrhalis*.

Posteriormente se sembraron por medio de la técnica Americana (dilución) en agar sangre (medio rico), y se incubo a 37 °C/48 hrs. Una vez transcurrido ese tiempo se seleccionaron colonias color blanco, opacas, circulares, convexas de borde completo, de 2 mm de diámetro, sugerente de ser *M. catarrhalis*.

A las cuales se les realizo una tinción de Gram, y se observaron al microscopio óptico compuesto a 100X diplococos Gram negativos.



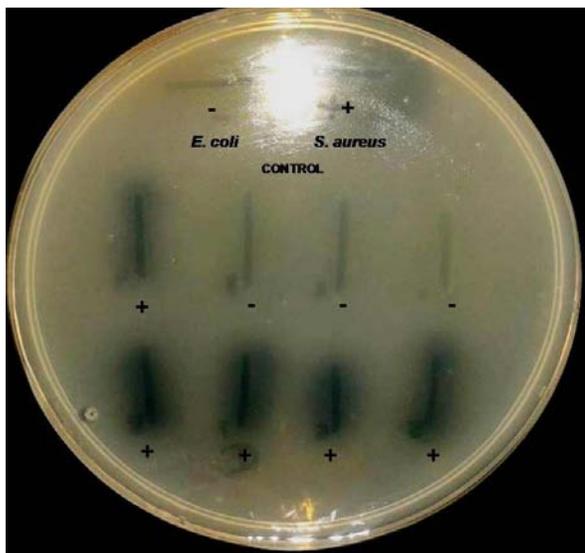
**Figura 5.** Tinción de Gram, diplococos Gram negativos

Se realizó la tipificación fenotípica por medio de pruebas bioquímicas primarias para la identificación del genero *Moraxella* como catalasa y oxidasa las cuales debían ser positivas; posteriormente se procedió a resembrar en Agar Soya Tripticasa + X (medio rico) para su purificación, se incubo a 37 °C/48 hrs.

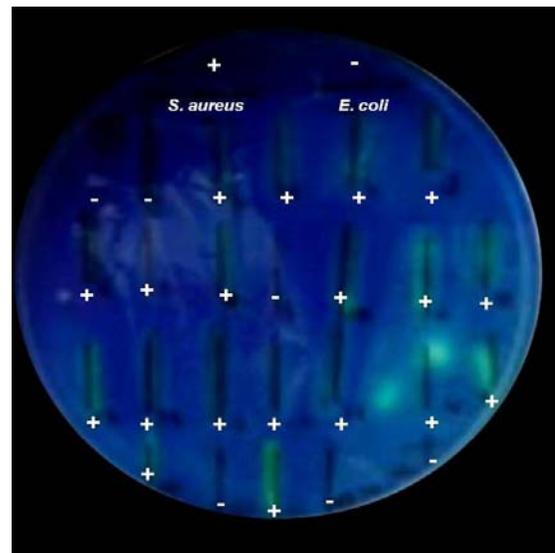


**Figura 6.** Purificación de las cepas de *M. catarrhalis* en AST+X.

Una vez los aislados purificados se realizaron las pruebas bioquímicas secundarias DNAasa, lipasa y carbohidratos (lactosa, glucosa, sacarosa, maltosa, y fructosa) para la identificación de la especie de *M. catarrhalis*; inicialmente se sembró por medio de una impronta en los medios de DNAasa y Lipasa, se utilizaron como controles *Escherichia coli* (-) y *Staphylococcus aureus* (+), se incubaron a 37 °C/24 hrs, para la prueba de DNAasa se agregó HCl 1N hasta cubrir las colonias completamente, se dejó actuar durante 30 min, enseguida se decantó el HCl 1N, recogió la biomasa con algodón y a contraluz se observó la formación de un halo turbio alrededor del crecimiento bacteriano lo cual indica que la prueba es positiva; para la prueba de lipasa se agregó azul de metileno hasta cubrir las colonias completamente se dejó actuar durante 45 min, se decantó y se observó a contraluz la formación de un halo fluorescente alrededor del crecimiento bacteriano, lo cual indica que la prueba es positiva.

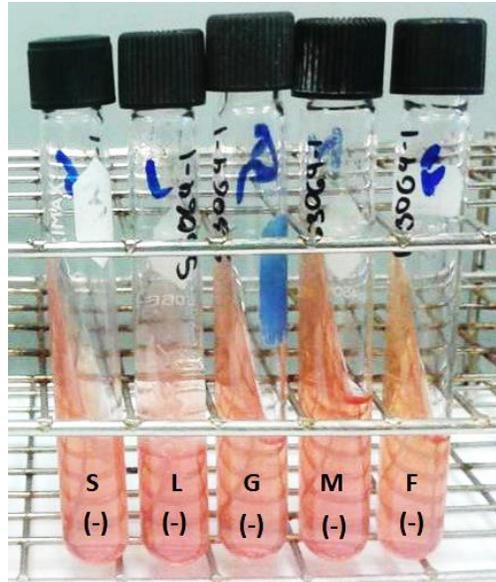


**Figura 7.** Prueba de DNAasa para identificación de *M. catarrhalis*.



**Figura 8.** Prueba de Lipasa para identificación de *M. catarrhalis*.

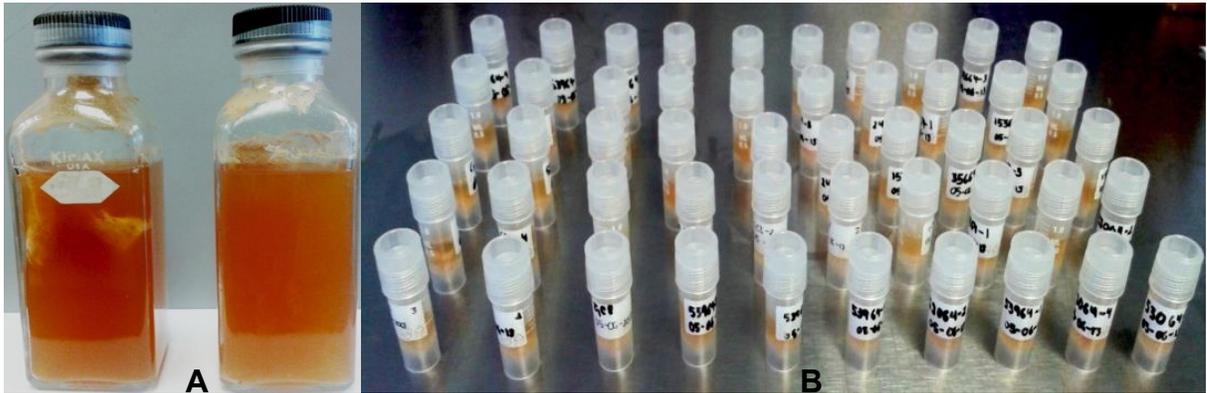
Finalmente se realizó la prueba de carbohidratos (lactosa, glucosa, sacarosa, maltosa, y fructosa), se sembraron por estriado los 5 tubos en medio CTA con el carbohidrato al 1% y se incubaron a 37 °C/24 hrs, cuyo resultado fue negativo.



**Figura 9.** Prueba de los Carbohidratos (Sacarosa, Lactosa, Glucosa, Maltosa, y Fructosa), para identificación de *M. caratthalis*.

### **7.3. Conservación de las Cepas de *M. catarrhalis*.**

Una vez identificado un asilado de *M. catarrhalis* de cada paciente, se sembró en una caja de AST + X y del crecimiento puro se seleccionaron un promedio de 5 colonias (clonas) de cada paciente; las cuales se resembraron por medio de la Técnica Americana (dilución) en medio Agar Soya Tripticasa a 37 °C/48 hrs posteriormente se recogió un tercio de la biomasa la cual se colocó en un tubo de 1.5 mL con 500 µL de medio Skim milk y se congelo a -70 °C para su conservación.



**Figura 10. A)** Medio Skim milk; **B)** Conservación de las cepas de *M. catarrhalis*.

#### **7.4. Extracción de DNA.**

Las cepas se descongelaron y se sembraron en la mitad de la placa con Agar Soya Tripticasa + X a 37 °C /48 hrs. Se colectó la biomasa bacteriana y se suspendió en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 500 µL de Solución Salina Fisiológica Estéril; la suspensión bacteriana se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante; se realizó la extracción de DNA utilizando el Kit Promega Wizard Genomic DNA Purification de la siguiente manera:

##### **Paso 1. Lisis Celular.**

- Adicionar 600 µL de solución de lisis nucleic, homogenizar y mezclar suavemente.
- Incubar 5 min /80 °C y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Adicionar de 3 a 6 µL de RNAasa. Mezclar en vortex e incubar a 37 °C por 16-60 min y dejar enfriar a temperatura ambiente.

