



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* NO
TIPIFICABLE EN PACIENTES CON INFECCIÓN
RESPIRATORIA AGUDA MEDIANTE LA REACCION
EN CADENA DE LA POLIMERASA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

MANUEL ALEJANDRO ROSAS ORTIZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LUZ ELENA ESPINOSA DE LOS MONTEROS PEREZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ

VOCAL: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

SECRETARIO: LUZ ELENA ESPINOSA DE LOS MONTEROS PEREZ

1er. SUPLENTE: PATRICIA ARZATE BARBOSA

2° SUPLENTE: FRANCISCO JAVIER DIAZ GARCIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

HOSPITAL GENERAL "MANUEL GEA GONZÁLEZ"

ASESOR DEL TEMA

DRA. LUZ ELENA ESPINOSA DE LOS MONTEROS PEREZ

SUSTENTANTE

MANUEL ALEJANDRO ROSAS ORTIZ

ÍNDICE

1. Introducción	
1.1. Antecedentes Históricos.....	1
1.2. Generalidades.....	2
1.3. Fisiología.....	3
2. Estructura antigénica “polisacáridos capsulares”.....	7
2.1. Proteasa IgA1.....	10
2.2. Fimbrias.....	11
3. Vías de transmisión.....	12
3.1. FACTORES DE PATOGENICIDAD.....	15
4. Manifestaciones clínicas.....	16
4.1. Meningitis.....	16
4.2. Epiglotitis.....	17
4.3. Otitis media.....	17
4.4. Sinusitis.....	17
4.5. Traqueo-bronquitis febril aguda.....	18
4.6. Neumonía.....	18
4.7. Bacteremia.....	19
4.8. Conjuntivitis.....	19
4.9. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).....	19
5. Sistemas de caracterización para la identificación de <i>Haemophilus influenzae</i>	20
6. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana.....	27
7. Planteamiento del problema.....	30
8. Objetivo general.....	30
8.1. Objetivos específicos.....	30
9. Hipótesis.....	30
10. Población estudiada.....	31
10.1. Criterios de Inclusión.....	31

10.2. Criterios de Exclusión.....	31
11. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
11.1. Esquema general de trabajo.....	32
11.2. Material biológico.....	33
11.2.1. Controles utilizados.....	33
11.2.2. Obtención y transporte de las muestras.....	33
11.2.3. Transporte de la muestra.....	34
11.3. Métodos de Análisis de las muestras.....	35
11.3.1. Fenotípicos.....	35
11.3.2. Cultivo.....	35
11.3.3. Identificación macroscópica y microscópica.....	36
11.3.4. Pruebas bioquímicas.....	37
11.3.5. Requerimientos de factores X y V(Satelitismo).....	37
11.3.6. Identificación de Género y Especie.....	38
11.3.7. Inmunológicos.....	40
12. Conservación de Aislamientos.....	41
12.1. Pruebas de sensibilidad a antibióticos.....	41
12.2. Identificación de genes Bex A y Bex B.....	44
12.2.1. Extracción de DNA Bacteriano (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit Invitrogen).....	44
12.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa para identificar genes Bex A y Bex B.....	47
12.3.1. Análisis Electroforético.....	48
13. RESULTADOS.....	49
13.1. SEROTIPIFICACION.....	51
13.2. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	52
13.3. IDENTIFICACIÓN DE GENES <i>bexA</i> y <i>bex B</i>	54
14. DISCUSION.....	56
15. Conclusiones.....	62
16. Anexos.....	63
17. Bibliografías.....	75

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura del polisacárido de <i>Haemophilus influenzae</i> (PRP).....	10
Figura 2. Fenómeno fisiopatológico de la infección por <i>Haemophilus influenzae</i>	14
Figura 3. Estructura y composición diferencial del polisacárido capsulado <i>Haemophilus influenzae</i> serotipos (a-f).....	21
Figura 4. El Locus <i>cap</i> en <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.....	23
Figura 5. Toma de exudado nasofaríngeo.....	34
Figura 6. Prueba de satelitismo, crecimiento de <i>Haemophilus influenzae</i> alrededor de la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Figura 7. Tira API, <i>Haemophilus influenzae</i>	39
Figura 8. Reacción en cadena de la polimerasa (Ciclos).....	48
Figura 9 Prueba de aglutinación (Phadebact) con antisuero b y polivalentes a,c,d,e y f en aislamientos de <i>Haemophilus influenzae</i>	52
Figura 10. Corrimiento Electroforetico del amplificado por PCR de los genes <i>bex A bex B</i>	54
Figura 11. Corrimiento de muestras biológicas, Hib, HiNT , control positivo, control negativo.....	55

Tablas

Tabla 1. Características de crecimiento de las diferentes especies de <i>Haemophilus</i>	6
Tabla 2. Polisacáridos capsulares de <i>Haemophilus influenzae</i>	9
Tabla 3. Reactivos para PCR.....	47
Tabla 4. Características demográficas de la población en estudio.....	50
Tabla 5. Características macroscópicas, microscópicas, bioquímicas y serológicas típicas de <i>Haemophilus influenzae</i>	51
Tabla 6. Resultados tira Api <i>Haemophilus influenzae</i>	72

Gráficos

Gráfica 1. Sensibilidad antimicrobiana de <i>Haemophilus influenzae</i>	53
---	----

Abreviaturas

Lista de abreviaturas

ATCC	AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION
BLANAR	β -LACTAMASAS NEGATIVAS AMPICILINA RESISTENTES
DMK	DIMETILMENAQUINONA
Hap	<i>HAEMOPHILUS</i> ADHERENCE AND PENETRATION PROTEIN
Hia	ADHESIN <i>HAEMOPHILUS</i>
Hib	<i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> TIPO b
HiNT	<i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> NO TIPIFICABLE
HsF	<i>HAEMOPHILUS</i> SURFACE FIBRIL
LCP	LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO
LOS	LIPOOLIGOSACÁRIDOS
LPS	LIPOPOLISACÁRIDOS
NAD	NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTIDO
PBS	TAMPÓN DE FOSFATO ALCALINO
PBPS	PROTEINA DE UNION A PENICILINA
PCR	REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA
PRP	POLIRRIBOSIL RIBITOL FOSFATO
SAP	SEROLOGÍA POR AGLUTINACIÓN EN PLACA
SSE	SOLUCIÓN SALINA ESTERIL

1. Introducción

1.1 Antecedentes Históricos

La especie prototipo *Haemophilus influenzae* (Peffer, 1892) es uno de los principales agentes causales de una amplia variedad de enfermedades en humanos, particularmente entre la población infantil. Sin embargo, es Robert Pfeiffer quien lo aísla por primera vez del esputo y tejido pulmonar de pacientes con neumonía y lo señala como causas de la epidemia ocurrida entre 1889-1892, además propuso una asociación causal entre ésta y el síndrome clínico conocido como influenza. El nombre de *Haemophilus* fue asignado por Winslow et al, en 1920, y no fue hasta 1933 que Smith y colaboradores establecieron que la influenza era causada por un virus y que *Haemophilus influenzae* se presentaba solamente como causante de infecciones secundarias (Wenger y Ward, 2004; CDC, 2006)

Taxonomía

De acuerdo a la novena edición del Manual de Bergey de bacteriología Sistemática (Garrity et al, 2005), la posición taxonómica de este microorganismo es:

Dominio	Bacteria
Filo XIV	Proteobacteria
Clase III	Gammaproteobacteria
Orden XIV	<i>Pasteurellales</i>
Familia	<i>Pasteurellaceae</i>
Género	<i>Haemophilus</i>
Especie	<i>influenzae</i>

El género *Haemophilus* es uno de los tres pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*. Comprende especies que infectan a humanos y varias especies que se hallan en cerdos, vacunos, caballos, conejos, aves de corral y ovinos (Kilian, 1986; Campos, 1999)

Las especies que están asociadas con infecciones humanas son: *Haemophilus influenzae* (incluyendo el biogrupo *aegyptius*), *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus ducreyi*, y *Haemophilus aphrophilus* y en mucha menor frecuencia *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus segnis*, *Haemophilus haemolyticus* y *Haemophilus paraphrophilus*. (Kilian, 1986; Campos, 1999), y otras cinco especies colonizadoras de animales que son: *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus paraganillarum*, *Haemophilus paracuniculus*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Haemophilus felis*.

Las especies de *Haemophilus* que afectan al humano están vinculadas en su mayor parte con infecciones del trato respiratorio superior, excepto *Haemophilus ducreyi* que es un patógeno del tracto genital (Allen, 1999).

1.2. Generalidades

El género *Haemophilus* comprende un grupo de bacilos o cocobacilos Gram negativos pequeños no esporulados (0.2 x 0.3 a 2 µm), no móviles, aerobios o anaerobios facultativos. Forma parte de la microbiota normal de vías respiratorias superiores el nombre del género proviene del griego “haemo” sangre y “philus” amor, amistad (que ama la sangre). Crecen a temperatura óptima de 35° a 37° C y una baja presión de CO₂ con requerimiento exigente para su crecimiento (MacFaddin, 2000).

Las cepas de *Haemophilus influenzae* pueden ser o no capsuladas. En las cepas capsuladas se pueden diferenciar seis serovares o serotipos diferentes (a-f), basándose en la estructura antigénica de los polisacáridos capsulares, demostrables por la reacción de Quellung, (reacción de hinchazón con antisuero específico para cada tipo). En general las colonias son muy pequeñas similares a gotas de rocío y tienen apariencia áspera o rugosa. Mientras que el tipo b de *Haemophilus influenzae* encapsulado por lo general produce colonias mucoides y brillantes. Después de 48 horas de incubación se desarrolla una umbilicación central a causa de la excreción de un polímero capsular. Las colonias mucoides se convierten espontáneamente en rugosas debido a la pérdida de la cápsula.

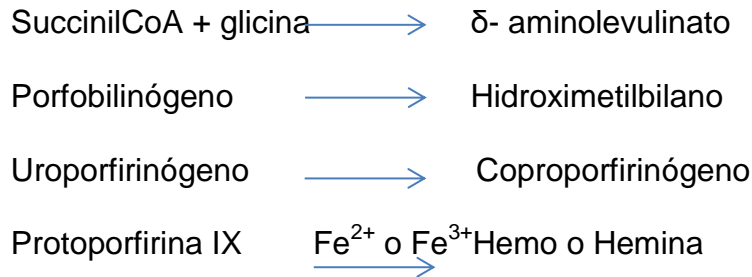
A pesar de que tanto las cepas capsuladas como no capsuladas (no serotificables) pueden causar infección, las serotipo b son las responsables de más del 90% de enfermedades severas en niños menores de seis años (Encarna S; et al.2000)

1.3. Fisiología

Todas las especies de *Haemophilus* requieren uno o los dos factores de crecimiento presentes en la sangre denominados X (hemina) y V (nicotinamida adenina dinucleótido NAD) (Cuadro 1).

El factor X termoestable es la protoporfirina IX, el precursor de la hemina que es el grupo prostético en los citocromos y enzimas del hemo como la catalasa y la peroxidasa. Las especies no dependientes de la hemina como *Haemophilus parainfluenzae* sintetiza la hemina por la vía común del tetrapirrol, pero los microorganismos dependientes de la hemina han perdido la capacidad de

convertir el ácido δ - aminolevulínico en protoporfirina. Al parecer las especies hemina-dependientes carecen de todas las enzimas para la síntesis del tetrapirrol con excepción de la ferroquelatasa o hemo-sintetasa, que está presente en forma variable y que cataliza la inserción final de Fe^{2+} o Fe^{3+} en el anillo de protoporfirinas como se muestra en el siguiente esquema (Winslow et al, 1920).



Haemophilus es un microorganismo anaerobio, utiliza nitrato como el aceptor de electrones. La única quinona producida por *Haemophilus influenzae* es la dimetilmenaquinona (DMK), pero también algunas especies producen ubiquinona. Mientras que la ubiquinona es utilizada en los sistemas de transportes de electrones que conducen solo aceptores de alta potencia, como el oxígeno o el nitrato, la DMK puede ser utilizada para el transporte de electrones tanto en aerobiosis como anaerobiosis. De esta manera, la expresión de DMK le permite a *Haemophilus influenzae* producir energía tanto por fosforilación al nivel de sustrato como por fosforilación oxidativa (Zinsser, 1996).

El agar chocolate es el medio más utilizado para el aislamiento de la especie de *Haemophilus influenzae* por los factores X (hemina), el cual suministra los compuesto necesarios para la síntesis de citocromos y también el factor V (nicotinamida adenina dinucleótido o NAD), que es una coenzima que participa en las reacciones de oxidoreducción del metabolismo celular en las células

sanguíneas y también inactiva las enzimas que degradan el factor V sin destruirlo (MacFaddin, 2000). Los medios de agar sangre comunes permiten la proliferación de *Haemophilus influenzae* sólo cuando la placa de agar se inocula de manera cruzada con *Staphylococcus aureus* (prueba de satelitismo) u otro microorganismo que secreta factor V. La proliferación en agar semisólido es evidente 18 a 24 horas después de la inoculación.

Tabla 1. Características de crecimiento de las diferentes especies de *Haemophilus*

Especies	Requerimiento de Factores		Crecimiento en CO ₂	Hemólisis	Ácido de la D-xilosa
	V	X			
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+	-	-	+
<i>Haemophilus aegyptius</i>	+	+	-	-	-
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	+	+	-	+/-	+/-
<i>Haemophilus ducreyi</i>	-	+	-	-	-
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	+	-	-	+	-
<i>Haemophilus parahemolyticus</i>	+	-	-	+	-
<i>Haemophilus paraphroph aemolyticus</i>	+	-	+	-	-
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	-	+	+	-	-
<i>Haemophilus paraphrophilus</i>	+	-	+	-	-
<i>Haemophilus segnis</i>	+	-	-	-	-

Adaptado de Killian : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1 Wilians y Wilkins, 1986 pág.564.

2. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA.

Polisacáridos capsulares:

Haemophilus influenzae contiene tres principales clases de antígenos de superficie: el polisacárido capsular, el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de membrana externa.

El LPS es un componente estructural de la membrana externa, los determinantes antigénicos de la superficie del LPS son los llamados somáticos o antígenos O, los cuales son los responsables de la actividad de endotoxina de las bacterias Gram negativas.

Los complejos glucolípidos de las moléculas de los LPS están compuestos por una porción lipídica llamada lípido A, esta se encuentra en la primera capa de la membrana externa. El lípido A está compuesto por un disacárido de glucosamina y parece ser el principal responsable de las manifestaciones de la actividad endotóxica en los pacientes que presentan sepsis (fiebre, choque, hemorragias). La endotoxina también puede provocar una coagulación intravascular diseminada, debido a la activación del complemento.

El principal determinante antigénico del *H. influenzae* encapsulado es justamente el polisacárido capsular (tabla 2). Este polisacárido confiere la especificidad de tipo del microorganismo y es la base para el agrupamiento de los microorganismos de esta especie en seis serotipos o serovares, denominadas de la a al f. Los antígenos capsulares producidos por los serotipos a, b, c y f son de tipo de ácido teicóico, mientras que los serotipos d y e son polisacáridos. El polímero capsular del serotipo b es el único que contiene los azúcares pentosa, ribosa y ribitol

fosfato, en lugar de las hexosas o hexosaminas que se encuentran en los otros serotipos. Casi todas las cepas asociadas con la enfermedad invasora pertenecen al serotipo b, cuyo principal antígeno es su fracción oligosacárida no tóxica. El lipooligosacárido (LOS) de *H. influenzae* tipo b, consiste en un solo lípido A y una estructura análoga a oligosacárido de la base química o core del lipopolisacárido (LPS) de las enterobacterias.(Figura 2)

El fundamento de la tipificación serológica de *H. influenzae* es una mezcla de la fracción de la bacteria de los cultivos que se han caracterizado bioquímicamente con una gota de antisuero b y polivalentes. En caso de que la mezcla aglutine para el antígeno presente en la bacteria, entonces se identifica el serotipo en dicha bacteria.

Dentro de los métodos para serotipificar se encuentran: a) reacción de Quellung, b) aglutinación en portaobjetos, c) aglutinación en látex, d) contra inmunoelectroforesis, e) agar antisuero, f) inmunofluorescencia y coaglutinación (Grasso et al, 1981).

La sustancia capsular tipo b es un polímero lineal compuesto de ribosa, ribitol (una azúcar de cinco carbonos) y fosfato o polirribosil-ribitol-fosfato (PRP), desempeña un papel importante en la patogenia de la enfermedad invasora causada por estos microorganismos (Figura 2).

Tabla 2. Polisacáridos capsulares de *Haemophilus influenzae*.

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

Adaptado de Zinsser, Microbiología Panamericana, Buenos Aires, 1996, pág 641.

Las infecciones sistemáticas por lo regular son provocadas por cepas encapsuladas, por lo que la susceptibilidad a dichas infecciones se correlaciona en gran parte con la ausencia de anticuerpos séricos contra la capsula del tipo b. La cápsula interfiere con el mecanismo de defensa obstaculizando la interacción entre la bacteria y la célula anfitrión. Los anticuerpos contra el polisacárido capsular del tipo b pueden ser generados por la infección provocada por las bacterias que poseen antígenos de superficie que reaccionan en forma cruzada.

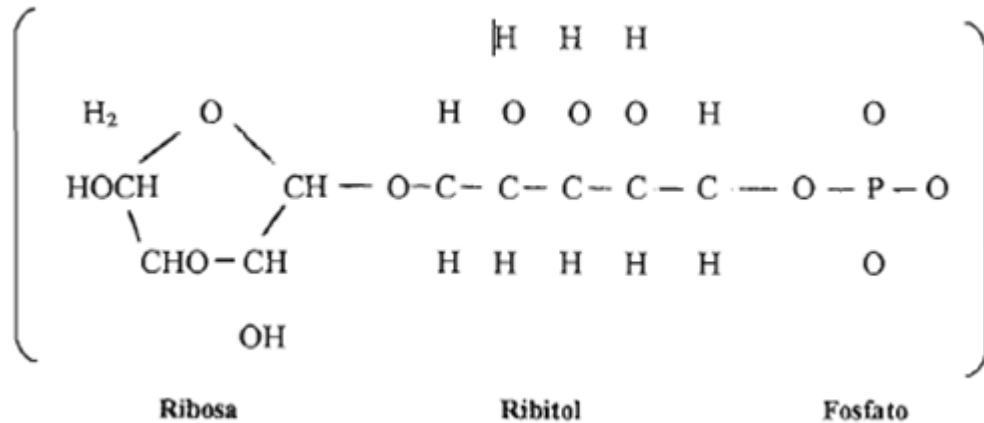


Figura 1. Estructura del polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae*. (PRP)

Adaptado de Koneman y cols. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas a color. Panamericana 1999, pag 13.

Es probable que en el género *Haemophilus* la virulencia sea multifactorial, entre los componentes que probablemente influyan en el proceso infeccioso se encuentran las proteínas de la membrana externa y el LOS. Cada una de estas moléculas de superficie pueden ser responsables de una función específica asociada con la virulencia, como por ejemplo la adherencia, la capacidad de invasión o la resistencia a la fagocitosis. (Koneman E; et al.1999)

2.1. Proteasa IgA1

La proteasa de IgA participa en la defensa de la mucosa, inactivando a las toxinas bacterianas e inhibiendo la adherencia microbiana (Killian et al, 1996). La proteína Hap (*Haemophilus* adherence and penetration protein) se encuentra en todas las cepas de *H. influenzae*, por lo que se sugiere, constituye el factor de adherencia principal durante la etapa de colonización de nasofaringe (Rodríguez et al, 2003).

En cepas de *H. influenzae* no tipificables (HiNT) se han identificado otras adhesinas que son proteínas de alto peso molecular, HMW-1 y HMW-2 y Hia (St Geme et al, 1998). Las proteínas HMW pudieran no ser exclusivas de *Haemophilus* no tipificable (HiNT) ya que se han encontrado genes homólogos de *hmw* en cepas capsuladas distintas del tipo b. Hia (Adhesin *Haemophilus influenzae*) es una proteína homóloga a la adhesina Hsf (*Haemophilus Surface fibril*) que se encuentran solo en *H. influenzae* tipo b (Hib) (Rodríguez et al, 2003)

Las cepas de *H. influenzae* no son consideradas como patógenos intracelulares, no obstante se ha demostrado que cepas de HiNT pueden invadir las células epiteliales además de tener acceso a la submucosa al penetrar la superficie epitelial en las uniones intracelulares (van Schilfgaarde et al, 1995).

2.2. Fimbrias

Las fimbrias son adhesinas bacterianas, las cuales, por su estructura fina y larga, abaten la repulsión electrostática y el enmascaramiento que provoca la cápsula. Generalmente las cepas aisladas de la nasofaringe tienen fimbrias, mientras que las cepas aisladas de la sangre o del líquido cefalorraquídeo (LCR) no son fimbriadas.

Se ha demostrado que las fimbrias median la adherencia a células epiteliales orofaríngeas, eritrocitos, células epiteliales bucales, células del epitelio respiratorio y levaduras; se distribuyen de manera homogénea sobre la superficie del microorganismo (Wilson et al, 1999; Finegeld, 1970; Falla et al, 1993).

También hallaron que en la adherencia por fimbrias influye la capsulación (Heelan et al, 1992) las adhesinas fimbriales y las no fimbriales de *H. influenzae* median el tropismo celular, pero difieren en especificidad. La adherencia mediada por

fimbrias ocurre en células del epitelio columnar pseudoestratificado y ciliado, pero no en células cubicas o escamosas y se relacionan con la habilidad de *H. influenzae* para colonizar o causar infección en los tejidos u órganos con esos tipos de células (Mendelman et al, 1984).

Una característica funcional aparentemente importante en el desarrollo de la enfermedad por *H. influenzae* es la variación de fimbria. Durante la infección natural, las cepas de origen nasofaríngeo son frecuentemente fimbriadas, mientras que su contraparte isogénica de sitios sistémicos no tiene fimbria (Mendelman et al, 1984).

La unión a células sanguíneas mediada por fimbrias puede incrementar la eliminación de la bacteria en la circulación sanguínea (Deulofeu et al, 1994).

3 Vías de transmisión

La infección por *H. influenzae* ocurre después de la inhalación de secreciones orales (estornudos). Se desconocen los factores que afectan la eficacia de la transmisión y la habilidad de la colonización, por lo general un periodo largo, con una colonización de mucosas respiratorias es la regla para la posterior enfermedad invasiva. Durante su colonización sintomática en la nasofaringe, *H. influenzae* se adapta a su microambiente, se multiplica e inhibe el movimiento mucociliar y evade los mecanismos de defensa del anfitrión.

Estudios morfológicos sobre cultivos de pólipos nasales y adenoides de origen humano infectados experimentalmente con *H. influenzae* han revelado que este microorganismo es atrapado por el moco. Este hecho previene que se elimine por el mecanismo de defensa, ya que el moco es una barrera de difusión para solutos y es impermeable a las células de defensa por el anfitrión. Los productos

bacterianos provocan la hiperplasia de glándulas productoras de moco y estimulan su producción, lo cual es una característica de las infecciones de pacientes con bronquitis crónica en donde los bronquios se ven comprometidos por la colonización de *H. influenzae*.

La diseminación de las bacterias de la nasofaringe al resto del aparato respiratorio ocurre con frecuencia. El crecimiento persistente de *H. influenzae* resulta en la colonización del epitelio de la nasofaringe, lo cual produce una reacción inflamatoria en el tejido (Figura 3). El portador asintomático puede desarrollar infección en el aparato respiratorio, que puede traducirse en daño al epitelio, permitiendo a la bacteria alcanzar la submucosa y finalmente el torrente sanguíneo.

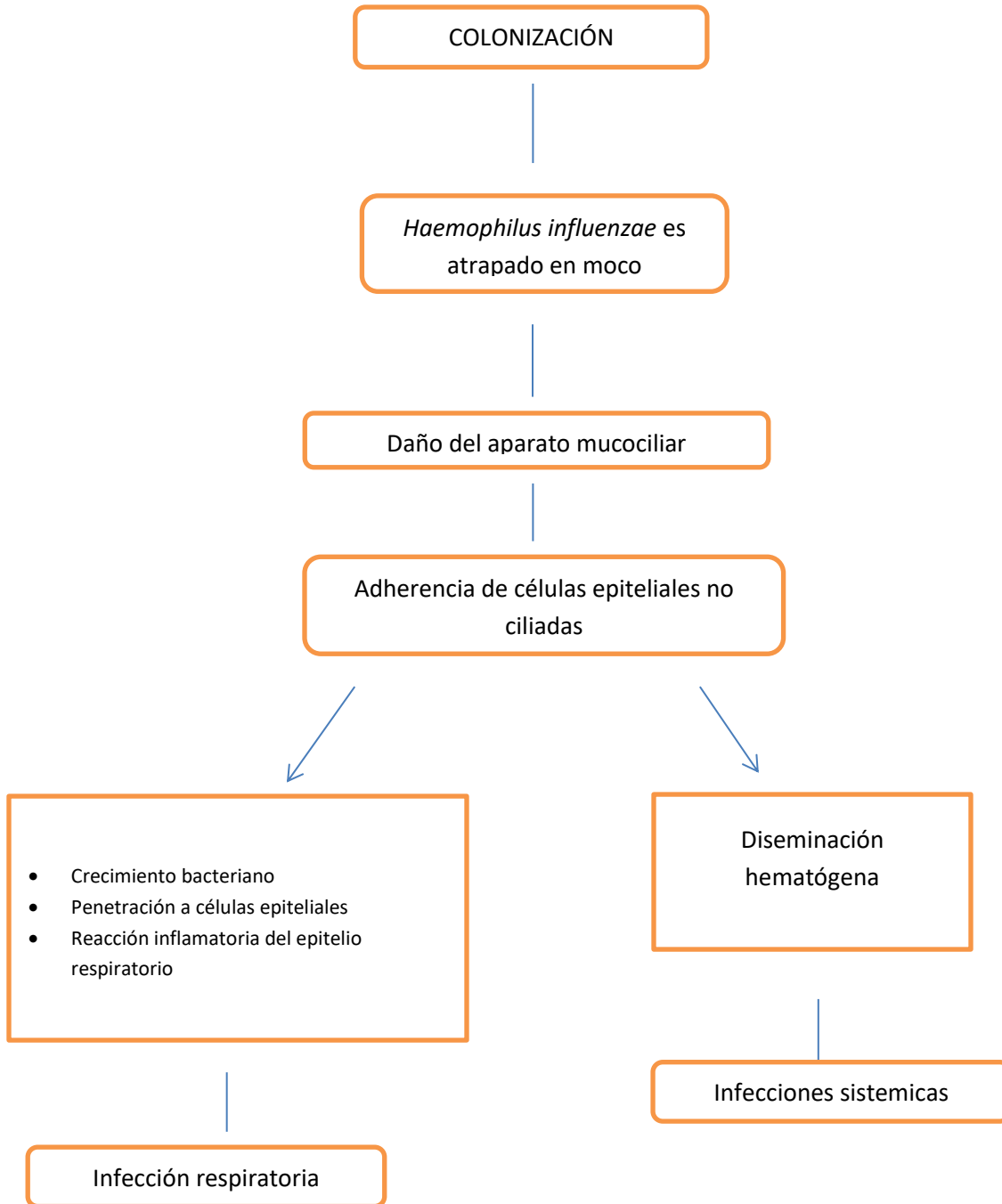


Figura 2. Fenómeno fisiopatológico de la infección de *H. influenzae*.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1998 Soja Elodia, Portillo Leopoldo

3.1. FACTORES DE PATOGENICIDAD

La multiplicación de las bacterias estimula al anfitrión a desarrollar una respuesta inflamatoria. Si esta respuesta es deficiente las bacterias continúan con la colonización, un gran número de neutrófilos llega al árbol bronquial, lo que conlleva a que la respuesta inflamatoria se vuelva crónica (Sosa et al, 1998). Durante esta reacción inflamatoria, el epitelio respiratorio y el endotelio vascular se vuelven permeables, permitiendo que así los factores como las inmunoglobulinas y el complemento entren en las vías respiratorias desde la circulación sanguínea, potenciando de esta forma a la respuesta inflamatoria.

Durante la fagocitosis de las bacterias por los neutrófilos, una cantidad pequeña de enzimas (proteasas, como la elastasa) sale del neutrófilo. En el pulmón normal existe una antiproteínasa (O-1- anti tripsina), que neutraliza las proteasas. Dichas enzimas libres pueden producir una lesión en el epitelio respiratorio. Por lo que, la infección de las vías respiratorias persiste y puede producirse una lesión del tejido respiratorio directamente por los productos bacterianos, y de forma indirecta por la inflamación crónica. Esta lesión causa un deterioro posterior en la defensa del anfitrión y puede producirse un círculo vicioso que induce una progresión grave de la enfermedad respiratoria (Wilson R, 1992).

La infección bacteriana lleva a un aumento de la producción del moco, una disminución del movimiento ciliar y a la lesión del epitelio respiratorio. En pacientes con infecciones frecuentes, los bronquios se engrosan y cicatrizan, por lo que reciben un aporte menor de irrigación y hay un contenido mayor de secreción purulenta con millones de bacterias. Con frecuencia *H. influenzae* producen enzimas β - lactamasas que se encuentran en el moco y neutralizan los

antibióticos β -lactámicos (ampicilina, amoxicilina). La producción de estas enzimas por una especie de bacteria puede proteger a otra especie implicada en la infección, a este fenómeno se le llama patogenicidad indirecta, debido a la transmisión del gen *bla* (β lactamasas).

H. influenzae es responsable de aproximadamente el 20 % de las bacteriemias que ocurren en los niños febriles sin ninguna evidencia de enfermedad local.

4. Manifestaciones clínicas

Entre las enfermedades que desarrolla *H. influenzae* se encuentran:

4.1. Meningitis

La mayoría de los casos de meningitis por *H. influenzae* se observa en lactantes y niños menores de seis años, y este microorganismo es el agente causal más frecuente de meningitis bacteriana en niños entre un mes y dos años de edad, con el pico de incidencia entre los 6 y los 12 años.