##### **Paso 2. Precipitación de Proteínas.**

- Adicionar 200 µL de Solución de Precipitación de Proteínas y mezclar en vortex.
- Incubar en hielo por 5 min.
- Centrifugar a 14 000 rpm por 3 minutos.

### Paso 3. Rehidratación y Precipitación de DNA.

- Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL que contenga 600 µL de isopropanol (frío) y mezclar en vortex.
- Centrifugar a 14 000 rpm por 3 min y decantar el sobrenadante.
- Adicionar 600 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente y mezclar en vortex.
- Centrifugar a 14 000 rpm por 2 min.
- Decantar el sobrenadante y secar el precipitado en el concentrador de vacío eppendorf vacufuge por 10-15 min.
- Rehidratar el DNA en 100 µL de solución de rehidratación a 4 °C/24 hrs.

La pureza y cantidad de DNA se determinó en el Nanodrop 2000 y se evaluara su integridad realizando un gel de agarosa al 1% con 0.5 µL de bromuro de etidio. El DNA se dividió en 2 alícuotas de 50 µL una se guardó a -20 °C y la otra a -4 °C para su utilización.

#### 7.5. Determinación de Subunidad 16S rRNA por PCR.

Se realizó la técnica de PCR donde se identificó la subunidad 16S rRNA de *M. catarrhalis* usando los siguientes primers descritos por [Bootsma et al., 2000].

Primer	Secuencia	Tamaño de Amplificación (pb)
<b>EUB-R (forward)</b>	5'-AGAGTTTGATCCTGGTTCAG-3'	600
<b>EUB-L (reverse)</b>	5'-CTTTACGCCCATTTAATCCG-3'	

## Mezcla de PCR

Reactivo	Concentración	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer	10 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5
DNTP's	10 mM	0.5
Primer EUB-R	50 $\mu\text{M}$	0.25
Primer EUB-L	50 $\mu\text{M}$	0.25
Agua (PCR estéril)	-	17.5
Taq Polymerase	5 U/ $\mu\text{L}$	0.5
DNA	200-400 ng/ $\mu\text{L}$	1
<b>Total</b>		<b>25<math>\mu\text{L}</math></b>

La PCR se realizó en el ArkTik Thermol Cycler VD1.07 (Gradient Enambled) Block 48-dual bajo las siguientes condiciones de amplificación, un hold de 98 °C (1min) a una temperatura de desnaturalización de 95 °C (30 seg), un alineamiento de 56°C (35 seg), una extensión de 72°C (30 seg) y uno hold de 72°C (1min) durante 35 ciclos.

Para identificar el producto amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.8% con 0.5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio, en cada pozo se colocaran 2  $\mu\text{L}$  de loading buffer y 5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR, se utilizó un marcador de 100-1000 pb Molecular Ruler BIO RAD para confirmar que el tamaño del producto sea el adecuado.

### 7.6. Determinación de Tipos 1, 2 y 3 del 16S rRNA por RFLP.

Se prepararon dos mezclas de restricción de acuerdo a lo referido por [Bootsma et. al., 2000].

a) Para la enzima HhaI (*Haemophilus haemolyticus*):

En un tubo eppendorf de 0.5 mL se colocaron 18  $\mu\text{L}$  de agua para PCR (estéril), 10  $\mu\text{L}$  del producto de PCR, 2  $\mu\text{L}$  de solución buffer Tango y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción Thermo Scientific HhaI 10 U/ $\mu\text{L}$ , se incubo a 37 °C durante 2 hrs.

Se procedió a la inhibición de la actividad de la enzima, agregando 3  $\mu\text{L}$  de EDTA 5 mM a pH=8.

b) Para la enzima FspBI (Bfal) (*Flavobacterium species* RFL1):

En un tubo eppendorf de 0.5 mL se colocaron 18  $\mu\text{L}$  de agua para PCR (estéril), 10  $\mu\text{L}$  del producto de PCR, 2  $\mu\text{L}$  de solución buffer Tango y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción Thermo Scientific FspBI 10 U/ $\mu\text{L}$ , se incubó a 37°C durante 2 hrs.

Se inhibió la actividad enzimática de restricción FspBI incubando a 65 °C/20 min.

Para identificar los productos de la restricción (RFLP) se realizó un corrimiento de los digeridos por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.8% con 0.5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio. En cada pozo se colocaron 2  $\mu\text{L}$  de loading buffer y 5  $\mu\text{L}$  del producto de RFLP utilizando un marcador de 100-1000 pb Molecular Ruler BIO para confirmar el tamaño del producto.

### 7.7. Clasificación de los Tipos del 16S rRNA.

La clasificación de los tres diferentes tipos de 16S rRNA se realizó de acuerdo a lo propuesto por *Bootsma et. al., 2000*. Esta clasificación se basa en el patrón de restricción que presenta el gen 16S rRNA mediante RFLP utilizando las enzimas de restricción *HhaI* (*Haemophilus haemolyticus*) y *FspBI* (Bfal) (*Flavobacterium species* RFL1).

La siguiente tabla muestra el tamaño que presentan las bandas en el patrón de restricción en base a lo descrito por *Bootsma et. al., 2000*.

Tipo	HhaI (pb)	FspBI (pb)
1	563	439/124
2	563	332/124/107
3	370/192	332/124/106

## 7.8 Clasificación de los Linajes.

Una vez identificados los tres tipos del 16S rRNA se relacionó de acuerdo a su linaje en base a lo descrito por *Bootsma et. al., 2000*.

<b>Tipo</b>	<b>Linaje</b>
<b>1</b>	Seroresistente
<b>2</b>	Serosensible
<b>3</b>	Serosensible

## 8. RESULTADOS.

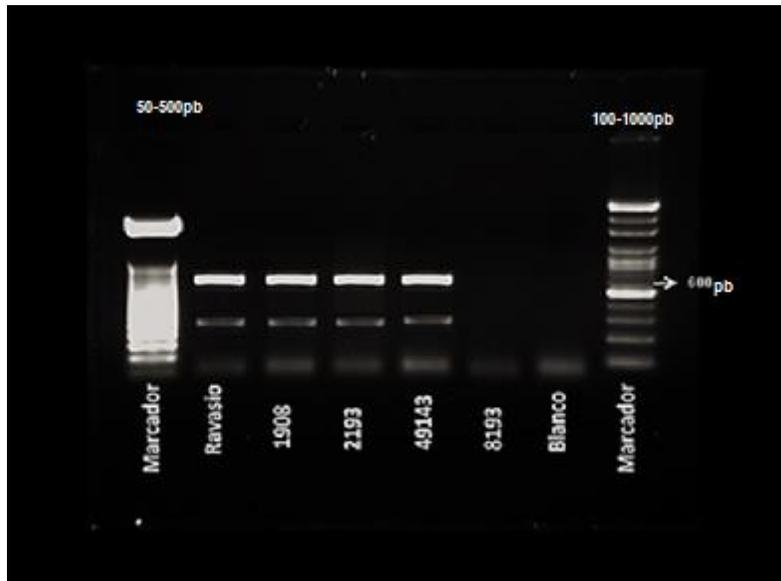
De un total de 565 pacientes participantes en este estudio, únicamente a 32 (4.7%) dieron positivo para *M. catarrhalis*. De cada aislado se seleccionaron un promedio de 5 colonias (clonas). En la tabla 1 se muestran los resultados de la identificación de linajes de los 32 pacientes clasificados en los dos grupos de edad. En algunos casos todas las clonas de un paciente son genéticamente homogéneas en cuanto a la presencia de linajes, así mismo se observó la presencia de diversidad genética entre las clonas de un mismo paciente presentando los dos linajes (infección mixta). Dentro de esta diversidad se presentaron casos en el que el patrón de digestión no permito clasificar a la clona en ninguno de los dos linajes reportados a lo que llamamos indeterminado.