El 90% de los aislamientos obtenidos de casos de meningitis pertenecen al serotipo capsular b, la aparición de signos y síntomas meníngeos pueden ser graves.

Aunque son relativamente infrecuentes, las complicaciones de la meningitis por *H. influenzae* incluyen abscesos cerebrales, pericarditis y formación de abscesos en otras localizaciones como resultado de la diseminación hematógica.

La meningitis por *H.influenzae* en los adultos es por lo común el resultado de una diseminación directa del microorganismo, a partir de un foco de infección contiguo (Allen, 1999).

4.2. Epiglotitis

La epiglotitis es una enfermedad potencialmente mortal, que se encuentra con mayor frecuencia en los niños entre 2 y 6 años de edad y generalmente es causada por la bacteria *H. influenzae*.

Esta enfermedad produce un edema rápido de la epiglotis, lámina cartilaginosa ubicada en la parte posterior de la lengua que cierra el orificio de apertura de la tráquea, mediante el proceso de la deglución y que puede obstruir la respiración

4.3. Otitis media

El *Streptococcus pneumoniae* y el *H. influenzae* son los causantes más frecuentes de otitis media aguda. Esta infección se observa primordialmente en niños entre los 6 meses y 2 años de edad.

Existen ciertas evidencias de que las cepas no tipificables de *H. influenzae*, pueden ser agentes causales importantes de otitis media, tanto en adolescentes como en adultos.

Los pacientes con otitis media producida por *H. influenzae* suelen presentar dolor de oídos, con exudación del oído externo o sin ella. También puede haber fiebre y otros signos sistemáticos, particularmente en niños, donde hasta una cuarta parte de ellos con otitis media producida por microorganismos del tipo b pueden presentar concomitantemente bacteriemia, meningitis o ambas (Allen, 1999).

4.4. Sinusitis

Se refiere a la inflamación de los senos paranasales que ocurre con una infección a raíz de un virus, una bacteria o un hongo.

H. influenzae es considerado como principal agente etiológico de esta infección, ya que este microorganismo es responsable de 20 a 25 % de los casos de sinusitis aguda en los adultos y de 36 a 40 % en los niños (Allen, 1999)

4.5. Traqueo-bronquitis febril aguda

La bronquitis crónica es una entidad clínica mal definida, caracterizada por tos persistente, generalmente no productiva, sibilancias y respiración superficial.

Las exacerbaciones agudas de la enfermedad dan como resultado la producción de esputo purulento, y pueden conducir a un cuadro conocido actualmente como traqueo-bronquitis febril aguda.

El comienzo suele ser agudo, y se acompaña de fiebre alta, disnea y producción de esputo. Varias observaciones y algunos datos experimentales sugieren un papel etiológico de *H. influenzae* no tipificable en la patogenia de esta condición (Allen, 1999)

4.6. Neumonía

Es una enfermedad del sistema respiratorio que consiste en la inflamación de los espacios alveolares de los pulmones

La neumonía por *H. influenzae* puede ser otra manifestación de la infección sistemática por el microorganismo, o desarrollarse como prolongación y complicación de una infección primaria del tracto respiratorio, por ejemplo, bronquitis crónica o traqueo-bronquitis febril aguda.

Las cepas no tipificables de *H. influenzae* son causa importante de neumonía, con bacteriemia o sin ella, particularmente en pacientes pediátricos y ancianos. (Allen, 1999)

4.7. Bacteremia

La bacteriemia es una manifestación frecuente y precoz de la infección aguda por *H. influenzae*.

Algunos niños pueden presentar bacteriemia primaria sin meningitis pero se considera inusual.

La artritis séptica y la osteomielitis también pueden complicar la bacteriemia por *Haemophilus influenzae* (Koneman E; et al.1999)

4.8. Conjuntivitis

Las especies de *Haemophilus* también producen una forma aguda y contagiosa de conjuntivitis, denominada “ojo rojo”.

El rosado difuso de la esclerótica y la presencia de un exudado seroso o purulento, son virtualmente diagnósticos de la conjuntivitis por *Haemophilus*. (Koneman E; et al.1999)

4.9. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

En esta enfermedad bacterias como *H influenzae* no tipificable , *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*. Están involucradas en aproximadamente la mitad de las exacerbaciones agudas (Murphy y Kirkham, 2002)

Hay dos formas principales de EPOC:

- Bronquitis crónica, la cual implica una tos prolongada con moco
- Enfisema, el cual implica un daño a los pulmones con el tiempo

La mayoría de las personas con EPOC tienen una combinación de ambas afecciones.

5. Sistemas de caracterización para la identificación de *H influenzae*

En el contexto anterior surge la necesidad de identificar rápida y eficazmente las cepas capsuladas de *H. influenzae*, las cuales expresan uno de los seis polisacáridos capsulares antigénicamente distintos (Figura 4). La síntesis, la elaboración y el depósito en la superficie bacteriana del polisacárido capsular son factores importantes para la patogénesis de *Haemophilus influenzae* (Moxon y Kroll, 1988). Solo un pequeño porcentaje de cepas aisladas del tracto respiratorio de portadores posee polisacárido capsular, la mayoría son cepas no tipificables. La presencia de cápsula puede detectarse a la observación de colonias crecidas en gelosa de algún medio transparente por ser traslúcidas e iridiscentes.

A nivel bioquímico, la inmunotipificación y los estudios que se han empleado para distinguir la estructura capsular (Tang et al. 2001). En este sentido, en 1976, Killian descubrió un método que permite diferenciar cepas de *Haemophilus influenzae*, dada su capacidad de sintetizar las enzimas ornitina descarboxilasa, ureasa y triptofanasa, que permite identificar 8 biotipos: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII. Esta clasificación ha permitido establecer una correlación entre el biotipo y la patogénesis de microorganismo, como es el caso de *Haemophilus influenzae* b biotipo I, que se relaciona con meningitis; o cepas de *Haemophilus influenzae* (HiNT) del biotipo IV relacionadas con sepsis neonatal. Si bien existe una relación entre el tipo capsular y algunos de los biotipos (Fusté et al, 1996), algunos autores han referido discrepancias acerca de dicha relación (Sosa-Iglesias et al., 1998; Koneman et al., 1997)

Tradicionalmente, la determinación de serotipos capsulares de cepas de *H. influenzae* se realiza por aglutinación en placa, prueba que se basa en reacciones

antígeno- anticuerpo para la identificación serológica de cepas capsuladas y no capsuladas. Sin embargo, inconsistencias observadas en resultados obtenidos de diversos laboratorios han mostrado que esta técnica (SAP) ofrece errores en sus resultados (Shively et al., 1981; La Claire et al., 2003) de ahí la necesidad de contar con un método inequívoco para la tipificación capsular de *H. influenzae*.

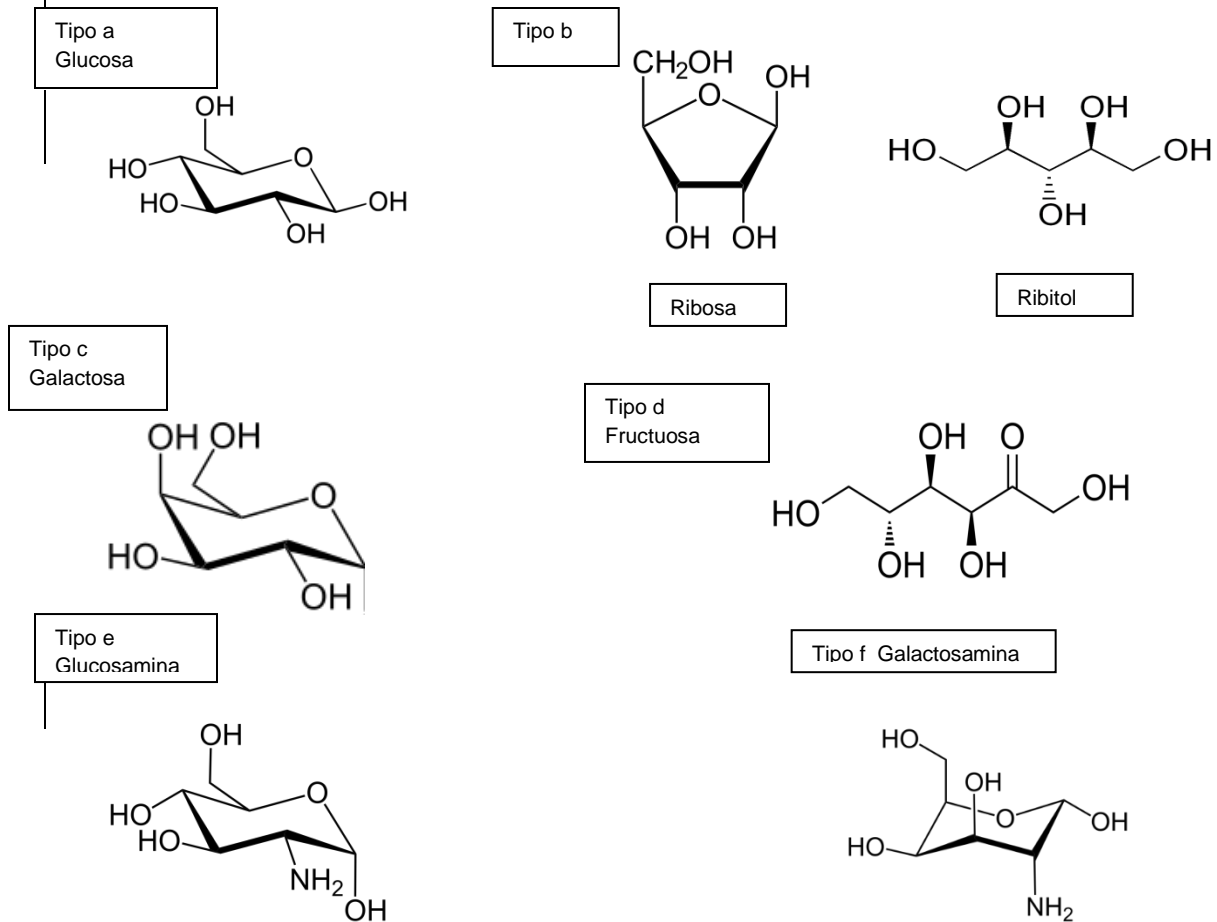


Figura 3. Tipos de azúcares en el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* (serotipos a-f).

Adaptado de Tang et al, 2001.

Como resultado de la elucidación de las bases genéticas para la expresión capsular de este microorganismo, Falla et al (1994), desarrollaron una técnica de tipificación capsular mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El sustento teórico de dicha técnica estriba en la presencia de locus *cap* ribosomal que contiene el grupo de genes necesarios para la síntesis y expresión de la cápsula en *H. influenzae*. El locus *cap* en los seis serotipos capsulares comparte una organización común que consta de tres regiones, denominada región ATP transportador; las regiones 1 y 3 son comunes para todos los tipos capsulares y la región 2 denominada serotipo específico, codifica especialmente para cada tipo de cápsula (tipo-específico a-f) (Kroll et al., 1989; Kroll et al., 1991; Falla et al. , 1994). La región uno comprende el grupo de 4 genes (*bex A*, *bex B*, *bex C*, *bex D*). El locus *bex A* codifica para una proteína involucrada en una exportación del material capsular del citoplasma hacia la superficie celular (Kroll y Moxon, 1988; Kroll et al. 1990). La región 3 donde se da la exportación de la capsula, por analogía con *Neisseria meningitidis*, comprende dos genes involucrados en la exportación de la cápsula a través de la pared celular (Figura 5) (Tang et al . , 2001)

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

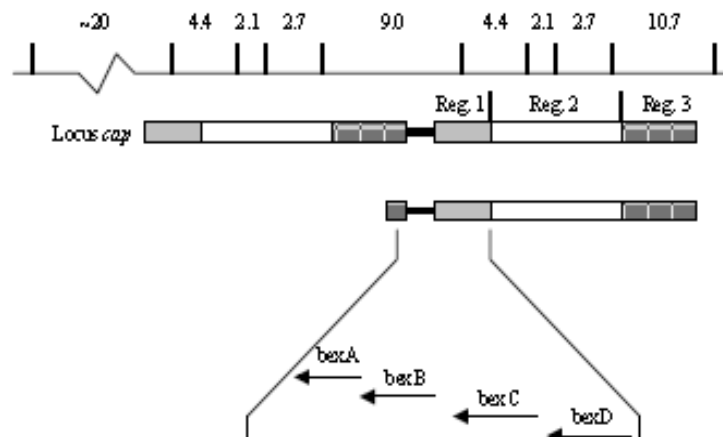


Figura 4. El locus *cap* en *H. influenzae* b. El locus *cap* cromosomal se muestra en la parte superior del diagrama. Las líneas verticales dividen al locus en fragmentos (tamaño en kb indicado encima). Las barras de bajo de la línea del cromosoma representan fragmentos de 18 kb repetidos en tandem. En la parte duplicada de la derecha se muestra el grupo de genes que comprenden *cap*: regiones 1, 2 y 3. La parte inferior del diagrama muestra en detalle los genes *bex A, B, C, D* representados por flechas. Adaptado de Kroll, 1992.

En particular, las cepas de *H. influenzae* b que se asocian más frecuentemente con infecciones sistémicas presentan en la región locus *cap* una secuencia duplicada de 18 kb, arreglo que resulta predictivamente inestable, y mutantes deficientes en cápsula se presentan con frecuencia de entre 0.1% y 0.5% (Hoiseth et al . , 1986). Mediante la secuenciación del locus *cap* se ha evidenciado que se trata de un elemento transposón en el cual, cada una de las copias del locus *cap* está flanqueada por el elemento de inserción *IS1016* (Kroll et al.,1991). Este arreglo facilita la amplificación de los genes capsulares por recombinación homóloga intragenómica con réplicas de hasta cinco copias. De esta forma la ganancia o pérdida de segmentos repetidos modula la cantidad de polisacáridos a sintetizar.

Interesantemente la reducción de dos o una sola copia resulta en un fenotipo deficiente de cápsula. Esto se debe a una deleción de aproximadamente 1.2 kb en el extremo de uno de los duplicados, ocasionando la pérdida de la mayor parte de IS1016 y casi todo el contenido del gen *bex A* (esencial para la exportación capsular). En el estado duplicado, por lo tanto, solo la copia funcional del gen *bex A* se pierde. Bajo estas circunstancias la capsula es sintetizada pero no exportada, generando mutantes de *H influenzae* tipo b deficientes de cápsula (Figura 5). Este evento puede favorecer la persistencia microbiana mediante la evasión de anticuerpos anti-capsulares del sistema inmune (Kroll y Moxon, 1988; Kroll et al., 1988; Corn et al., 1993; Tange et al., 2001).

Los genes capsulares de *H. influenzae* han sido exitosamente amplificados por PCR. Las secuencias de ADN para los iniciadores del gen *bex A* diseñadas por (Van Ketel et al., 1990), han sido usadas para distinguir entre cepas capsuladas y no capsuladas. Sin embargo, estos iniciadores no permiten distinguir entre tipos capsulares diferentes o entre mutantes de *H. influenzae* tipo b Hib y cepas no capsuladas. Para discriminar entre los seis tipos capsulares un segundo PCR fue implementado por la distinción entre secuencias de ADN tipo-específicas y cepas no tipificables.