**Tabla 1. Clasificación del linaje de *M. catarrhalis* en los 32 pacientes.**

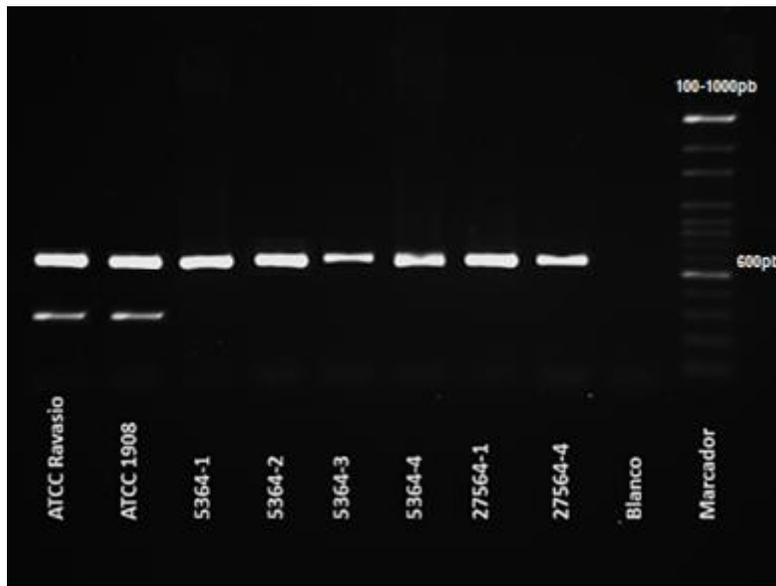
Total de Pacientes		Niños	Adultos	Linaje
2 (9.1%)		2(100%)	0 (0%)	Seroresistente
19 (86.4%)		8 (42.1%)	11 (57.9%)	Serosensible
1 (4.5%)		1 (4.5)	0 (0%)	Indeterminado
Infección Mixta	2 (20%)	1 (10%)	1 (10%)	Seroresistente/Serosensible
	6 (60%)	3 (30%)	3 (30%)	Seroresistente/Indeterminado
	1 (10%)	0 (0%)	1 (10%)	Serosensible/Indeterminado
	1 (10%)	1 (10%)	0 (0%)	Seroresistente/Serosensible/ Indeterminado

**Nota:** Los resultados globales de cada paciente, en los cuales se muestran las clonas aisladas donde se amplificó el gen 16S del rRNA, los fragmentos de restricción resultantes de la digestión enzimática con HhaI y FspBI, los tipos 1, 2 y 3 del gen 16S del rRNA y la clasificación de linajes se encuentran especificados en el anexo 1.

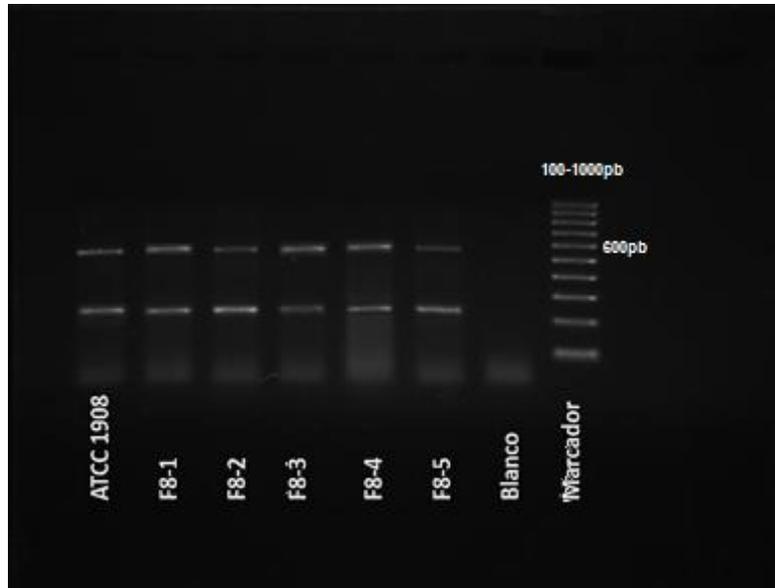
Ejemplos de los productos de la amplificación del gen 16S rRNA, así como del patrón de restricción resultante con HhaI y FspBI.



**Figura 11.** Amplificación de la PCR de las cepas de referencia de *M. catarrhalis*: Ravasio, 1908, 2193, 49143 revelaron una banda a 600 pb que corresponde al gen 16S rRNA y una segunda banda de 200-300 pb y la 8193 no amplificó; utilizando como controles un blanco (-). Marcador de peso molecular de 50-500pb y de 100-1000pb.



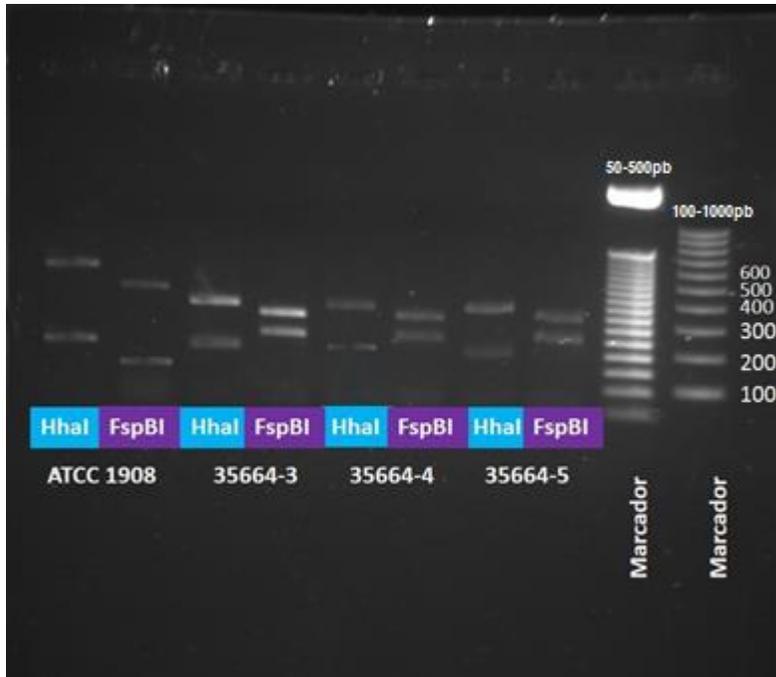
**Figura 12.** Amplificación del gen 16S rRNA de las clonas de los pacientes 5361-1, 2, 3, 4 y 27664-1 y 4, revelaron una banda de 600 pb; utilizando como controles las cepas de referencia Ravasio y 1908 (+) y un blanco (-). Marcador de peso molecular de 100-1000pb.



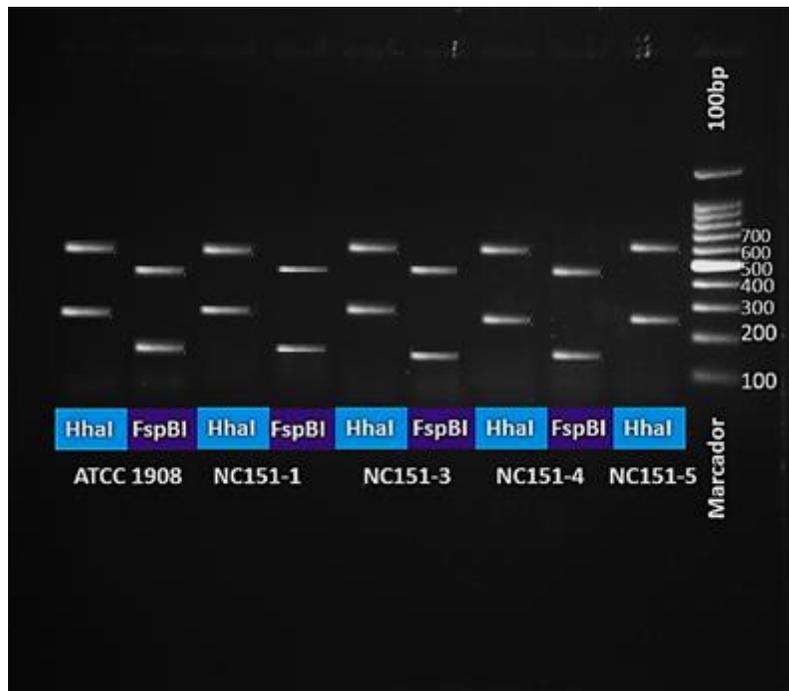
**Figura 13.** Amplificación del gen 16S rRNA, las clonas de los pacientes F8-1, 2, 3, 4 y 5 revelaron una banda de 600pb y otra entre 200-300pb; utilizando como controles las cepas de referencia 1908 (+) y un blanco (-). Marcador de peso molecular de 100-1000pb.