Diferenciar cepas *H. influenzae* b y *H. influenzae* no tipificable puede ser un gran reto. La serología por aglutinación sérica en placa se ha utilizado para confirmar la presencia y la especificidad de la *Haemophilus influenzae* tipo b. Sin embargo, una cepa puede fallar al reaccionar con sueros y por lo tanto ser clasificados como "no tipificable" por varias razones.

En primer lugar, las imprecisiones en la realización e interpretación de pruebas de aglutinación. En segundo lugar, las cepas con una copia de la región de locus *cap* en la que se elimina parcialmente el gen *bex A*, se denominan como variantes de cápsula deficiente debido a que contienen una mayoría del locus *cap*; genéticamente, son locus *cap* positivo, pero muestran una capacidad alterada para producir cápsula funcional y dejar de aglutinar con el suero, es decir, no son serotipificables. En tercer lugar, una cepa previamente serotipificable podría tener una delección de todo el locus de la cápsula. Por último, una cepa puede carecer de todo el locus *cap* como consecuencia de los acontecimientos evolutivos, es decir, puede ser una delección de *Haemophilus influenzae* no tipificable (*HiNT*).

La detección de genes específicos de *bex A* y cápsula por PCR es el método más comúnmente usado para el genotipado de cápsulas. Los métodos de PCR basados solamente en la detección del *bex A*, no logran identificar las variantes deficientes en cápsulas porque el cebador 5'UTR (región no traducida) de la pareja de cebadores estándar hibrida en la región deletada del gen *bex A*.

La necesidad de un método simple y preciso para diferenciar cepas *H. influenzae* no tipificable verdaderas, de locus *cap* genéticamente locus positivo *H. influenzae* tipo *b*, se solucionó mediante un análisis de PCR para detectar regiones específicas de cápsula de tipo *a* y *f*, junto con el gen *bex A*, para cada cepa (Davis GS et al, 2011).

El gen *bex B*, que se encuentra dentro de la región I del locus *cap*, podría servir como un marcador más confiable que el gen *bex A*, ya que los genes de la región I están presentes en todos los tipos capsulares y no hay informes de delecciones

parciales del gen bex B análogas a las observadas en el gen bex A capsular por PCR.(Kroll y Moxon, 1988; Kroll et al., 1988; Corn et al., 1993; Tange et al., 2001). Recientemente se utilizó esta técnica en Estados Unidos para resolver las discrepancias entre los resultados obtenidos por aglutinación en placa. Se evidenció que solo el 30% de las cepas caracterizadas como *H. influenzae* b por aglutinación, poseían genes necesarios para la expresión de la cápsula lo que implica que se pueden tener resultados falsos positivos acerca de la prevalencia de *H. influenzae* b cuando se determina el serotipo por el método convencional (La Claire et al., 2003)

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

No obstante, en nuestro país no contamos con las estadísticas sobre incidencia, ni con vigilancia adecuada.

En países en desarrollo en los que se aplica la vacuna conjugada y en los que aún no se aplica, la información sobre infecciones por *H. influenzae*, y la prevalencia de portadores es escasa o nula y es obtenida de las bases de datos generadas por el sector salud de cada país, con base en caso de ingresos a hospitales por enfermedad invasiva atribuible a *H. influenzae* b (Dickinson et al, 2001; Ovalle et al,2006; Freitas y Merchan-Hamann, 2006)

Dada la importancia epidemiológica que tiene este microorganismo para la población infantil de México y aunado al hecho que la caracterización de cepas se

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

6. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana

El papel principal del personal de laboratorio de microbiología clínica es proporcionar información con la que el médico pueda diagnosticar y tratar las enfermedades infecciosas, las dos piezas importantes para esta información son; a) agente causal y b) el antimicrobiano que puede proporcionar la terapéutica adecuada. Una de las escuelas de mayor influencia en el área de evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana es la Americana, que cuenta con la norma editada anualmente por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), un elemento importante que establece que antibióticos deben ser evaluados y los rangos de interpretación para cada bacteria. Con ello se asegura un estudio completo y racional de la susceptibilidad al antibiótico. Sin embargo, debemos recordar que el reporte de la sensibilidad puede llevar al uso indiscriminado de estos (NCCLS. 2000)

Debido a la gran variabilidad de la sensibilidad a los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de las infecciones producidas por *H. influenzae*, es necesario el conocimiento exacto de su sensibilidad y la prevalencia de cepas resistentes en

los diferentes países y comunidades del país en donde se realice el estudio, para poder prescribir adecuadamente al paciente y evitar el surgimiento de cepas resistentes. En los años 60 las infecciones por *H. influenzae* eran tratadas empíricamente con ampicilina; sin embargo, a partir de 1970 en Europa y EUA se detectaron cepas resistentes a este antibiótico, mediada por la β - lactamasa. La mayoría de las cepas resistentes producen una β - lactamasa tipo TEM-1 y con menos frecuencia ROB- 1. Las β lactamasas en plásmidos son principalmente de los tipos TEM y SHV (Oguri et al, 2002).

El primer aislamiento documentado de bacterias resistentes a ampicilina fue en el año de 1972 en Europa y en EE.UU., en los años 1973 y 1974 en cepas de *H. influenzae* tipo b, Doern et al 1999, demostraron una prevalencia del 15.2 % de β - lactamasa en *H. influenzae* en una población de 1580 sujetos en estudio. La resistencia de la ampicilina no mediada por β -lactamasas, se detectó en solo 0.1% de las cepas.

En los últimos años, se ha encontrado resistencia a la ampicilina no mediada por β -lactamasas producidas por plásmidos en aislamientos capsulados, como en cepas no serotificables de *H. influenzae*.

La frecuencia de degradación enzimática de la ampicilina fue del 21 % para las cepas capsuladas de *H. influenzae* b y del 12% para cepas no capsuladas. Además de la producción de la β -lactamasa, se han aislado cepas de *H. influenzae* que son resistentes a la ampicilina pero no producen β - lactamasa, son cepas β - lactamasa negativas ampicilina resistente (BLNAR), los dos posibles mecanismos de resistencia de esta cepas son: a) la resistencia mediante la producción de β - lactamasa TEM-1 o ROB- 1 y b) por una alteración de las

proteínas de unión a penicilina (PBPs) relacionada a la síntesis de péptido glucano. Otras cepas que también se han aislado son las β - lactamasa positiva amoxicilina resistente (BLPACR) (Seki et al, 1999)

Posteriormente se demostró la aparición de cepas resistentes a cefalosporinas de primera y segunda generación, además de cloranfenicol, trimetoprim, eritromicina, tetraciclina y rifampicina (Doern et al, 1988). Las cepas resistentes a fluoroquinolonas (Ciprofloxacina, Levofloxacina, etc.) eran poco comunes; sin embargo en los últimos años se han observado con mayor frecuencia, sobre todo en aislamientos recobrados de pacientes con infecciones respiratorias crónicas, en los que el tratamiento incluye la administración repetida de quinolonas orales (Pérez-Vázquez et al, 2004)

7. Planteamiento del problema

¿Cuántos pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda presentan *H. influenzae* no tipificable en nasofaringe?

8. Objetivo general

Determinar el número de pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda con *H. influenzae* no tipificable, identificada por PCR de muestra nasofaríngea.

8.1 Objetivos específicos

- Identificar los serogrupos de *H. influenzae* presentes en nasofaringe de los pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda.
- Evaluar la correlación entre los resultados obtenidos mediante los métodos de serología por aglutinación en placa (SAP) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- Determinar la distribución de la expresión del gen **bex A** del locus **cap** para exportación y del gen **bex B** como marcador de la región I de locus **cap**.

9. Hipótesis

- Si la prevalencia de *H. influenzae* en pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda, presenta incremento en su serotipificación y biotipos, entonces habrá un aumento *H. influenzae* no tipificable.

10. Población estudiada

Se realizó un estudio transversal y descriptivo, en el periodo de abril 2015 a abril del 2016, en el que se incluyeron 34 pacientes pediátrico menores de 6 años de diferentes partes del Distrito Federal que asisten al Hospital General Dr Manuel Gea González por motivo de consulta, con síntomas de enfermedad en vías respiratorias altas, a todos los pacientes se les realizo exudado nasofaríngeo.

10.1. Criterios de Inclusión

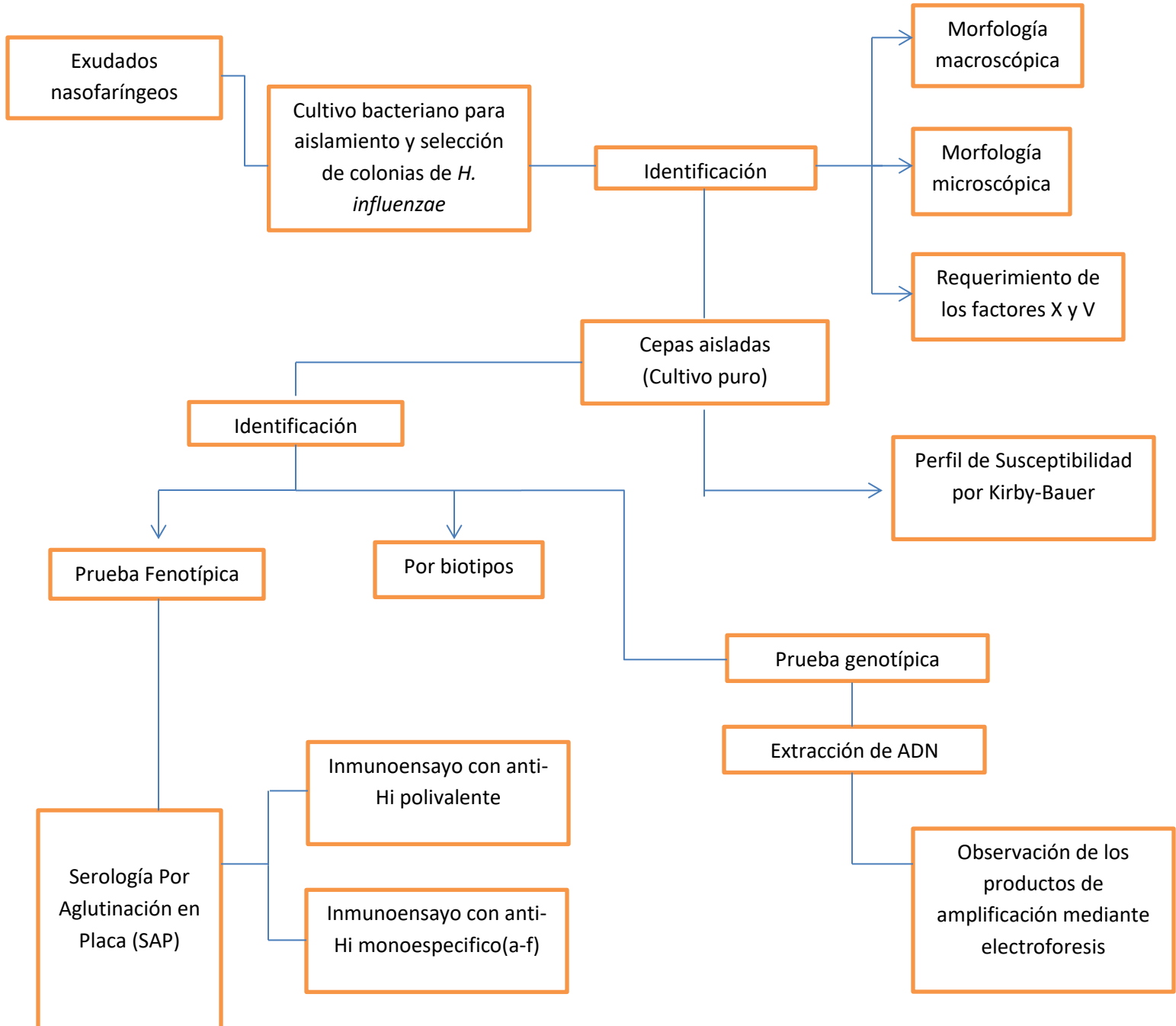
- Pacientes pediátricos de 0 a 5 años 11 meses.
- Pacientes con infección en vías respiratorias aguda diagnosticado en urgencias.

10.2. Criterios de Exclusión

- Pacientes que superen la edad requerida para el estudio
- Pacientes auto medicados
- Pacientes con tratamiento de antibióticos ya iniciado

11. MATERIAL Y MÉTODOS

11.1. Esquema general de trabajo.



11.2. Material biológico

Cepas de *H. influenzae* aisladas de nasofaringe de los pacientes pediátricos incluidos en el estudio.

11.2.1 Controles utilizados

Haemophilus influenzae tipo b ATCC 10211

Haemophilus influenzae ATCC 49247

Staphylococcus aureus ATCC 25923

11.2.2 Obtención y transporte de las muestras

Exudado nasofaríngeo.

Antes de tomar las muestras es indispensable llenar el formato de la historia clínica para la detección de *H. influenza* (Anexo-Cuestionario).

Una buena muestra para la detección de *H. influenzae* en vías respiratorias es el exudado nasofaríngeo en pacientes pediátricos, porque es una prueba de laboratorio que tiene la finalidad de identificar y aislar aquellos microorganismos que son causantes de infecciones en garganta.

Obtención de exudado nasofaríngeo: Recueste al paciente y eleve un poco su cabeza, introduzca suavemente el hisopo de alginato de calcio con mango flexible estéril, paralelo al paladar, casi en su totalidad hasta llegar a la nasofaringe aproximadamente 2 cm una vez ahí, rotar suavemente el hisopo para frotar la

pared de la nasofaringe y retírelo cuidadosamente sin dejar de rotar. (Garza, 2012).

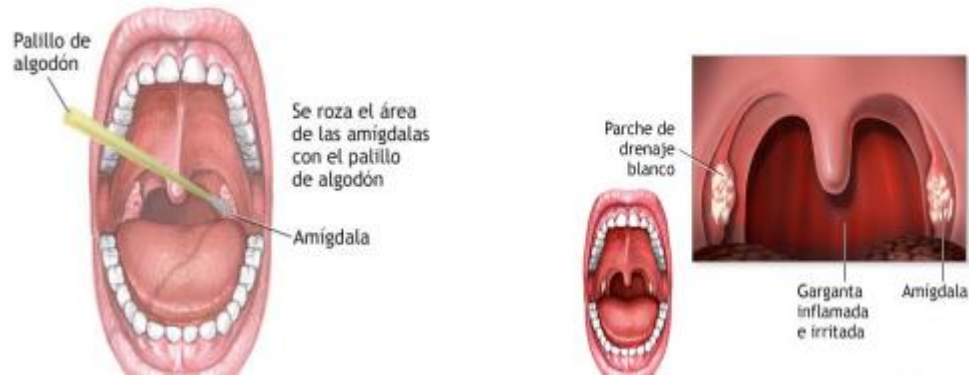


Figura 5. Toma de exudado nasofaríngeo, adaptado de <http://adam.com/>

11.2.3 Transporte de la muestra

Introduzca la punta del hisopo en el tubo de ensayo que contiene medio de transporte Stuart estéril, el resto se corta y se desecha; se cierra el tubo perfectamente.