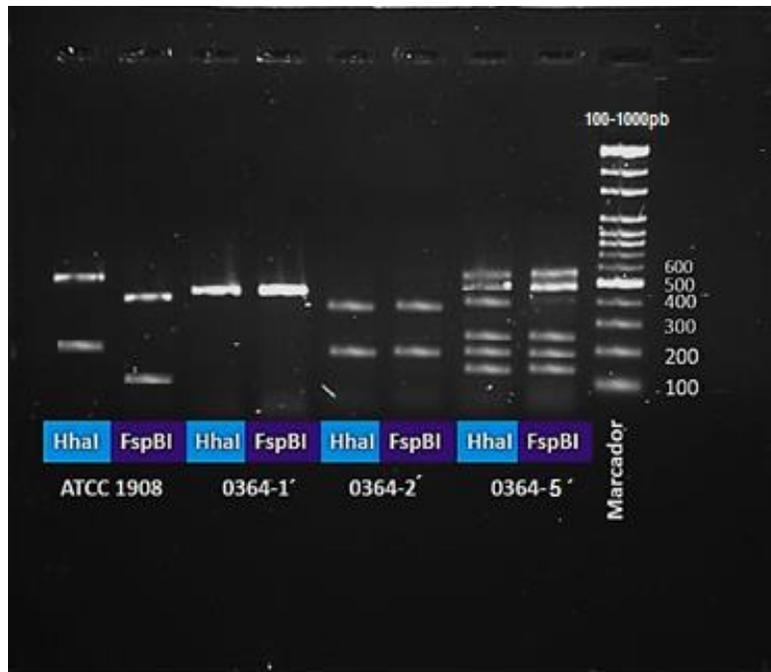
**Figura 14.** Patrón de restricción (RFLP) del aislado de *M. catarrhalis* del paciente 53964-1, 4 y 5. Se observa la cepa control ATCC 1908 con un patrón de bandeos tipo 1 del 16S rRNA; 53964-1 y -5 corresponden al tipo 3 y la 53964-4 al tipo 2 y 3. Marcador de peso molecular de 50-500pb y de 100-1000pb.



**Figura 15.** Patrón de restricción (RFLP) del aislado de *M. catarrhalis* del paciente 35664-3, 4 y 5. Se observa la cepa control ATCC 1908 con un patrón de bandeos tipo 1 del 16S rRNA; 35664-3, 4 y 5 corresponden al tipo 3. Marcador de peso molecular de 50-500pb y de 100-1000pb.



**Figura 16.** Patrón de restricción (RFLP) del aislado de *M. catarrhalis* del paciente NC151-1, 3, 4 y 5. Se observa la cepa control ATCC 1908 con un patrón de bandeos tipo 1 del 16S rRNA; NC151-1, 3, 4 y 5 corresponden al tipo 1. Marcador de peso molecular de 100-1000pb.



**Figura 17.** Patrón de restricción (RFLP) del aislado de *M. catarrhalis* del paciente 0364-1', 2' y 3'. Se observa la cepa control ATCC 1908 con un patrón de bandeos tipo 1 del 16S rRNA; 0364-1, 2 y 3 no corresponden a ningún tipo por lo que son catalogadas como indeterminadas. Marcador de peso molecular de 100-1000pb.

De los 32 pacientes solo 22 (68.8%) dio PCR positivo para el gen del 16S rRNA, y en 10 pacientes (31.2%) alguna(s) de sus clonas no amplificó el gen. De acuerdo al patrón de digestión por RFLP en los 22 pacientes presentaron para el tipo 1 (4.5%), tipo 2 (0%) y tipo 3 (68.2%). De los 10 pacientes que algunas de sus clonas no amplificaron, las que si amplificaron presentaron para el tipo 1 (70%), el tipo 2 (0%) y el tipo 3 (10%).

De acuerdo al tipo de 16S rRNA que se presentaron en los pacientes, se pudo saber el linaje correspondiente, teniendo los siguientes resultados:

De los 32 pacientes 10 (31.3%) pacientes presentaron infección mixta, es decir presencia de ambos linajes o bien algún linaje y otro indeterminado en un mismo paciente. De los 10 pacientes 4 (40%) son adultos y 6 (60%) son niños.

Los 10 pacientes con infección mixta presentaron cualquiera de las siguientes combinaciones 6 (60%) seroresistente/indeterminado, 3 (30%) niños y 3 (30%) adultos; 1 (10%) serosensible/indeterminado fueron niños; 2 (20%)

seroresistente/serosensible, 1 (10%) niños y 1 (10%) adultos y 1 (10%) serosensible/seroresistente/ indeterminado, fueron niños.

El (68.8%) de los pacientes que presentaron un solo linaje ya sea seroresistente, serosensible, o indeterminado; 2 (9.1%) presentaron linaje seroresistente, 100% fueron niños; 19 (86.4%) linaje serosensible, 11 (57.9%) fueron adultos y 8 (42.1%) niños; y 1 (4.5%) linaje indeterminado, corresponde a un niño femenino de 6 años.

## **9. ANALISIS DE RESULTADOS.**

El estudio caracterizó el linaje serosensible y seroresistente de aislados de *M. catarrhalis*, específicamente en un sector de la población del estado de México, con la finalidad de identificar si existe la presencia de aislados de *M. catarrhalis* asociados a virulencia.

A nivel mundial un estudio reporta que existe una incidencia del 83% del linaje seroresistente y un 16% del serosensible, no especifica grupos de edad.<sup>70</sup>

Este trabajo es el primer estudio donde se determina que un paciente puede tener el linaje serosensible, seroresistente, linaje indeterminado o bien la combinación de algunos de los linajes anteriores a lo que denominamos infección mixta. Esta se presentó tanto en niños (50%) como en adultos (50%) De acuerdo a los resultados la combinación que predominó en los pacientes fue seroresistente/indeterminado.

Cuando uno encuentra en un aislado, de un paciente con infección mixta se sugiere que la bacteria presenta variabilidad genética y puede deberse a la capacidad que tiene de intercambiar material genético y originar varias clonas en un aislado; este intercambio genético puede darse mediante transferencia horizontal principalmente, lo cual es factible por la competencia natural y aumento de la frecuencia de recombinación que presenta *M. catarrhalis*.<sup>69</sup>

En cuanto a los pacientes con un solo tipo de linaje los cuales prevalecieron en la población (68.8%). El linaje serosensible se presentó con mayor frecuencia en los dos grupos de edad. Sin embargo el linaje seroresistente posee una mayor

prevalencia en la población infantil, lo cual resulta interesante, ya que se trata de la presencia de un linaje asociado con mayor virulencia y debería ser tomado en cuenta en México, ya que la incidencia de infección con *M. catarrhalis* en niños durante los primeros 10 años de vida es importante por su asociación con la presencia de otitis media, y dicha infección es capaz de pasar de un estado agudo a crónico si no es tratada adecuadamente.

Los pacientes con linaje indeterminado debido a que no pertenecen a alguno de los tipos del 16S rRNA descritos en otros estudios. Mediante herramientas de genética de poblaciones (filogenética y análisis Bayesiano) se ha mostrado que el linaje seroresistente se caracteriza por su alta tasa de recombinación homóloga y mutación de genes que las del linaje serosensible,<sup>70</sup> por lo que quizá las clonas no pudieron genotipificarse y correspondan al linaje seroresistente debido a su variación dentro de su genoma y por lo tanto, esta variación no permita el alineamiento de los primers y por lo tanto no amplifique la PCR. Para poder confirmar este hecho es necesario buscar otro diseño de primers y ver que patrón de restricción se muestra o bien secuenciar el DNA para comprobar que hubo algún tipo de variación en ese gen por alguna mutación y compararlo con la secuencia de un aislado que si amplifico.

## 10. CONCLUSIÓN.

En el estudio se identificaron los linajes seroresistente y serosensible correspondientes a *M. catarrhalis* de la población mexicana estudiada, el más frecuente fue el linaje serosensible con una prevalencia del 86.4%.

Se identificó el gen 16S del rRNA en la mayor parte de los aislados de *M. catarrhalis* mediante PCR; y a través del RFLP se identificó el tipo 1, 2 y 3 del 16S rRNA con los cuales se clasificaron los linajes según *Bootsma et. all., 2000*.

Se encontró infección mixta, en la colonización por *M. catarrhalis*, lo cual no ha sido reportado en la literatura. El patrón con mayor prevalencia fue seroresistente/indeterminado con un 60%. Resulta interesante seguir estudiando la asociación de tipo de linaje con otros factores de virulencia para analizar el grado de patogenicidad que puede estar causando en un mismo hospedador.

Se comparó la prevalencia de los linajes en los dos grupos de edad y el de mayor prevalencia fue el serosensible en niños fue del 42.1% y en adultos del 57.9%. Sin embargo, es importante señalar que el linaje seroresistente tiene una prevalencia del 100% en la población infantil en comparación con la adulta.

En la población de México se encontraron aislados de *M. catarrhalis* virulentos, por lo que es importante diagnosticar la bacteria en los pacientes, dar el tratamiento oportuno y llevar a cabo métodos de prevención para evitar la colonización y resistencia en el hospedador.

## 11. ANEXO I. RESULTADOS GLOBALES.

Resultados de los pacientes estudiados para la identificación del gen 16S rRNA, sus tipos y clasificación de linaje de *M. catarrhalis*.

N° de Paciente	Clave	Clínica	Edad	Genero	PCR 16S rRNA	Enzima Hhal Tamaño de banda (pb)	Enzima FspBI Tamaño de banda (pb)	Observaciones <sup>1</sup>	Tipo	Linaje
1	563	IMSS 63	9	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	563-1	IMSS 63	9	F	600	370/192	563/439	FspBI (563)	3	Serosensible
	563-2	IMSS 63	9	F	600	370/192	563/439/192	FspBI (563/192)	3	Serosensible
	563-3	IMSS 63	9	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	563-4	IMSS 63	9	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	563-5	IMSS 63	9	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
2	864	IMSS 64	53	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	864-1	IMSS 64	53	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	864-2	IMSS 64	53	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	864-3	IMSS 64	53	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	864-4	IMSS 64	53	F	600/200-300	563/200-300			1	Seroresistente
	864-5	IMSS 64	53	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
3	1264	IMSS 64	47	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible

	1264-1	IMSS 64	47	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	1264-2	IMSS 64	47	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	1264-3	IMSS 64	47	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	1264-4	IMSS 64	47	F	600	370/192	563/332/200-300/192/124	FspBI (563/192)	3	Serosensible
	1264-5	IMSS 64	47	F	600	563/370-192	563/439/332/200-300	FspBI (563/439)	1,3	Serosensible/ Seroresistente
<b>4</b>	1764	IMSS 64	6	F	600/200-300	563/200-300	439/214		1	Seroresistente
	1764-1	IMSS 64	6	F	600/200-300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	1764-2	IMSS 64	6	F	600/200-300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	1764-3	IMSS 64	6	F	600/200-300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	1764-4	IMSS 64	6	F	600/200-300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	1764-5	IMSS 64	6	F	600/200-300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
<b>5</b>	1864	IMSS 64	18	F	NA	NA	NA		/	/
	1864-1	IMSS 64	18	F	NA	NA	NA		/	/
	1864-2	IMSS 64	18	F	NA	NA	NA		/	/
	1864-3	IMSS 64	18	F	NA	NA	NA		/	/
	1864-4	IMSS 64	18	F	NA	NA	NA		/	/
	1864-5	IMSS 64	18	F	600/200-300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
<b>6</b>	2264	IMSS 64	67	F	NA	NA	NA		/	/

	2264-1	IMSS 64	67	F	NA	NA	NA	/	/	
	2264-2	IMSS 64	67	F	600	370/192	332/200- 300/192/124	FspBI (192)	3	Serosensible
	2264-3	IMSS 64	67	F	600	370/192	332/200- 300/192/124	FspBI (192)	3	Serosensible
	2264-4	IMSS 64	67	F	600	370/192	600/332/200- 300/192	FspBI (600/192)	3	Serosensible
	2264-5	IMSS 64	67	F	600	370/192	332/200- 300/192/124	FspBI (192)	3	Serosensible
<b>7</b>	2864	IMSS 64	48	M	NA	NA	NA	/	/	
	2864-1	IMSS 64	48	M	NA	NA	NA	/	/	
	2864-2	IMSS 64	48	M	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	2864-3	IMSS 64	48	M	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	2864-4	IMSS 64	48	M	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	2864-5	IMSS 64	48	M	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
<b>8</b>	3864-1	IMSS 64	36	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	3864-2	IMSS 64	36	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
<b>9</b>	4264	IMSS 64	9	F	NA	NA	NA	/	/	
	4264 - 1	IMSS 64	9	F	NA	NA	NA	/	/	
	4264 - 2	IMSS 64	9	F	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	4264-3	IMSS 64	9	F	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	4264- 4	IMSS 64	9	F	NA	NA	NA	/	/	

	4264 - 5	IMSS 64	9	F	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
<b>10</b>	5064-1	IMSS 64	18	M	NA	NA	NA		/	/
	5064-2	IMSS 64	18	M	600/200 -300	563-200-300			1	Seroresistente
	5064-3	IMSS 64	18	M	NA	NA	NA		/	/
	5064-4	IMSS 64	18	M	NA	NA	NA		/	/
	5064-5	IMSS 64	18	M	600/200 -300	563/200-300			1	Seroresistente
	5164-1	IMSS 64	8	M	NA	NA	NA		/	/
<b>11</b>	5164-2	IMSS 64	8	M	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	5164-3	IMSS 64	8	M	600/200 -300	563/200-300			1	Seroresistente
	5164-4	IMSS 64	8	M	600/200 -300	563/200-300			1	Seroresistente
	5164-5	IMSS 64	8	M	NA	NA	NA		/	/
	6764	IMSS 64	22	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
<b>12</b>	6764 - 1	IMSS 64	22	F	600	370/192	332/200- 300/192/124	FspBI (192)	3	Serosensible
	6764-2	IMSS 64	22	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	6764 -3	IMSS 64	22	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	6764 -4	IMSS 64	22	F	600	370/192	332/200- 300/192/124	FspBI (192)	3	Serosensible
	6764 -5	IMSS 64	22	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	<b>13</b>	7264-1	IMSS 64	4	M	200-300	NA	124		/

	7264-2	IMSS 64	4	M	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente	
	7264-3	IMSS 64	4	M	200-300	NA	124	/	/	
	7264-4	IMSS 64	4	M	200-300	NA	124	/	/	
	7264-5	IMSS 64	4	M	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente	
	7264-6	IMSS 64	4	M	200-300	NA	124	/	/	
<b>14</b>	NC151	INP	2	F	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente	
	NC151 -1	INP	2	F	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente	
	NC151 - 2	INP	2	F	NA	NA	NA	/	/	
	NC151 - 3	INP	2	F	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente	
	NC151 -4	INP	2	F	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente	
	NC151 - 5	INP	2	F	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente	
<b>15</b>	NC147	INP	*10	F	/	/	/	/	/	
	NC147 -1	INP	*10	F	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente	
	NC147 -2	INP	*10	F	NA	NA	NA	/	/	
	NC147 -3	INP	*10	F	NA	NA	NA	/	/	
	NC147 -4	INP	*10	F	NA	NA	NA	/	/	
	NC147 - 5	INP	*10	F	NA	NA	NA	/	/	
<b>16</b>	364-1'	IMSS 64	6	F	600	500	500	Hhal,FspBI (500)	/	Indeterminado
	364-3'	IMSS 64	6	F	600	370/192	370/192	FspBI(370/192)	/	Indeterminado
	364-5'	IMSS 64	6	F	600	563/500/439/ 332/200- 300/200/100	563/500/439/ 332/200- 300/100-200	Hhal (500/439/332/20	/	Indeterminado

									0/100), FSpBI (500/100-200)	
<b>17</b>	964-1'	IMSS 60	1.3	M	600	370/192	332-200-300		3	Serosensible
	964-2'	IMSS 61	1.3	M	600	370/192	332/200- 300/192/124	FspBI (192)	3	Serosensible
	964-3'	IMSS 62	1.3	M	600	370/192	332/200- 300/192/124	FspBI(192)	3	Serosensible
	964-4'	IMSS 63	1.3	M	600	370/192	332/200- 300/192/124	FspBI (192)	3	Serosensible
	964-5'	IMSS 64	1.3	M	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
<b>18</b>	3064-2	IMSS 64	54	F	600	563/370/192	563/332/200- 300/192/124	FspBI (192)	2,3	Serosensible
	3064-4	IMSS 64	54	F	600	563/370/192	563/332/200- 300		2,3	Serosensible
<b>19</b>	27564-1	IMSS 64	3	F	600	563/370/192	563/332/200- 300		2,3	Serosensible
	27564-4	IMSS 64	3	F	600	563/370/192	563/332/200- 300		2,3	Serosensible
<b>20</b>	53964-1	IMSS 64	2	F	600	563/370/192	563/332/200- 300		2,3	Serosensible
	53964-4	IMSS 64	2	F	600/200 -300	600/370/192	563/332/200- 300	Hhal (600)	2,3	Serosensible
	53964-5	IMSS 64	2	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
<b>21</b>	53064-1	IMSS 64	37	M	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	53064-2	IMSS 64	37	M	600	370/192	563/332/200- 300	FspBI (563)	3	Serosensible
	53064-3	IMSS 64	37	M	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	53064-4	IMSS 64	37	M	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
<b>22</b>	11664-1	IMSS 64	*6	F	NA	NA	NA	/	/	