Los tubos con las muestras deben mantenerse en refrigeración (o en la hielera con la bolsa refrigerante para ser transportadas), hasta su procesamiento en el laboratorio. Lo ideal es enviar inmediatamente al laboratorio de microbiología para ser procesado o bien mantener a 4°C por no más de 12 horas.

Se rotulan cada uno de los tubos con los nombres, apellidos de los pacientes y fecha de toma.

11.3 Métodos de Análisis de las muestras.

11.3.1 Fenotípicos (Koneman E W, Allen S D, Janda W.M, Schreckenberger P C, Win W Jr C, 1990)

Como se sabe las primeras clasificaciones bacterianas se refirieron como taxonomía numérica o taxonomía fenética, ya que fundamentalmente se basan en el empleo de 50 o 200 características bioquímicas, morfológicas, de cultivo, de susceptibilidad o resistencia a agentes antimicrobianos. Las cuales permitieron establecer el grado de similitud entre las bacterias. Actualmente estas identificaciones constituyen la manera tradicional o convencional con las cuales se busca e identifica a un agente etiológico, empero debe considerarse que para algunos microorganismos estos métodos no resultan ser la mejor opción.

11.3.2 Cultivo

Es un método de diagnóstico que se utiliza de primera elección, por su sensibilidad, especificidad, bajo costo se ha utilizado durante mucho tiempo, sin embargo para que sea eficaz hay que tener en cuenta que está influenciado por una adecuada toma y transporte de la muestra.

Las muestras se sembraron por estría cruzada en agar sangre de carnero al 5% y agar chocolate suplementado, y se incubaron a 37°C durante 24-48h en una atmósfera de 5% de CO₂.

11.3.3 Identificación macroscópica y microscópica

A las 24h, se analiza el desarrollo de cada placa de cultivo y se seleccionan las colonias sospechosas de *H.influenzae* y/o la presencia de otras bacterias de importancia clínica. A partir de los cultivos en agar chocolate se analizó la morfología característica de *H.influenzae*, con base en la literatura, y se procedió a realizar la tinción de Gram (Anexo preparación de Reactivos) para observar sus características microscópicas.

Morfología colonial

Macroscópicamente las colonias de *Haemophilus* deberán mostrar las siguientes características:

- Las colonias tienen forma redonda, irregular y convexa
- Color gris-blanquecino
- Presenta olor característico

Morfología microscópica

- De los diferentes aislamientos se realizó frotis de colonias características de *H. influenzae* , se realizó por tinción de Gram.
- Con la ayuda del microscopio, localizar cocobacilos Gram negativos, pequeños y agrupados.

11.3.4 Pruebas bioquímicas

Después de la identificación microscópica y macroscópica se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para complementar la identificación de la bacteria (*H. influenzae* no tipificable).

Prueba de Oxidasa: Negativa

Prueba de Catalasa: Negativa

11.3.5 Requerimientos de factores X y V (Satelitismo)

La técnica del estriado de estafilococos es utilizada como una prueba presuntiva para los microorganismos del género *Haemophilus*.

Procedimiento

- Se sembró simultáneamente una colonia sospechosa de *Haemophilus* en agar sangre y agar Muller Hinton (MH) en forma masiva.
- Se tomó una asada de colonia *S. aureus* inoculando sobre la placa de agar sangre, y MH. perpendicularmente a la estría anterior.
- Incubar en estufa bacteriológica a 37°C con una atmósfera de dióxido de carbono al 5% aproximadamente durante 18 a 24h.



Figura 6. Prueba de satelitismo, crecimiento de *H. influenzae* alrededor de la cepa de *S. aureus*.

Interpretación

- Positivo: Crecimiento de colonias pequeñas alrededor de la cepa de *S. aureus*.
- Negativo: Crecimiento de colonias en el medio sin ninguna concentración particular alrededor de la cepa de *S. aureus*.
- *Haemophilus ducreyi* no requiere el factor V, pero debido a su naturaleza exigente no crecen en agar sangre, ni alrededor de la cepa de *S. aureus*.
- *Haemophilus haemolyticus* y *Haemophilus parahaemolyticus* pueden crecer sin *S. aureus* y no demuestran el fenómeno de satelitismo aunque requieren el valor V. Ambos son hemolíticos y pueden liberar NAD al medio.

11.3.6 Identificación de Género y Especie

Las primeras clasificaciones bacterianas se refirieron fundamentalmente a la caracterización bioquímica, morfológica, de cultivo, de susceptibilidad o resistencia de agentes antimicrobianos las cuales permitieron establecer el grado de similitud entre las bacterias. Actualmente estas identificaciones constituyen la manera tradicional o convencional con las cuales se busca e identifica a un agente

etiológico, pero debe considerarse que para algunos microorganismos estos métodos no resultan ser la mejor opción. (Aguilera Arreola; 2007)

Actualmente existen comercialmente pruebas rápidas para identificación bacteriana, que incluyen un gran número de pruebas, apoyando y facilitando el diagnóstico clínico, permitiendo una mejor identificación, hasta género y especie, tal es el caso de las tiras API NH (Biomérieux^{MR}) las cuales fueron utilizadas en este proyecto para determinar su capacidad de utilización de fuentes de carbono.

Método:

Verificar que la posible cepa del género *Haemophilus*, se encuentren pura y bien desarrollada en agar chocolate y con las condiciones de incubación establecidas (no mayor a 24h). El ensayo se realiza según las especificaciones del proveedor.

Interpretación tira API Anexo D



FIGURA 7. Fotografía de los resultados de una tira API con *H. influenzae*

11.3.7 Inmunológicos

Estos se basan en la reacción antígeno-anticuerpo, mediante la detección del carbohidrato del antígeno capsular específico para identificar los diferentes serotipos de *H. influenzae*.

- Se empleó la técnica de serología por aglutinación en placa (SAP) con antisuero polivalente hacia los componentes capsulares a, b, c, d, e y f (Difco^{MR})
- En primera instancia se verifico el fenotipo capsular b mediante el método de co-aglutinación y en segunda instancia con los antisueros no polivalentes se verificaron los diferentes fenotipos capsulares y los no tipificables
- Se prepararon suspensiones de las bacterias en solución salina estéril (SSE) al 0.85%, aproximadamente al 0.5 del nefelómetro McFarland
- Se tomaron 15 µL de la suspensión bacteriana y se colocaron en los círculos de las laminillas proporcionadas por el fabricante de los sueros.
- Se colocaron 15 µL de la suspensión bacteriana y 10 µL de los antisueros tipo específico (a, b, c, d, e, f) se procedió a mezclar durante 30 segundos.
- La aglutinación de microorganismo en un determinado antisuero y la ausencia de aglutinación en el otro dará el resultado del serotipo correspondiente al microorganismo.
- En caso de que no se observara una aglutinación uniforme se le considera *H. influenzae* no tipificable (HiNT)

12. Conservación de Aislamientos

Todos los aislamientos identificados como *Haemophilus influenzae*, fueron conservados en leche descremada AL 10 % (Skim milk) y conservadas a -80°C, para posteriormente hacer el análisis genético.

Resembrado de muestras congeladas

- Raspar la cepa congelada con un palillo o asa estéril para sembrar en una caja de agar gelosa chocolate con polienriquecimiento utilizando la técnica de estría cruzada para obtener colonias aisladas
- Incubar las placas en una atmosfera de dióxido de carbono al 5%, a una temperatura de 37°C durante 24 horas, para realizar la extracción del DNA bacteriano.

12.1.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICO

Prueba de sensibilidad a antibióticos

1. Preparar una tinción de Gram antes de comenzar con la prueba de sensibilidad para confirmar la pureza del cultivo y la posible identificación de *H. influenzae*.
2. Utilizar varias colonias bien aisladas extraídas directamente de una placa de agar chocolate del día anterior (preferentemente de 20 – 24 h) como origen del inóculo.
3. Preparar una suspensión del organismo de prueba en caldo Mueller Hinton, caldo Müller Hinton o solución salina al 0,85%. Dicha suspensión debe

ajustarse a la turbidez del patrón 0,5 de McFarland mediante un dispositivo fotométrico. Esta suspensión contendrá $1 - 4 \times 10^8$ UFC/mL. Se debe tener cuidado al preparar esta suspensión, porque las concentraciones de inóculo más elevadas pueden causar resultados resistentes falsos con algunos antibióticos β -lactámicos, en especial cuando se analizan cepas productoras de β -lactamasa de *H. influenzae*,

4. Dentro de los 15 min de ajustar la turbidez del inóculo, sumergir el hisopo en el inóculo correctamente diluido y hacerla rodar firmemente varias veces contra la pared interna superior del tubo para exprimir el líquido en exceso.
5. Inocular toda la superficie del agar de una placa de Müller Hinton tres veces, girándola 60 grados cada vez para obtener una inoculación uniforme.
6. La tapa puede dejarse entreabierta entre 3 y 5 min y la placa puede mantenerse a temperatura ambiente, pero no más de 15 min, para permitir que se absorba la humedad de la superficie antes de aplicar los discos impregnados con antibiótico.
7. Aplicar los discos mediante un dispensador de discos antimicrobianos, empleando precauciones asépticas. No deben colocarse más de cuatro discos antimicrobianos en una sola placa de 100 mm, y no más de seis de los siguientes discos: cefalosporinas de tercera generación (por ejemplo, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ceftizoxima), aztreonam, imipenem o ciprofloxacina. Una vez colocados los discos sobre el agar, presionarlos con una aguja o pinza estéril hasta obtener un contacto completo con el medio.

8. A los 15 min después de aplicar los discos, invertir las placas e incubar durante 16 – 18 h a 35 °C en una atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono al 5%.
9. En una placa de BD Haemophilus Test Medium Agar, extender *H. influenzae* ATCC 10211 e incubar junto con las placas de prueba de sensibilidad para determinar si el medio favorece un crecimiento adecuado.

12.2.2 Identificación de genes *bex A* y *bex B*

12.2.2.1 Extracción de DNA Bacteriano (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit

Invitrogen).

Procedimiento

Los aislamientos de cultivos frescos de no más de 24 h, se usaron para extracción de DNA siguiendo el protocolo:

- Se prepara el termomixer a una temperatura de 55°C a 750 RPM.
- Se verifica que la colonia se encuentre totalmente pura para empezar el proceso de extracción de DNA
- Se toman todas las colonias del medio de cultivo, se suspenden en 180 µL de buffer de digestión (EDTA 1 mM pH 8, Tris- HCl 10 mM pH7.5, CTAB al 0.1%). Adicionar 20 µL de proteinasa K (suministrado en el kit) para lisar las células. Mezclar brevemente con ayuda del vórtex.
- Incubar el tubo en el termomixer previamente preparado a 55°C durante 45 min, vortexeando cada 15 min, para favorecer la lisis de la bacteria
- Adicionar 200 µL de buffer de lisis de unión y mezclar brevemente con el vortex hasta obtener una solución homogénea
- Adicionar 200 µL de etanol al lisado. Mezclar en el vortex durante 5 segundos hasta tener una solución homogénea

Desionización del DNA

- Transferir el lisado que se obtuvo a una columna colocada en un tubo colector de desechos
- Centrifugar la columna a 10000 x g por minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el tubo de recolección de desechos y suplir por uno nuevo.

Purificación del DNA

- Adicionar 500 μ L de buffer de lavado 1 a la columna el cual se preparó con etanol
- Centrifugar la columna a temperatura ambiente a 10000 x g por minuto
- Descartar el tubo de recolección de desechos, suplir por uno nuevo
- Adicionar 500 μ L de buffer de lavado 2 a la columna
- Centrifugar la columna a la máxima velocidad por tres minutos a temperatura ambiente, descartar tubo de colección de desechos

Elución del DNA

- Reemplazar el tubo de colección de desechos por un tubo de 1.5 ml estéril que nos servirá para recolectar el DNA
- Adicionar 40 μ L del buffer de elución a la columna
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar la columna con el tubo recolector a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente.

- Desechar la columna y conservar el tubo que contiene nuestro DNA purificado.

Almacenamiento del DNA

- Guardar el DNA a una temperatura de -40°C para su correcta conservación en un ultracongelador RevcoTM.

Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA se llevó a cabo mediante el espectrofotómetro (Nanodrop One^c Thermo ScientificTM).

- Se tomó una alícuota de $2\ \mu\text{L}$ del DNA y se analizó directamente en el espectrofotómetro, el cual nos proporcionó la concentración de DNA.

12.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa para identificar genes *bex A* y *bex B*.

Iniciadores empleados:

Invitrogen custom primers.

(bex AF, bex AR 343pb)

Secuencia (5' to 3') DNA TGT CCA TGT CTT CAA AAT GAT G

(bex BF, bex BR 567)

Secuencia (5' to 3') DNA GGT GAT TAA CGC GTT GCT TAT GCG

Mezcla de reacción de PCR para Identificar genes *bex A* y *bex B*

Tabla3. Reactivos para PCR

Reactivos	Volumen (por tubo (μ L))
Buffer 10X	2.5
Enhancer 10X	1
dNTPs 10 mM/ μ L	1
Mezcla de Primers 100 pM/ μ L	1
Taq polimerasa 5 U/ μ L	0.2
Agua bidestilada	16.3
DNA 20 ng/ μ L	2
Magnesio 25 mM	1

Condiciones para la reacción de PCR. Los tubos se colocaron en el termociclador (T100 Bio- Rad™) y se realizó con el programa siguiente:

Figura 8. Ciclos de la PCR para *Haemophilus influenzae*

	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización Inicial	94°C	2 min	} 30 ciclos
Desnaturalización	94 °C	30 s	
Alineación	54 °C	30 s	
Alargamiento	72 °C	45 s	
Alargamiento final	72 °C	5 min	

En el ensayo se incluyó DNA de las cepas controles:

Haemophilus influenzae tipo b ATCC 10211

Haemophilus influenzae ATCC 49247

12.3.1 Análisis Electroforético

El análisis se realizó en un gel de agarosa al 1.5% en tampón tris-acetato-EDTA (TAE) 1x , adicionado de bromuro de etidio 15 µL de una concentración de 10 mg/mL.

El corrimiento se realizó a 80 voltios durante una hora, posteriormente se observó a través del transiluminador, obteniéndose una banda de 343 pb para *bex A* y de 567 para *bex B*

13. RESULTADOS

Este proyecto se desarrolló en el Área de Pediatría y el Departamento de Investigación Microbiológico del Hospital Dr. Manuel Gea González.

Se incluyeron 34 muestras de nasofaringe de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. La tabla 1, muestra las características demográficas de la población en estudio.

La población estuvo conformada por 44% pacientes femeninas y 56% masculinos, se presentó un rango de edad entre 3 meses y 5 años con un promedio de 1 año de edad, más del 90% de la población presentó un esquema de vacunación completa, el 35 % presentaba al momento del estudio infecciones recurrentes y solo el 38 %, tenía convivencia con niños y adultos, así como el antecedente de asistencia a guardería.