	11664-2	IMSS 64	*6	F	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente
	11664-3	IMSS 64	*6	F	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
	11664-4	IMSS 64	*6	F	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente
	11664-5	IMSS 64	*6	F	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
<b>23</b>	15364-2	IMSS 64	4	M	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
	15364-3	IMSS 64	4	M	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
	15364-5	IMSS 64	4	M	600	563/370/192	332/200-300	2,3	Serosensible
<b>24</b>	24864-1	IMSS 64	85	F	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
	24864-2	IMSS 64	85	F	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
<b>25</b>	35664-3	IMSS 64	3	M	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
	36664-4	IMSS 64	3	M	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
	35664-5	IMSS 64	3	M	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
<b>26</b>	GCE-1	IMSS 64	13	F	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
	GCE-2	IMSS 64	13	F	600	370/192	332	3	Serosensible
	GCE-3	IMSS 64	13	F	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
	GCE-5	IMSS 64	13	F	600	370/192	332/200-300	3	Serosensible
<b>27</b>	OEC-1	IMSS 64	43	F	600/200 -300	370/192	332/200-300	3	Serosensible
	OEC-2	IMSS 64	43	F	600	370/192	332-200-300	3	Serosensible

	OEC-3	IMSS 64	43	F	600	370/192	563/332/200- 300	FspBI (563)	3	Serosensible
	OEC-4	IMSS 64	43	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	OEC-5	IMSS 64	43	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
<b>28</b>	DLC-2	IMSS 64	30	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	DLC-3	IMSS 64	30	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
<b>29</b>	GO-1	IMSS 64	54	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	GO-2	IMSS 64	54	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	GO-3	IMSS 64	54	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	GO-4	IMSS 64	54	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	GO-5	IMSS 64	54	F	600	370/192	332/200-300		3	Serosensible
<b>30</b>	R11-1	IMSS 64	62	F	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	R11-2	IMSS 64	62	F	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	R11-3	IMSS 64	62	F	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	R11-4	IMSS 64	62	F	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
	R11-5	IMSS 64	62	F	600/200 -300	563/200-300	439/124		1	Seroresistente
<b>31</b>	C70-1	IMSS 64	70	F	600/200 -300	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	C70-2	IMSS 64	70	F	600/200 -300	370/192	332/200-300		3	Serosensible
	C70-3	IMSS 64	70	F	600/200 -300	370/192	332/200-300		3	Serosensible

	C70-4	IMSS 64	70	F	600/200 -300	370/192	332/200-300	3	Serosensible
	C70-5	IMSS 64	70	F	600/200 -300	370/192	332/200-300	3	Serosensible
<b>32</b>	F8-1	IMSS 64	8	M	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente
	F8-2	IMSS 64	8	M	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente
	F8-3	IMSS 64	8	M	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente
	F8-4	IMSS 64	8	M	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente
	F8-5	IMSS 64	8	M	600/200 -300	563/200-300	439/124	1	Seroresistente
<b>Controles</b>									
	<b>ATCC 8193</b>				NA	NA	NA	NA	NA
	<b>ATCC 49143</b>				600/200 -300	563/200-300	600/200-300	FspBI (600)	1 Seroresistente
	<b>ATCC Ravasio</b>				600/200 -300	563/200-300	439/124		1 Seroresistente
	<b>ATCC 1908</b>				600/200 -300	563/200-300	439/124		1 Seroresistente
	<b>ATCC 2193</b>				600/200 -300	563/200-300	439/124		1 Seroresistente

Para el caso de la edad (\*) expone la edad en meses. -1,-2,-3,-4,-5 después de la clave corresponde al número de clona. (NA) No Amplifico. <sup>1</sup> Observaciones (tamaños de banda identificados no relacionados con el tipo 1, 2 y 3 del 16S rRNA).

## 12. ANEXO 2. Preparación de Medios de Cultivo.

Medio de Cultivo	Composición
<b>Agar Sangre</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agar Sangre DIBICO: 40 g→1 L de agua destilada.</li> <li>▪ Esterilizar 121 °C/15 Lb/15 min.</li> <li>▪ Enfriar a 40-45 °C.</li> <li>▪ Agregar 5% de sangre de conejo estéril desfibrinada.</li> </ul>
<b>Agar Soya Trypticaseína + X</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Caldo Soya Trypticaseína BIOXON: 30 g→1 L de agua destilada.</li> <li>▪ Bacto Agar DIFCO: 1.5%.</li> <li>▪ Extracto de Levadura BIOXON: 5%.</li> <li>▪ Esterilizar 121 °C/15 Lb/15 min.</li> </ul>
<b>Agar DNAasa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agar test Desoxyribonucléase Merck: 42 g→1 L de agua destilada.</li> <li>▪ Esterilizar 121°C/15 Lb/15 min.</li> </ul>
<b>Agar Lipasa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Caldo Soya Tryptcaseína BIOXON: 30 g→1 L de agua destilada.</li> <li>▪ Bacto Agar DIFCO 1.5%.</li> <li>▪ Esterilizar 121°C/15 Lb/15 min.</li> <li>▪ Reactivo de Lipasa: 1 mL de Tween, 100 mL de agua destilada y 25 mL de aceite de oliva (virgen puro).</li> </ul>
<b>Carbohidratos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Glucosa</b></li> <li>▪ <b>Sacarosa</b></li> <li>▪ <b>Fructosa</b></li> <li>▪ <b>Maltosa</b></li> <li>▪ <b>Lactosa</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Medio CTA BIOXON: 28.5 g→1 L de agua destilada.</li> <li>▪ Bacto Agar DIFCO 1.5%.</li> <li>▪ Agregar 1% del carbohidrato (Glucosa, Sacarosa, Fructosa, Maltosa y Lactosa) según corresponda.</li> <li>▪ Dispensar alícuotas de 3 mL en tubos de vidrio.</li> <li>▪ Esterilizar: 115-118 °C/12 Lb/10 min.</li> </ul>
<b>Caldo Infusión Cerebro Corazón</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Infusión Cerebro corazón MCD-LAB: 37 g→1 L de agua destilada.</li> <li>▪ Dispensar alícuotas de 2 mL en tubos de vidrio.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Esterilizar: 121°C/15 Lb/15 min.</li></ul>
<b>Skim Milk</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Leche descremada Svelty: 2 g de →100 mL</li><li>▪ Infusión Cerebro corazón MCD-LAB: 3 g→100 mL de agua destilada.</li><li>▪ Glucosa 0.5 g →100 mL.</li><li>▪ Glicerol estéril 13%.</li><li>▪ Esterilizar 121 °C/15 Lb/15 min.</li></ul>

### 13. BIBLIOGRAFÍA.

1. Ahmad, F., Young, H., McLeod, D., Croughan, M. and Calder, M. (1987). Characterisation of *Branhamella catarrhalis* and Differentiation from *Neisseria* Species in a Diagnostic Laboratory. *J. Clin. Pathol*, 40, 1369-1373.
2. Ackermann, N., Tiller, M., Anding, G., Roggenkamp, A. and Heesemann, J. (2008). Contribution of Trimeric Autotransporter C-Terminal Domain Sotoligomeric Coiled-coil Adhesin (Oca) Family Members Yada, Uspa1, Eiba, and Hia to Translocation of the YadA Passenger Domain and Virulence of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol*, 190, 5031–5043
3. Arbibe, L., Mira, J., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P., Ulevitch, R., and Knaus, U. (2000). Toll-Like Receptor 2 Mediated NF-kappa B Activation Requires a Rac1-Dependent Pathway. *Nat. Immuno*, 1, 533-540.
4. Attia, A., Sedillo, J., Wang, W., Liu, W., Brautigam, C., Winkler, W. and Hansen, E. (2008). *Moraxella catarrhalis* Expresses an Unusual Hfq Protein. *Infect Immun*, 76, 2520-2530.
5. Attia, A., Lafontaine, E., Latimer, J., Aebi, C., Syrogiannopoulos, A. and Hansen, E. (2005). The UspA2 Protein of *Moraxella catarrhalis* is Directly Involved in the Expression of Serum Resistance. *Infect Immun*, 73, 2400-2410.
6. Attia, A., Ram, S., Rice, P. and Hansen, E. (2006). Binding of Vitronectin by the *Moraxella catarrhalis* UspA2 Protein Interferes with Late Stages of the Complement Cascade. *Infect Immun*, 74, 1597-1611.

7. Attia, A., Lafontaine, E., Latimer, J., Aebi, C., Syrogiannopoulos, G. and Hansen, E. (2004). The UspA2 Protein of *Moraxella catarrhalis* is Directly Involved in the Expression of Serum Resistance. *Infection and Immunity*, 54 (2), 1200-1210.
8. Balder, R., Hassel, J., Lipski, S. and Lafontaine, E. (2007). *Moraxella catarrhalis* Strain O35E Expresses two Filamentous hemagglutinin-like proteins that Mediate Adherence to Human Epithelial Cells. *Infect Immun*, 75, 2765–2775.
9. Bootsma, H., van der Heide, H., van de Pas, S., Schouls, L., and Mooi F. (2000). Analysis of *Moraxella catarrhalis* by DNA Typing: Evidence for a Distinct Subpopulation Associated with Virulence Traits. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 1376-1387.
10. Brooks, M., Sedillo, N., Wagner, C., Laurence, W., Wang, A., Attia, E., Hansen, and Gray-Owen, S. (2008). Modular Arrangement of Allelic Variants Explains the Divergence in *Moraxella catarrhalis* UspA Protein Function. *Infect Immun*, 76, 5330-5340.
11. Brooks, M., J., Sedillo, N., Wagner, W., Wang, A., Attia, H., Wong, C., Laurence, E., Hansen, and Gray-Owen, S. (2008). *Moraxella catarrhalis* binding to Host Cellular Receptors is mediated by Sequence Specific Determinants Not Conserved Among all UspA1 Protein Variants. *Infect. Immun*, 76, 5322–5329.
12. Bullard, B., Lipski, S. and Lafontaine, E. (2005). Hag Directly Mediates the Adherence of *Moraxella catarrhalis* to Human Middle Ear Cells. *Infect. Immun*, 73, 5127–5136.

13. Cotter, S., Surana, N. and Geme III, J. (2005). Trimeric Autotransporters: a Distinct Subfamily of Autotransporter Proteins. *Trends Microbiol*, 13, 199-205.
14. Craig, L., Pique, M. and Tainer, M. (2004). Type IV Pilus Structure and Bacterial Pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol*, 2, 363-378.
15. Elaine, S. Walker, R., Preston, A., Pos, C., Garth, E., kalbfleisch, J. and klingman, K. (1998). Genetic Diversity among Strains of *Moraxella catarrhalis*. Analysis Using Multiple DNA Probes and a Single Mocus PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Method. *Clinical Microbiology*, 36, (7), 1977-1983.
16. Enright and Mckenzie, H. (1997). *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, Clinical and Molecular Aspects of a Rediscovered Pathogen *J. Med. Microbiol*, 46, 360-371.
17. Esparcia, O. y Magraner, J. (2010). *Moraxella catarrhalis* y su Implicación en Patología Infecciosa Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valencia.
18. Forsgren, A., Brant, M., Karamehmedovic, M. and Riesbeck, K. (2003). The immunoglobulin D-binding protein MID from *Moraxella catarrhalis* is also an adhesin. *Infect. Immun*, 71, 3302-3309.
19. Furano, K., Luke, N., Howlett, A. and Campagnari, A. (2005). Identification of a Conserved *Moraxella catarrhalis* Haemoglobin Utilization Protein, MhuA. *Microbiology*, 151, 1151-1158.
20. García, L. y Maeso, M. (1998). Infecciones por *Moraxella spp.* Servicios de Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Hospital Clínica y Provincial. Barcelona. 3634-3636.

21. Gray-Owen, S., and Blumberg, R. (2006). CEACAM1: Contact Dependent Control of Immunity. *Nat. Rev Immunol*, 6, 433-446.
22. Gjørloff Wingren, A., Hadzic, R., Forsgren, A. and Riesbeck, K. (2002). The Novel IgD Binding Protein from *Moraxella catarrhalis* induces human B Lymphocyte Activation and Ig Secretion In The Presence of Th2 Cytokines. *J. Immunol*, 168, 5582-5588.
23. Hall-Stoodley, Costerton, L., and Stoodley, P., (2004). Bacterial Biofilms: from the Natural Environment to Infectious Diseases. *Nat. Rev. Microbiol*, 2, 95-108.
24. Hall-Stoodley, L., Hu, F., Gieseke, A., Nistico, N., Nguyen, D., Hayes, J., Forbes, M., Greenberg, D., Dice, B., Burrows, A., Wackym, P., Stoodley, P., Post, J., Ehrlich, G., and Kerschner, J., (2006). Direct detection of Bacterial Biofilms on the Middle Ear Mucosa of Children with Chronic Otitis Media. *JAMA*, 296, 202-211.
25. Hammarström, S. (1999). The Carcinoembryonic Antigen (CEA) Family: Structures, Suggested Functions and Expression in Normal and Malignant Tissues. *Semin Cancer Biol*, 9, 67-81.
26. Heiniger, N., Troller, P., Meier, and Aebi, C. 2005. Cold Shock Response of the UspA1 Outer Membrane Adhesin of *Moraxella catarrhalis*. *Infect Immun*, 73, 8247-8255.
27. Helminen, M., Maciver, I., Latimer, J., Klesney-Tait, J., Cope, L., Paris, M., McCracken, G. and Hansen, E. (1994). A Large, Antigenically Conserved Protein on the Surface of *Moraxella catarrhalis* is a Target For protective Antibodies. *J. Infect Dis*, 170, 867-872.

28. Hill, D., Edwards, H., Rowe, and Virji, M. (2005). Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule (CEACAM) binding Recombinant Polypeptide Confers Protection against Infection by Respiratory and Urogenital Pathogens. *Mol. Microbiol*, 55, 1515-1527.
29. Hill, D., and Virji, M. (2003). A Novel Cell binding Mechanism of *Moraxella catarrhalis* Ubiquitous Surface Protein UspA: Specific Targeting of the N-Domain Of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules by UspA1. *Mol. Microbiol*, 48, 117-129.
30. Hodak, H., Clantin, B., Willery, E., Villeret, V., Locht, C. and Jacob-Dubuisson, F. (2006). Secretion Signal of the Filamentous Haemagglutinin, a Model Two Partner Secretion Substrate. *Mol. Microbiol*. 61, 368-382.
31. Holm, M., Vanlerberg, S., Sledjeski, D., and Lafontaine, E. (2003). The Hag Protein of *Moraxella catarrhalis* Strain O35E is associated with Adherence to Human Lung and Middle Ear Cells. *Infect Immun*, 71, 4977- 4984.
32. Jeremiah, D., Vries, S. Aza, A., Fen, Z., Bootsma, J., Kim, S., Hermans, P., Wadowsky, R., Ehrlich, G., Hays, J. and Campagnari, A. (2011). Comparative Analysis and Supragenome Modeling of Twelve *Moraxella catarrhalis* Clinical Isolates. *BMC Genomics*, 12, 70.
33. Lafontaine, D., Cope, C., Aebi, J., Latimer, G., McCracken, Jr., and Hansen, E. (2000). The UspA1 Protein and a Second Type of UspA2 Protein Mediate Adherence of *Moraxella catarrhalis* to Human Epithelial Cells in Vitro. *J. Bacteriol*, 182, 1364-1373.
34. Leañós, B., Miranda., M., Solórzano, F., Ortiz, L. and Guiscafré, H. (2001). Prevalencia de Colonización por *Moraxella catarrhalis* en Portadores Asintomáticos Menores de Seis Años. *Salud Pública*, 43, 27-31.

35. Lein, J., Tis, M. Hussl B., et al. (1989). Definition and Classification of Otitis Media. *Ann Otol Rhino Laryngol.* 10 Suppl, 139, 112-115.
36. Lezana, M. (2009). *Epidemiología, México.* 26 (34).
37. Lipski, S., Akimana, C., Timpe, J., Wooten, R., and Lafontaine, E. (2007). The *Moraxella catarrhalis* Autotransporter McaP is a Conserved Surface protein that Mediates Adherence to Human Epithelial Cells Through its N-terminal Passenger Domain. *Infect Immun.* 75, 314-324.
38. Liu, D., Mc Michael, J., and Baker, S. 2007. *Moraxella catarrhalis* Outer Membrane Protein CD Elicits Antibodies that Inhibit CD Binding to Human Mucin and Enhance Pulmonary Clearance of *M. catarrhalis* in a mouse model. *Infect Immun,* 75, 2818-2825.
39. López, V., Borgaro, R., Jaramillo, R., Fragoso, E. y Newton, O. (1998). Otitis Media Aguda en Pediatría. *Salud pública de México,* 40, 450-455.
40. Losa, J. y Marcos, M. (1998). Infecciones por *Moraxella* spp. *Servicios de Enfermedades Infecciosas y Microbiología,* 7 (78), 3634-3636.
41. Luke, N., Jurcisek, J., Bakaletz, L. and Campagnari, A. (2007). Contribution of *Moraxella catarrhalis* Type IV Pili to Nasopharyngeal Colonization and Biofilm Formation. *Infect. Immun,* 75, 5559-5564.
42. Mc Michael, J., Fiske, M., Fredenburg, R., Chakravarti, D., Van Der Meid, K., Barniak, V., Caplan, J., Bortell, E., Baker, S., Arumugham, R., and Chen, D. (1998). Isolation and Characterization of Two Proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a Common Epitope. *Infect Immun,* 66, 4374- 4381.