Tabla 4.- Características demográficas de la población en estudio

Paciente	Edad	Sexo	Esquema de vacunación	Infecciones respiratorias recurrentes	Convivencia con niños y adultos 6≥60	Asiste a guardería
1	1 año	Masculino	3 dosis	Si	No	No
2	5 años	Masculino	Completo	No	No	No
3	2 años	Femenino	Completo	No	No	No
4	3 años	Masculino	Completo	No	No	No
5	2 años	Femenino	Completo	Si	Si	Si
6	1 años	Masculino	Completo	No	No	No
7	1 año	Masculino	Completo	No	Si	Si
8	5 años	Femenino	Completo	No	No	No
9	3 años	Masculino	Completo	No	No	No
10	1 año	Femenino	Completo	No	No	No
11	2 años	Masculino	Completo	No	No	No
12	5 años	Masculino	Completo	Si	Si	Si
13	4 años	Masculino	Completo	Si	No	No
14	2 años	Masculino	Completo	No	No	No
15	4 años	Femenino	Completo	No	Si	Si
16	1 año	Femenino	3 Dosis	Si	Si	Si
17	6 meses	Femenino	1 Dosis	No	No	No
18	4 años	Femenino	Completo	No	No	No
19	1 año	Masculino	Completo	Si	Si	Si
20	7 años	Masculino	Completo	No	No	No
21	6 años	Masculino	Completo	No	No	No
22	3 meses	Masculino	1 Dosis	No	No	No
23	4 años	Femenino	Completo	Si	Si	Si
24	5 años	Masculino	Completo	Si	Si	Si
25	1 año	Femenino	3 Dosis	Si	Si	Si
26	5 años	Femenino	Completo	No	No	No
27	9 meses	Femenino	3 Dosis	No	No	No
28	1 año	Masculino	3 Dosis	Si	Si	Si
29	3 años	Masculino	Completo	Si	Si	Si
30	2 años	Femenino	Completo	No	No	No
31	2 años	Femenino	Completo	Si	Si	Si
32	10 meses	Femenino	3 Dosis	Si	Si	Si
33	1 año	Masculino	Completo	No	No	No
34	1 año	Masculino	Completo	No	No	No

Con relación al análisis bacteriológico se realizaron 34 cultivos nasofaríngeos, de los cuales en el 41% (14/34) se identificó al menos una especie bacteriana patógena y en el 59% (20/34), se identificó solo la presencia de microbiota normal.

En 14 de las muestras analizadas se identificó *H. influenzae*, con base en las características que se presentan en la tabla 2.

PRUEBA REALIZADA	RESULTADO
Morfología colonial	Colonias grisáceas, planas de 1-2 mm de diámetro.
Morfología microscópica	Cocobacilos Gram negativos , pleomórficos
Catalasa	Negativa
Oxidasa	Negativa
Indol	Positivo
Descarboxilasa de Ornitina	Positivo
Ureasa	Positivo
Satelitismo	Positivo
Requerimiento de factor X	Positivo
Requerimiento de factor V	Positivo
Serología	Negativa
Api (figuraXXX)	Positivo para <i>H. influenzae</i>

Tabla 5.- Características macroscópicas, microscópicas, bioquímicas y serológicas típicas de *H. Influenzae*.

13.1 SEROTIPIFICACION

Mediante el método de co-aglutinación (Phadebact^R), se demostró que los 14 aislamientos identificados como *H. Influenzae*, 21% (3/14) fueron serotipo capsulado no b, a las que se realizó la prueba de PCR para autentificar el dato y 79% (11/14) no capsuladas clasificados como no tipificables. (Figura 10).

Con la finalidad de corroborar el serotipo de aquellos aislamientos identificados como *H. influenzae* capsulados no b, se realizó la prueba con antisueros monoespecificos a,b,c,d,e,y f (Difco™), la cual nos dio como resultado *H. influenzae* d.

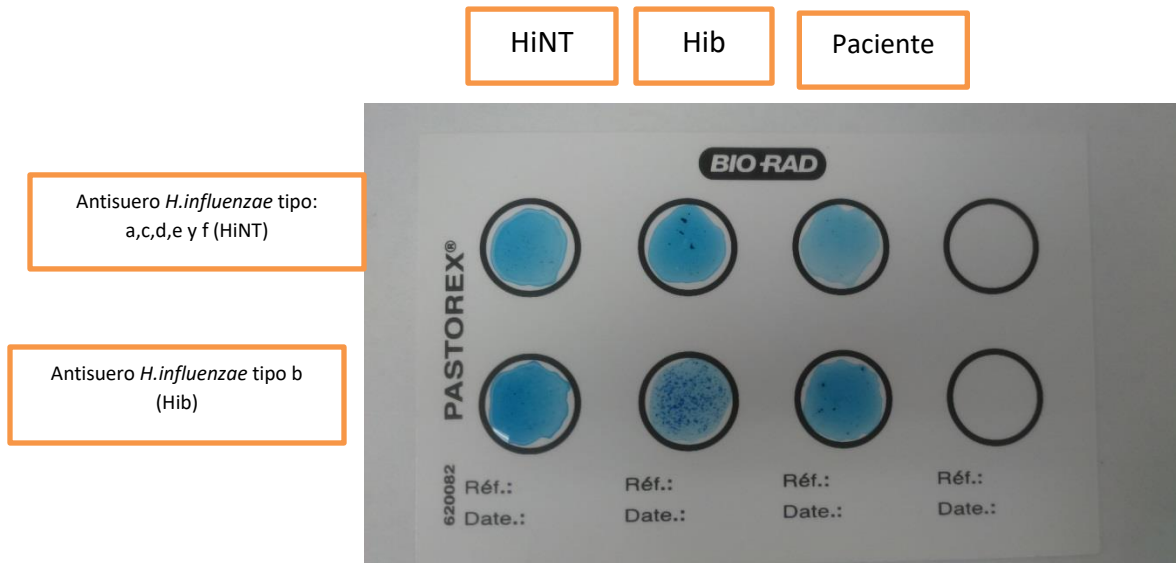
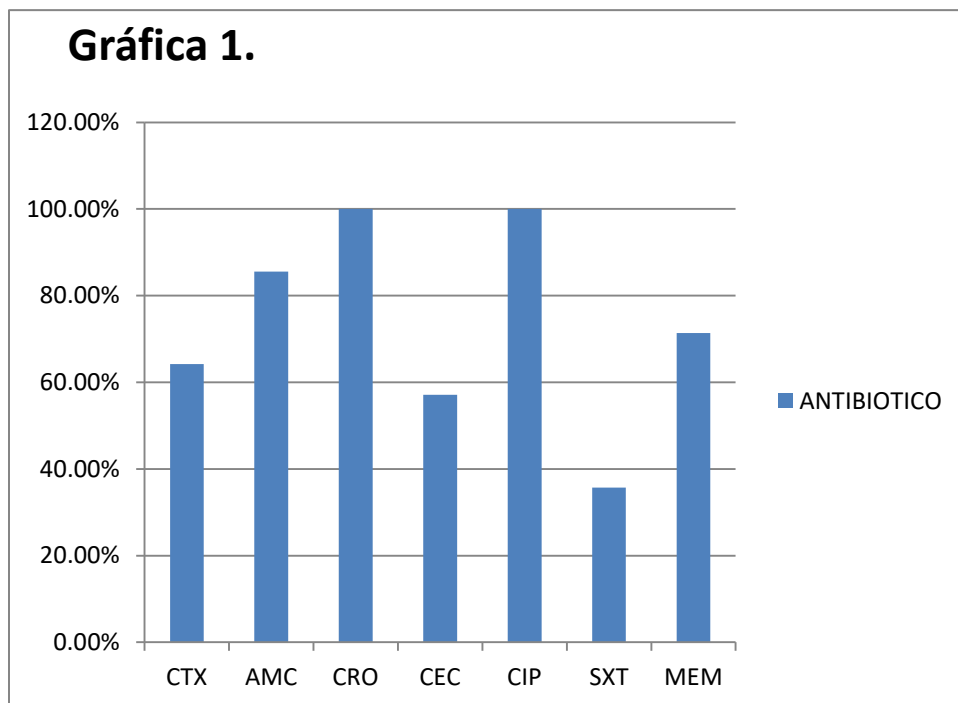


Figura 9: Prueba de coaglutinacion (Phadebact^R), con antisuero b y polivantes a,c,d,e y f, en aislamientos de *H. influenzae*

13.2. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se determinó la susceptibilidad a 8 antibióticos de uso común en el tratamiento de infecciones respiratorias como: Amoxicilina (AMX), Amoxicilina clavulanato (AMC), Ciprofloxacino (CIP), Cefotaxime (CTX), Ceftriaxona (CRO), Cefaclor (CEC), Trimetoprima con sulfametoxazol (SXT), Meropenem (MEM), en los aislamientos de *H. influenzae* identificados como no tipificables (11/14).

La gráfica 1 muestra los datos de sensibilidad de los 11 aislamientos de HiNT, los cuales presentaron 100% de sensibilidad a ceftriaxona y ciprofloxacino, a diferencia del trimetoprima con sulfametoxazol 38%.



Gráfica 1.- Porcentaje de sensibilidad antimicrobiana de *H. influenzae* no tipificable, a ocho antibióticos. Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), ciprofloxacino (CIP), Cefotaxime (CTX), Ceftriaxona (CRO), Cefaclor (CEC), Trimetoprima con sulfametoxazol (SXT), Meropenem (MEM)

13.3. IDENTIFICACIÓN DE GENES *bexA* y *bex B*

Una vez identificadas las cepas de *H. influenzae* no tipificables, se procedió a comprobar mediante PCR la presencia de genes *bexA* y *bexB*. En la figura 11, se muestran amplificadores de las cepas control ATCC de *H. influenzae*, siguiendo el protocolo establecido por Davis, et al en 2011.

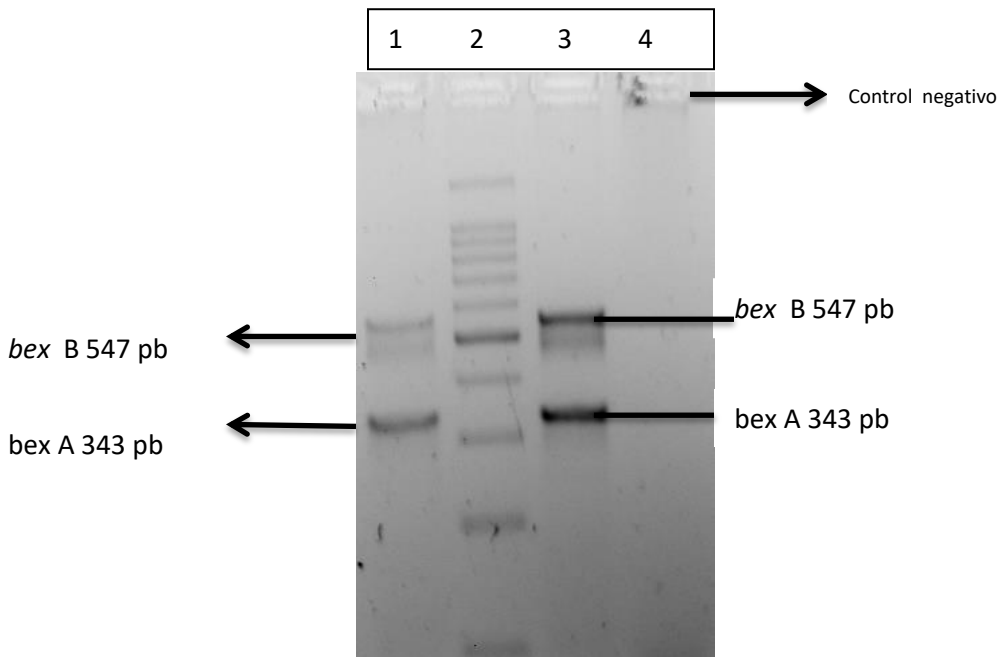


Figura 10.- Corrimiento electroforético del amplificado por PCR de los genes *bex A* y *bex B* en gel de agarosa 1.5%, Carril 1 y 3 control *bex A* y *bex B* de *H. influenzae* ATCC 49247, carril 2 Marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb, Control negativo H₂O carril 4.

El análisis de los productos de PCR, se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1.5%, en el cuál se colocó en cada pozo 1 µl de amortiguador de carga y 5 µl de ADN amplificado, además del marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb. Se aplicó una corriente de 80 V como se ve en la **figura 12** durante 60- 70 minutos aproximadamente, posteriormente se analizaron en un transluminador de luz UV, para observar las bandas fluorescentes

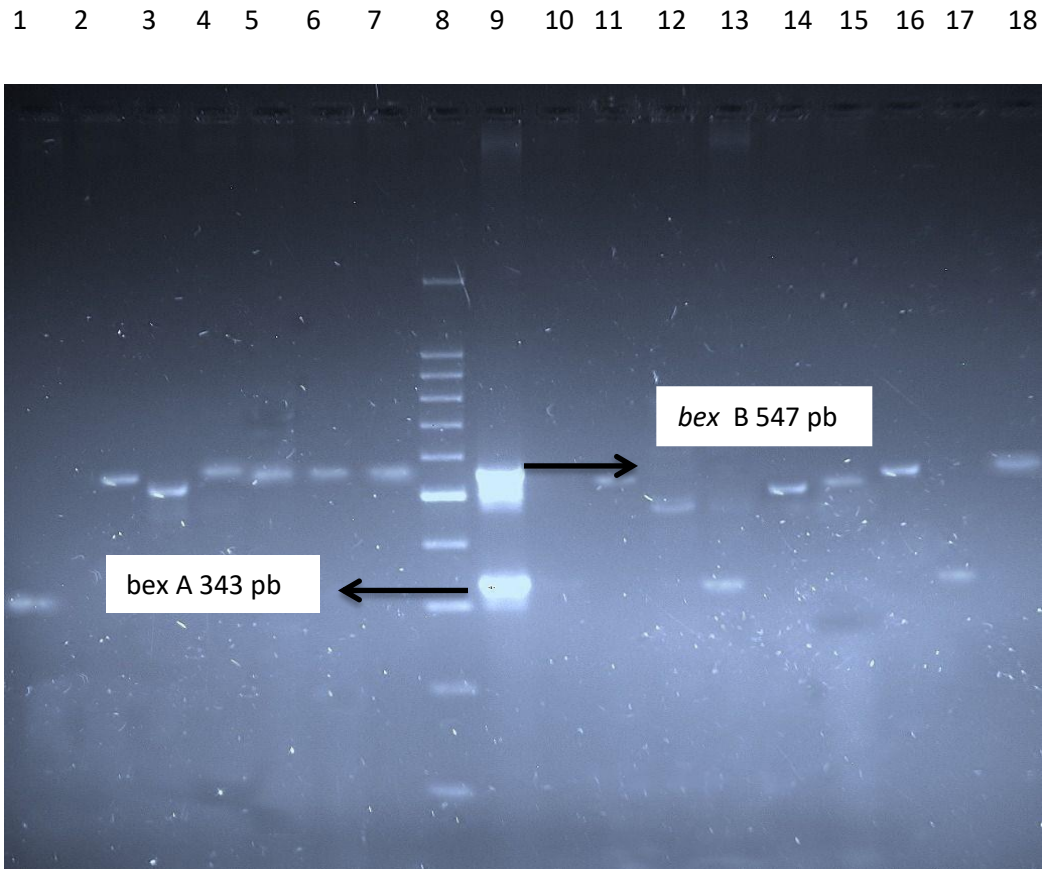


Figura 11.- Electroforesis de los cuantificados de PCR del gen *bex A*, *bex B*. Carril 2 al 7,14,15,16,18 corresponde a HiNT, carril 8 Marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb, carril 9 control *bex B*, *bex A*, carril del 10 control negativo, carril 11 Control HiNT, Carril 1,13,17 *H.influenzae* tipificable . Gel de agarosa 1.5%

14. DISCUSION

En la era pre- vacunal la mayoría de las cepas de *H. influenzae* causantes de infección invasiva fueron más bien del tipo b, mientras que las cepas *H. influenzae* no tipificables y capsuladas no b fueron menos frecuentes (Peltola, 2000). Después de la introducción de la vacunación por conjugados anti-Hib, la incidencia por cepas b disminuyó substancialmente (Wenger y Ward 2004).