43. Meier, P., Troller, N., Heiniger, I., Grivea, G., Syrogiannopoulos, and Aebi, C. (2005). *Moraxella catarrhalis* Strains with Reduced Expression of the UspA Outer Membrane Proteins Belong to a Distinct Subpopulation. *Vaccine*, 23, 2000-2008.
44. Milis, L., Morris, C., Sheehan, M., Charlesworth, J., and Pussell, B. (1993). Vitronectin Mediated On hibition of Complement: Evidence for Different Binding Sites for C5b-7 and C9. *Clin. Exp. Immunol*, 92, 114-119.
45. Murphy, T., Bakaletz, O., and Smeesters, P. 2009. Microbial Interactions in the Respiratory Tract the Pediatric Infectious. 28 (10), 121-126.
46. N'guessan, D., P. D., Vigelahn, M., Bachmann, S., Zabel, S., Opitz, B., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Zweigner, J., Riesbeck, K., Singer, B., Suttorp, N., and Slevogt, H. (2007). The UspA1 Protein of *Moraxella catarrhalis* Induces CEACAM1 Sependent Apoptosis in Alveolar Epithelial Cells. *J. Infect Dis.*, 195, 1651-1660.
47. Nordström, T., Blom, A., Tan, T., Forsgren, A. and Riesbeck. K. (2005). Ionic binding of C3 to the Human Pathogen *Moraxella catarrhalis* is a Unique Mechanism for Combating Innate Immunity. *J. Immunol*, 175, 3628-3636.
48. Nordström, T., Blom, A., Forsgren, A. and Riesbeck. K. (2004). The emerging Pathogen *Moraxella catarrhalis* interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2. *J. Immunol*. 173, 4598-4606.
49. Pearson, M. and Hansen, E. (2007). Identification of gene products involved in biofilm production by *Moraxella catarrhalis* ETSU-9 in vitro. *Infect. Immun*, 75, 4316-4325.

50. Pearson, M., Laurence, C., Guinn, S. and Hansen, E. (2006). Biofilm Formation by *Moraxella catarrhalis* in Vitro: Roles of the UspA1 Adhesin and the Hag Hemagglutinin. *Infect. Immun*, 74, 1588-1596.
51. Pearson, M., Lafontaine, E., Wagner, N., Geme III, S. and Hansen, E. (2002). A Hag Mutant of *Moraxella catarrhalis* Strain O35E is Deficient in Hemagglutination, Autoagglutination, and Immunoglobulin D Binding Activities. *Infect Immun*, 70, 4523-4533.
52. Plamondon, P., Luke, N. and Campagnari, A. (2007). Identification of a Novel Two Partner Secretion Locus in *Moraxella catarrhalis*. *Infect Immun*. 75, 2929-2936.
53. Ratledge, C., and Dover, L. (2000). Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*, 54, 881-941.
54. Reddy, M., Murphy, T., Faden, H., and Bernstein, J. (1997). Middle Ear Mucin Glycoprotein: Purification and Interaction with Nontypable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *Otolaryngol. Head Neck Surg*, 116, 175-180.
55. Schmitt, C., Turner, D., Boesl, M., Abele, M., Frosch, M., and Kurzai, O. (2007). A Functional Two Partner Secretion System Contributes to Adhesion of *Neisseria meningitidis* to Epithelial Cells. *J. Bacteriol*, 189, 7968-7976.
56. Sitkiewicz, I., Stockbauer, K. and Musser, J. (2007). Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol*. 15, 63-69.

57. Slevogt, H., Zabel, S., Opitz, B., Hocke, A., Eitel, J., N\_guessan D., Lucka, L., Riesbeck, K., Zimmermann, W., Zweigner, J., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Suttorp, N. and Singer, B. (2008). CEACAM1 Inhibits Toll like Receptor 2-triggered Antibacterial Responses of Human Pulmonary Epithelial Cells. *Nat. Immunol*, 9, 1270-1278.
58. Slevogt, H., Seybold, J., Tiwari, K., Hocke, A., Jonatat, C., Dietel, S., Hippenstiel, S., Singer, B., Bachmann, S., Suttorp, N., and Opitz, B. (2007). *Moraxella catarrhalis* is internalized in Respiratory Epithelial Cells by a Trigger-Like Mechanism and Initiates a TLR2 and Partly NOD1 Dependent Inflammatory Immune Response. *Cell. Microbiol*, 9, 694-707.
59. Slevogt, H., Schmeck, B., Jonatat, C., Zahlten, J., Beermann, W., van Laak, B., Opitz, S., Dietel, P., Guessan, S., Hippenstiel, N., Suttorp, and Seybold, J. (2006). *Moraxella catarrhalis* Induces Inflammatory Response of Bronchial Epithelial Cells via MAPK and NF-k appa B Activation and Histone Deacetylase Activity Reduction. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*, 290, L818-L826.
60. Sheehan, M., Morris, C., Pussell, B. and Charlesworth, J. (1995). Complement Inhibition by Human Vitronectin Involves Non Heparin Binding Domains. *Clin. Exp. Immunol*, 101, 136-141.
61. Spaniol, V., Heiniger, N., Troller, R. and Aebi, C. (2008). Outer Membrane Protein UspA1 and Lipooligosaccharide are involved in Invasion of Human Epithelial Cells by *Moraxella catarrhalis*. *Microbes Infect*, 10, 3-11.
62. Tan, T., Nordstrom, A., Forsgren, and Riesbeck, K. (2005). The Respiratory Pathogen *Moraxella catarrhalis* Adheres to Epithelial Cells by Interacting with Fibronectin through Ubiquitous Surface Proteins A1 and A2. *J. Infect. Dis*, 192, 1029-1038.

63. Timpe, J., Holm, M., Vanlerberg, S., Basrur, V. and Lafontaine, E. (2003). Identification of a *Moraxella catarrhalis* Outer Membrane Protein Exhibiting Both Adhesin and Lipolytic Activities. *Infect. Immun*, 71, 4341–4350.
64. Verduin, C. Hol, C., Fleer, A., van Dijk, H. and van Belkum, A. (2002). *Moraxella catarrhalis*: from Emerging to Established Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (1) 125-144.
65. Verhaegh, S. , Snippe, M. , Levy, F. , Verbrugh, H. , Jaddoe, V. , Hofman, A. , Moll, H. , van Belkum, A. and John P. Hays, J. (2011). Colonization of Healthy Children by *Moraxella catarrhalis* is characterized by Genotype Heterogeneity, Virulence Gene Diversity and Co-Colonization with *Haemophilus influenzae*. *Microbiology*, 157, 169-178.
66. Verhaegh, S. , Vogel, C. , Riesbeck, K. , Lafontaine, E. , Murphy, T. , Verbrugh, H. , Jaddoe, V. , Hofman, H. , Moll, H. , van Belkum, A. and Hays, H. (2011). Temporal Development of The Humoral Immune Response to Surface Antigens of *Moraxella catarrhalis* in Young Infants. *Medical Microbiology*. 189, 1201-1211.
67. Verhaegh, S., Streefland, A., Dewnarain, J., Farrell, D., Belkum, A. and Hays J. (2008). Age-related Genotypic and Phenotypic Differences in *Moraxella catarrhalis* Isolates from Children and Adults Presenting with Respiratory Disease In 2001-2002. *Microbiology*, 154, 1178-1184.
68. Vries, S., Bootsma, H., Hays, P. and Hermans, P. (2009). Molecular Aspects of *Moraxella catarrhalis* Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 73 (3), 389-406.

69. Wirth, T., Morelli, G., Kusecek, B., van Belkum, A., van der Schee, C., Meyer, M. and Achtman, M. (2007). The Rise and Spread of a new Pathogen: Seroresistant *Moraxella catarrhalis*. *Genome Research*, 17, 1647-1656.