En este estudio, se muestran resultados de tipificación a nivel serológico y molecular de cepas de *H. influenzae* aisladas de niños Mexicanos atendidos en el Hospital General Gea Gonzalez, tanto de emergencia como de consulta externa, ya que se contó con los recursos necesarios para su análisis.

En trabajos anteriores se ha informado sobre las diferencias de resultados sobre la tipificación de *H. influenzae*, obtenidos mediante métodos de serología por aglutinación en placa (SAP) y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Falla et al., 1994; La Claire et al ., 2003.)

El uso de *bex B* nos dio como resultado la identificación específica de 11 muestra de *H. influenzae* no tipificable los cuales se complementaron con la prueba de aglutinación

En el presente trabajo se encontró una discrepancia del 21% entre ambas pruebas ya que 3 de las cepas identificadas como *H. influenzae* tipo no b mediante SAP resultaron ser *Haemophilus* no tipificable por medio de PCR tipo-específico; En congruencia con este hallazgo, se han publicado datos sobre este tipo de falla en

los antisueros polivalentes (Bokermann et al., 2003; Hidalgo et al., 2003), en donde ellos evaluaron 258 aislamientos, recolectados por el sistema de vigilancia epidemiológica en Brasil de individuos con enfermedades invasivas, mediante dos métodos de aglutinación de deslizamiento: Método 1, mediante el cual las cepas se cribaron inicialmente con un antisuero específico de serotipo b, y el método 2, mediante el cual se ensayaron las cepas contra todos los antisueros específicos de serotipo en paralelo. Los investigadores que compararon los resultados de los dos métodos, con los obtenidos por PCR específica para el tipo de cápsula fueron cegados al método utilizado. Las tasas de prevalencia de serotipos encontradas por los tres métodos fueron significativamente diferentes, involucrando discrepancias principalmente entre aislamientos de serotipo de no encapsulados. El uso del antisuero polivalente como reactivo de selección para aislamientos invasivos y colonizadores mostró un poder discriminatorio pobre, con una sensibilidad del 65.8% y una especificidad del 91.7%.

En un sentido opuesto, 9 cepas identificadas como no tipificables mediante SAP, resultaron tener cápsula de los tipos a, e y f detectadas por PCR tipo-específico; este resultado confirma el hallazgo de Ishiwada et al. (2004) en el que se evidencia esta situación en solo una de las cepas de su estudio. Estas discrepancias podrían no ser resultado de mecanismos de regulación en la expresión genética, si no que pudiera deberse a aglutinaciones inespecíficas que dan lugar a falsos positivos, y/o una baja discriminación al emplear antisuero polivalente resultando en falsos negativos, por ello confirmar o descartar estos

resultados se realizan otras pruebas más específicas como (PCR o pruebas bioquímicas)

La amplificación del gen *bex B* distingue de forma rápida y confiable las cepas verdaderas de *H. influenzae* no tipificable (es decir, aquellas que carecen de locus de la cápsula) de aquellas que contienen un *locus cap* completa o parcial.

Es importante continuar con los programas de vigilancia de *H.influenzae* para evaluar los organismos asociados con la baja efectividad de la vacuna de *H. influenzae* tipo b y seguir los cambios en los patrones de la enfermedad, para ello resulta esencial tener la capacidad de clasificar las cepas con precisión incorporando la tipificación molecular usando el gen *bex B* que puede simplificar y mejorar la capacidad de detección *H. influenzae*. Por lo tanto, *bex B* utilizado como un marcador independiente para el *locus cap* proporciona una valiosa adición al método de caracterización molecular dirigidos a diferenciar cepas genéticamente tipificables (con cápsula o remanentes de la misma) de no tipificables (no cápsuladas).

La diferencia entre resultados obtenidos por los dos métodos sugiere que la identificación realizada en instituciones hospitalarias en México y en el mundo empleando serología por aglutinación en placa, es potencialmente equívoca. En la presente investigación se observaron inconsistencias en la determinación de serotipos evaluada por método tradicional. Estudios potenciales del sector salud sobre vigilancia a partir de la vacunación deberían tomar en cuenta datos como estos, para no informar resultados sesgados y sobreestimaciones para Hib.

El bajo poder discriminante del antisuero polivalente evidenciado aquí y mencionado por otros autores (Bokermann et al., 2003; Ishiwada et al., 2004) da lugar a falsos negativos entre cepas de *H.influenzae* no tipificables, que en realidad son positivas por cápsula tipo- específico, lo anterior obliga a sugerir la complementación de la prueba polivalente en conjunto con pruebas de biología molecular (PCR) como una búsqueda o selección previa al empleo de sueros monovalentes.

La detección equívoca de cepas positivas para cápsula a,b,c,d,e y f mediante serología con antisuero polivalente, confirmadas como no capsuladas por PCR, es indicativa de conclusiones erróneas. Esta situación adquiriría mayor relevancia si se tratase de identificar individuos con fallas a la vacunación contra Hib, debido a que la vacuna ya no presente eficacia por cambios en la estructura celular de la bacteria la cual estuviera provocando la resistencia.

En México deben establecerse programas de vigilancia basados en estudios longitudinales que determinen la presencia de casos debidos a *H. influenzae* b; además de detectar cualquier alteración en el incremento de infecciones causadas por otros tipos y cepas no tipificables en la población infantil. Es necesario informar con veracidad los resultados en el sector salud, utilizando no solo el método tradicional por serología por aglutinación en placa SAP, si no también técnicas moleculares más sensibles y específicas como las que aquí se propone (PCR) como un indicador verdadero de cepas de *H. influenzae*. Aunque la introducción de esta técnica sería difícil en términos económicos y de capacitación de personal en laboratorios de las instituciones hospitalarias.

La incidencia de *H. influenzae* presenta una marcada relación con la edad, hecho que juega un papel importante, debido a que el hallazgo encontrado en el presente trabajo confirma la presencia de *H. influenzae* no tipificable en niños menores de 6 años.

Nosotros encontramos que la resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol fue de 62% esto podría deberse al uso indiscriminado de los antibióticos, y una sensibilidad del 100% a ceftriaxona y ciprofloxacino.

La resistencia bacteriana entre aislamientos de *H. influenzae* es un problema de incremento constante, de grandes implicaciones clínicas y es un tema de importancia en, salud pública, pues obliga al desarrollo y utilización de nuevos agentes antimicrobianos, siempre más costosos y muchas veces más tóxicos que los empleados habitualmente en el tratamiento de infecciones. La frecuencia de aparición de resistencia a los antimicrobianos es grande y tan rápida que aparentemente está ganando a la velocidad con que se obtienen nuevos antimicrobianos. Por otro lado, la resistencia no ocurre para un solo antimicrobiano si no que en la mayor parte de los casos tiene un carácter múltiple, por lo que en un futuro muy cercano, la mayor parte de las infecciones podrían ser causadas por microorganismos con múltiple resistencia (Villaseñor et al,1993). Por ello, el conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana debe orientar a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces y establecer un programa de uso racional de antibióticos. Desde 1993 se ha reportado en América Latina la resistencia a la ampicilina y al trimetoprima/sulfametoxazol (Hortal et al, 2001; Sgambatti et al, 2001). En un estudio realizado por Jorgensen (1992) se reporta

que la resistencia de *H. influenzae* al trimetroprima/sulfametoxazol puede detectarse en menos del 1% de la cepas y es debido a un exceso de producción de dihidrofolato reductasa. En el presente trabajo la resistencia obtenida al Trimetroprim/sulfametoxazol fue más alta que la reportada por Jorgensen (1992), lo cual nos alerta sobre el uso indiscriminado de los antibióticos en este caso para infecciones de vías respiratorias, esta situación lleva a usar diferentes antibióticos a los que antes eran de primera elección.

15. Conclusiones

- Se observa mayor incidencia de enfermedades respiratorias causadas por *Haemophilus influenzae* no tipificable con un total de 11 pacientes de los 34 en estudio..
- La utilización de *bex B* como marcador independiente del locus **cap** es de gran importancia para la caracterización molecular para diferenciar cepas tipificables de no tipificables.
- La detección de serotipos SAP evidenció cepas capsuladas d y e, en mayor número no tipificables,
- La técnica de genotipificación capsular provee una prueba inequívoca para la determinación de tipos capsulares de cepas de *H.influenzae*, dada su mayor sensibilidad y especificidad que la prueba antigénica, estas pruebas deberían estandarizarse en todos los laboratorios del sector salud a nivel nacional.
- Las cepas capsuladas b y las HiNT se asociaron mayoritariamente con enfermedad respiratorias, respectivamente

16. Anexo A

Material y Equipo de laboratorio

Material de laboratorio:

- Hisopos de alginato de calcio (calgiswab type 4^{MR})
- Cajas Petri de plástico, nuevas, estériles (Becton-Dickinson)
- Gradillas para tubos Eppendorf (Induslab)
- Guantes de nitrilo (Protec)
- Cubre bocas (Protec)
- Tubos eppendorf 1.5 μ L y 2.5 μ L nuevos y estériles. (Axygen)
- Porta objetos (Madesa)
- Cubre objetos (Madesa)

Equipo de laboratorio:

- Termociclador T100 (Bio- Rad)
- Mixing Block (Bioer)
- Micropipetas 0.5 μ L a 10 μ L, 20 a 200 μ L, 100 μ L a 1000 μ L (Bioht proline)
- Incubadora (Forma Scientific)
- Balanza (Ohaus)
- Campana seguridad biológica clase 2 (The Baker Company)
- Cámara de electroforesis (Laboratorios Continental)
- Fuente de poder para cámara de electroforesis (Laboratorios Continental)
- Transluminador (Gel logic Carestream)

- Vortex (Corning)
- Centrifuga (Corning)
- Microscopio (Olympus BMX40)
- Refrigerador 4°C (American)
- Congelador -40°C (GS Laboratory)
- Microscopio contraste de fases Olympus

Reactivos y Medios de Cultivo:

- Medio de transporte Stuart (Bioxon, Becton-Dickinson)
- Tubos de ensaye (Pyrex)
- Buffer fosfato salino PBS
- Medio agar sangre (Bioxon, Becton-Dickinson) con sangre de carnero al 5%.
- Medio de cultivo agar chocolate suplementado con factores XV (Bioxon, Becton-Dickinson)
- Medio de cultivo para sensibilidad de antibióticos (Mueller-Hinton, Hematina, Extracto de levadura, NAD)
- Leche descremada Skim Milk (BBL)
- Bioquímicas API NH (Biomerieux)
- Antisueros para identificación de serotipos (a,b,c,d,e,f) de *H. influenzae* (Difco)
- Colorantes para tinción de Gram (Becton-Dickinson)
- Cloro (Cloralex)

- Alcohol (Dibar)
- PureLink™ Genomic DNA Mini Kit Invitrogen
- Agarosa IX-A (Sigma-Aldrich)
- Taq polimerasa recombinante (Invitrogen)
- dNTPs (invitrogen)
- MgCl₂ (invitrogen)
- Enhancer (Sigma)
- Bromuro de Etidio (Fisher Scientific)
- Ácido Etilendiamino Tetraacético TAE 50x (Fisher Scientific)
- Buffer de carga (Green go Taq^R Promega)
- Marcador de PM DNA ladder 100 pb (Promega)
- Iniciadores (Invitrogen™)

Anexo B

Preparación de Reactivos

TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram es una prueba utilizada para el diagnóstico presuntivo de algún microorganismo o agente infeccioso, por otro lado, con esta prueba también se puede evaluar la calidad de la muestra clínica.

Las bacterias Gram (+) adquieren una coloración violeta debido al gran porcentaje de peptidoglicano que poseen en su pared celular, por lo que retienen el cristal violeta, que en el interior de la célula está formando un complejo con el Lugol, aún después de la decoloración moderada con alcohol acetona.

Ciertas bacterias, pierden la tinción primaria con cristal violeta, al ser decoloradas; debido a que contienen altas cantidades de lípidos en su pared celular, además de un bajo porcentaje de peptidoglicano; por lo tanto, adquieren el color de la safranina. Cuando se observan al microscopio se ven de color rojo y se denominan Gram (-).

Procedimiento

1. Se toma una colonia de *H. influenzae* y se realiza una suspensión con solución salina estéril, la cual se expande sobre el portaobjetos, se fija directamente al mechero y se procede a la tinción.

2. Se agrega el colorante cristal violeta con el cual se teñirán las bacterias Gram positivas hasta cubrir en su totalidad la muestra se deja actuar durante un minuto para posteriormente enjuagar.
3. Se añade lugol durante un minuto para posteriormente enjuagar.
4. Se añade alcohol acetona para desteñir las bacterias
5. Se agrega el colorante de contraste safranina con el cual se teñirán las bacterias Gram negativas sobre la muestra y se deja durante un minuto, posteriormente se enjuaga con agua.
6. Se deja secar a temperatura ambiente para realizar observar al Microscopio

Agar Sangre

La infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

El agregado de sangre al medio de cultivo, en concentración final de 5-10 %, aporta nutrientes para el crecimiento bacteriano y permite detectar hemólisis

Preparación

Suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea. Calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto. Esterilizar 20 minutos a 121°C. Enfriar a 45-50°C agregar sangre de oveja desfibrinada al 5%. Homogeneizar y distribuir en placas.

Agar Chocolate

Es un medio altamente nutritivo en donde la pluripeptona (es una mezcla en partes iguales de peptona de carne y peptona de caseína) es la fuente de nutrientes para el desarrollo de microorganismos, el almidón soluble absorbe sustancias tóxicas indeseables para el desarrollo de ciertos microorganismos, las sales de fosfato forman un sistema buffer y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

Este medio de cultivo, puede ser suplementado con otros nutrientes o con antimicrobianos, lográndose un medio más enriquecido o selectivo según el aditivo.

El agar base GC, en combinación con hemoglobina y el suplemento estéril de enriquecimiento, se usa para el aislamiento de microorganismos exigentes.

Preparación

Suspender 36 g del polvo en 500ml de agua destilada, dejar reposar 5 minutos.

Hemoglobina

Suspender 10 g de hemoglobina en 500 ml de agua destilada, mezclar vigorosamente hasta disolver la hemoglobina, filtrar para eliminar grumos y posteriormente mezclar con los 500 ml de gelosa chocolate hasta obtener una suspensión homogénea, calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto, esterilizar 20 minutos a 121°C. Enfriar a 45°C- 50°C y agregar por último el polienriquecimiento agitar, verter en cajas Petri.

Medio de cultivo para sensibilidad a antibióticos con base en Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI).

- Se disuelven 30 mg de hematina en 100 ml de NaOH 0.01 M.
- Se prepara 1 litro de agar Muller Hinton adicionando extracto de levadura.
- Se toman 30 ml de la solución de hematina la cual se disuelven en el agar MH se mezcla y se esteriliza en el autoclave.
- Se disuelven 50 mg NAD en 10 ml de H₂O destilada.
- Se esteriliza por medio de filtración y se añade asépticamente
- Terminado el proceso de esterilización y enfriamiento a 40 °C, a la mezcla final de agar se le agregan 3 ml de solución NAD estéril un factor termolábil para un mejor crecimiento de la bacteria.
- Se vierte el agar en cajas Petri y se dejan incubar para autenticar su esterilidad, después de 18 horas se conservan en refrigeración para su uso.

Anexo C

Pruebas Bioquímicas de identificación

PRUEBA DE OXIDASA

El fundamento de esta prueba es identificar la presencia de la enzima oxidasa, producida por ciertas bacterias. La reacción de oxidasa, se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa, que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrogeno. El oxígeno actúa por lo tanto como aceptor final de la cadena de electrones. Este sistema generalmente lo poseen los microorganismos aeróbicos.

Procedimiento

- 1.- Con un aplicador de madera se toma una colonia y se coloca sobre un pedazo de papel filtro impregnado con reactivo de Kovac's (diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%).
- 2.- Esperar de 10 a 15 segundos a que ocurra la reacción.
- 3.- Una coloración oscura en el papel indica oxidasa positiva mientras que una coloración blanca o el no haber cambios en la colonia indica oxidasa negativa.

PRUEBA DE CATALASA

Se basa en comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aeróbicas y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Esta enzima participa en la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua.

Procedimiento

- 1.- Con un aplicador de madera se toma el centro de una colonia y se coloca en un porta objetos.
- 2.- Adicionar una gota de peróxido de hidrógeno con un gotero o pipeta Pasteur
- 3.- Se observará de inmediato la formación de burbujas (liberación de gas) lo cual indica que la prueba es positiva.

Interpretación de las tiras API NH (Biomeriux^{MR})

Penicilinasas:

- Una reacción positiva (coloración amarilla, amarilla verdosa o amarilla-azulada) nos indica la presencia de una penicilinasas. La presencia de esa enzima nos prohíbe el empleo de las penicilinas (Penicilina G, amino-, carboxi- ureido-penicilinas).
- Una reacción negativa (coloración azul) nos indica la ausencia de penicilinasas.
-

Tabla 6. Resultado de tiras API *H. influenzae*

Prueba bioquímica	PEN	GLU	FRU	MAL	SAC	ODC	URE	LIP ProA	PAL-GGT	βGAL	IND-βGAL
<i>Haemophilus Influenzae</i>	-	+	V	-	-	+	+	-	-	-	+

Fermentación de carbohidratos (glucosa GLU, Fructosa FLU, maltosa MAL y sacarosa SAC)

- Una reacción positiva arrojaría como resultado una coloración amarillo-naranja lo cual nos indica la producción de ácido.
- Una reacción negativa coloración roja, ausencia de ácido

Ornitina Decarboxilasa (ODC)

- Reacción positiva color azul indica la descarboxilación de la lisina por la enzima ornitina descarboxilasa.
- Reacción negativa color amarillo verdoso

Ureasa (URE)

- Reacción positiva, color rosa nos indica la presencia de la enzima ureasa la cual interviene en el proceso de hidrolizar la urea produciendo amoníaco.
- Reacción negativa color amarillo indica ausencia de la enzima ureasa.

Indol (IND)

- Reacción positiva color rosa nos indica la capacidad de separar el indol de la molécula de triptófano por medio de la enzima triptofanasa.
- Reacción negativa incolora

Fosfatasa alcalina (PAL)

- Reacción positiva color amarillo indica la presencia de esta enzima PAL.
- Reacción negativa color amarillo pálido o incoloro indica ausencia de la enzima PAL

Gamma-Glutamil Transferasa (GGT)

- Reacción positiva color anaranjado indica la presencia de la GGT.
- Reacción negativa color amarillo indica ausencia de la enzima GGT.

Prolina Arilamidasa (ProA)

- Resultado positivo color anaranjado presencia de la enzima (ProA)
- Resultado negativo color amarillo ausencia de la enzima (ProA)

Lipasa (LIP)

- Resultado positivo color azul presencia de la enzima LIP
- Resultado negativo incoloro o gris pálido ausencia de la enzima LIP

Anexo D

Antimicrobianos (Sensidiscos)

Cefotaxima	30 ng
Amoxicilina con ácido clavulanico	30 ng
Amoxicilina	25 ng
Ceftriaxona	30 ng
Cefaclor	30 ng
Ciprofloxacino	5 ng
Trimetoprima con sulfmetoxazol	1.25 ng
Meropenem	10 ng

Deulofeu F., Nava J., Bella F., Marti C., Morera M., Font B., Fontanals, Lite J., Garau J., Calderon A., Coll M., Uriz S., Pineda V. Prospective Epidemiological Study of Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in Adults. Eur.J.Clin.Microbiol. Infec. Dis. 1994; 13: 633-638.

Garcia E., Viveros M., Gonzalez., Escamilla V., Gracia J., Caracterización y resistencia de las cepas de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* aislados de la nasofaringe de portadores. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx., Enero- Marzo 1998; p. 17-24.

DICKINSON F O, PÉREZ A E, GALINDO M A, QUINTANA I. : Impacto de la vacunación contra *H. influenzae* tipo b en Cuba. Rev Panam Sal Pub 2001; 10(3):169-173.

Doern Gary V, Jones Ronald N, Pfaller Michell A, Kugler Kari and the Sentry Participants Group. *H. influenzae* and *Moraxella catharralis* from patirnst with community-acquired respiratory trac infections: antimicrobial susceptibility patterns from the sentry antimicrobial surveillance program (United Satates and Canada, 1997) Antimicrob. Agents Chemother, 1999, vol 43, 385-389.

Encarna Simarroa, Joaquín Ruiza, Joaquín Gómezb, M Gloria Ortegac, Carmen Vicentec, Leticia Martíneza, Jerónimo Pérez Infecciones por *H. influenzae* en niños menores de 5 años en la comunidad murciana durante el período 1992-1999

Falla T., Dobson S., Crook D., Kraak W., Nichols W., Anderson G., Jordens J., Slack M., Nayon-Whited, Moxon E., Population-based study of non-typable *H. influenzae* invasive disease in children and neonates. Lancet; 1993, 341: 851-54.

Falla T J. Crook DW; Brophy L, Maskell D, Kroll J S, Moxon E R, : PCR for capsular typing of *H. influenzae*, *J Clin. Microbiol* 1994; 32(10): 2382-2386

Finegold, Sydney M, William Jeffery, Diagnóstico Microbiológico, 3a Edición, 1970, pp.90,169-173.

Fusté M C, Pineda M A, Palomar J, Viñas M, Loren J G; Clonality of multidrug-resistant nontypeable strains of *H. influenzae*. J Clin Microbiol 1996; 34:2760-2765.

Freitas H S, Merchan-Hamann E; Impact of anti-Hib conjugate vaccine on the incidence of *H. influenzae* meningitis in Brazil's Federal District: results of a three-year follow-up. Rev Panam Salud Publica 2006; 19(1):33-37.

Grasso R., West L., Holbrook N., Halkias D., Paradise L., and Friedman H. Increased Sensitivity of New Coagglutination Test for Rapid Identification of *H. influenzae* Type b. J. Clin. Microbiol, June 1981, p. 1122-1124.

Hellan L; Chesney D; Guadagno G; Investigation of Ampicil-Intermediate strains of *H. influenzae* by using the disk diffusion procedure and current national committee for clinical laboratory standard guidelines, J. Clin Microbiol; 1992, pp: 1674-1667.

Hoisten S K, Moxon E R, Silver R P; Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are part of an 18- kilobase tandem duplication. Microbiology 1986; 83:1106-1110.

Ishiwada N, Cao L D, Kohno Y; PCR-based capsular serotype determination of *H. influenzae* strains recovered from Japanese paediatric patients with invasive infection. Clin Microbiol Infect 2004; 10:895-898.

Jorgensen J., Update on Mechanism and Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*: Clin Infect Diseases; 1992, 14: 119-23.

Kapagiannis B g, Satola S, Keyserling H L, Farley M M; Invasive infections with *Haemophilus influenzae* serotype a containing an *IS1061*-*bexA* partial deletion: possible association with virulence. Clin Infect Dis 2005; 41:e97-e103.

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

Koneman E W, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn W Jr C; *Haemophilus*. : Diagnostic Microbiology. 5^a, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. USA., p 363-393,1997.

Kroll J S, Zamze S, Loynds B, Moxon E R; Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *H. influenzae*. J Bacteriol 1989; 171(6):3343-3347.

LaClaire L L, Tondella M L C, Beall D S, noble C a, Raghunthan P L, Rosenstein N E, Popovic T, The Active Bacterial Core Surveillance Team Members; Identification of *H. influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. J Clin Microbiol 2003; 41(1):393-396.

Moxon E R, Kroll J S; Type b capsular polysaccharide as a virulence factor of *H. influenzae*. Vaccine 1988; 6(2):113-115.

MacFaddin Jean, Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica, Editorial Médica Panamericana, 3a Edición 2002 43-246,422.

Mendelman P., Chaffin D., Stull T., Rubens C., Mack K., and Smith A. Characterization on Non β Lactamase Mediated Ampicilin Resistance in *H. influenzae*. Antimicrob Agents Chemoter; 1984, 26: 235-244.

Murphy T F, Kirkham C; MURPHY T. F., KIRKHAM C; Biofilm formation by nontypeable *H. influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. BMC Microbiol. 2:7. 2002.

National Committee for Clinical Laboratory standards. 2002. Performance standards of antimicrobial susceptibility testing: sixth informational supplement. NCCLS document M100-S6

Oguri T., Igari J., Hiramatsu K., Watanabe A., Inoue M., Abe M., Yamane N., Aihara M., Hoshimoto H., Japan beta-lactamase Research Group, Beta Lactamase-producing activity and antimicrobial susceptibility of major pathogenic bacteria isolated from clinical samples. Japan beta lactamase Research Group, Jpn J Antibiot. 2002 Sep; 55 Suppl A: 1-28.

Ovalle M V, Agudelo C I, Muñoz N, Castañeda E, Gallego C R, Nuñez S, Jaramillo E, Portilla V E, Cano M, Gartner M, Alvarez M, H, Mora G, Rincón P, Uzutea M; Vigilancia de los serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *H. influenzae* en Colombia, 1994-2002. Biomédica 2003; 23:194-201.

Pérez-Vázquez M, Román F, Aracil B, Cantón R, Campos J. Laboratory detection of *H. influenzae* with decreased susceptibility to nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin due to GyrA and ParC mutations. J Clin Microbiol. 2004 Mar;42(3):1185-91.

Pfeiffer, R.F.J. Vorlaufige mitt heilungen uber die erreger der influenzae. Deutsche medicinische Wochenschrift. 1892, pp.18:28.

Pittman M. Variation and type specificity of the bacterial species *H. influenzae*. J Exp Med, 53 (1931), pp. 471-492

Rodriguez CA, Avadhanula V, Bushcer A, Smith AI, St Geme II JW and Adderson EE. Prevalence and distribution of adhesions in invasive non-type b encapsulated *H. influenzae*. Infect Immun 2003; 71(4): 1635-1642

Sosa iglesias E G, Anaya Medina A, Portillo Gómez L, Bermúdez Garcia G,

Guitierrez Cazares Z, Juarez Ahuactzin E, Mancilla González S; Biotypes and serotypes of *H. influenzae* of clinical isolates from Mexican children. Arch Med Res 1998; 29(2):133-136.

Soja Elodia, Portillo Leopoldo, Adherencia de *H. influenzae*, Enf. Inf. Y Microbiol, 1998; 18(2):63-9.

St Geme III J, Cutter D. Influence of Pili, fibrils and capsule on in vitro adherence by *H. influenzae* type b. Molecular Microbiol 1996;21-31.

Sirakova T, Kolattukudy Pe: Murwin D, Billy J, Leake EL, De Maria T, Bakeletz Lo. Role of fibria expressed by notypable *H. influenzae* in pathogenesis of and protection against otitis media and relatedness of the fimbrin subunit to other membrane protein A. Infect Immun 1994; 62: 2002-20.

Seki H, Kasahara Y, Otha K., Saikawa Y, Sumita R, Yachie A, Fujita S, Koizumi S, Increase Prevalence of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing, strains of *H. influenzae* in children in japan, Chemoteraphy, 1999 Jan-Feb; 45 (1): 15-21.

Shively R G, Shigei J T, Peterson E M, De la Maza L M; Typing of *H. influenzae* by coagglutination and conventional slide agglutination. J Clin Microbiol 1981; 14(6):706-708.

Tang C M, Hood D W, Moxon E R; Pathogenesis of *H. influenzae* infections. En: Principles of bacterial pathogenesis. Graisman E (ed.). ed. Academic-Press, San Diego, California. USA., p 675-716, 2001.

Van ketel R J, De Wever B, Van Alphen L; Detection of *H. influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. J Med Microbiol 1990; 33(4):271-276.

Van Schillgaarde M, Van Alphen L, Ejik PP, Everts V, Dankert J, Paracytosis Of *H.*

influenzae through cell layers of NCI-H292 lung epithelial cells. *Infect Immun* 1995;63:4729-37

Villaseñor SA, Avila FC, Santos PJI. Impacto de las infecciones por *H. influenzae* en niños mexicanos. *Vol Med Hosp Infant Mex* 1993;50:415-421.

Wenger JD, Ward JI; *H. influenzae* vaccine. En: *Vaccines*. Plotkin S A, Orenstein W A, Offit P A (eds.). 4th, ed. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA., p 229-268, 2004.

Wilson S G, Miles: *Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity*. 6th, ed. London: Arnod., p 1017-1035, 1975.

Weltman G, Fossati M, Correa C, Regueira M, Mollerach M; PCR-based capsular typing of *H. influenzae* isolates non-typeable by agglutination. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37(4):19 9-202.

Wilson R. Patogenésis y Control de las Infecciones Bronquiales: Circulo Vicioso de la Limitación Respiratoria, *Rev. Contemp. Pharmacother* 1992, 3; 103-112.

Winslow Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH,(Type genus of the tribe α Haemophileae Castellani and Chalmers 1917.

Zinsser *Microbiología* Joklik, Wolfgang Willett, Hilda Amos, Bernard Wilfert, Catherine Editorial Medica Panamericana 22^a edición 1996, 636-647.