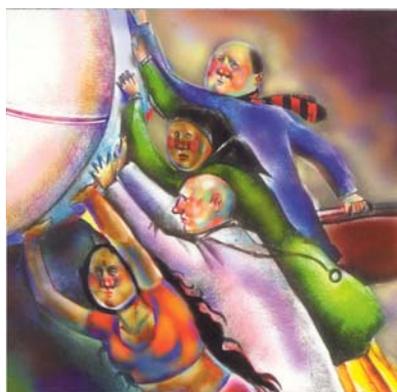


**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”**

**SUBDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA**

**LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE MICROBIOLOGÍA  
IPK-MINSAP**



*Haemophilus influenzae.*  
**SUSCEPTIBILIDAD  
A LOS ANTIMICROBIANOS Y  
COMPORTAMIENTO FRENTE A LA  
VACUNA EN CUBA**

**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

*Autora: Dra. Alina E. Llop Hernández*

**La Habana. 2006**

---

**TABLA DE CONTENIDO**
**SÍNTESIS**

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Hipótesis .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Objetivos.....</b>	<b>8</b>
1.2.1. General .....	8
1.2.2. Específicos.....	8
<b>1.3. Novedad científica.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. Valor teórico.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Valor práctico .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Epidemiología de las enfermedades invasivas por <i>Haemophilus influenzae</i> b .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Patogenia de las infecciones por <i>H. influenzae</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3. Inmunidad .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4. <i>Haemophilus influenzae</i>. Recuento histórico .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5. Taxonomía.....</b>	<b>16</b>
<b>2.6. <i>Haemophilus influenzae</i>. Algunas características biológicas relevantes .....</b>	<b>16</b>
2.6.1. Características de Crecimiento .....	17
<b>2.7. <i>Haemophilus influenzae</i>. Factores de virulencia .....</b>	<b>17</b>
2.7.1. La Cápsula: Estructura y composición antigénica .....	17
2.7.2. Las Proteínas de la Membrana Externa (PME).....	18
2.7.3. Fimbrias filamentosas (pili).....	19
2.7.4. Proteasa IgA1 .....	20
2.7.5. Lipooligosacárido (LOS).....	20
<b>2.8. Diagnóstico microbiológico de <i>H. influenzae</i> b .....</b>	<b>20</b>
2.8.1. Examen microscópico.....	21
2.8.2. Diagnóstico rápido.....	21
2.8.3. Cultivo .....	21
<b>2.9. <i>Haemophilus influenzae</i>. Caracterización microbiológica .....</b>	<b>22</b>
2.9.1. Serotipificación.....	22
2.9.2. Biotipificación .....	23
2.9.3. Subtipificación.....	24
2.9.4. Electroforesis en Campo Pulsado (ECP) .....	24
<b>2.10. <i>Haemophilus influenzae</i>. Resistencia a los antimicrobianos .....</b>	<b>25</b>
2.10.1. Mecanismos de Resistencia .....	26
<b>2.11. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos <i>in vitro</i>.....</b>	<b>29</b>
2.11.1. Prueba Cualitativa.....	29
<b>2.12. Pruebas cuantitativas. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)</b> <b>.....</b>	<b>30</b>
2.12.1. Método por Dilución .....	30
<b>2.13. Tratamiento de las infecciones invasivas ocasionadas por <i>Haemophilus influenzae</i> ...</b>	<b>31</b>

2.14. Quimioprofilaxis .....	32
2.15. Inmunogenicidad y eficacia de las vacunas conjugadas contra <i>H. influenzae</i> b .....	32
2.15.1. Eliminación de la enfermedad invasiva por <i>H. influenzae</i> b.....	33
2.16. Aplicación de la vacuna conjugada contra <i>Haemophilus influenzae</i> b. Epidemiología de las enfermedades invasivas por <i>H. influenzae</i> .....	33
2.17. Vacuna conjugada cubana contra <i>Haemophilus influenzae</i> b .....	34
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1. Cepas Bacterianas.....</b>	<b>36</b>
3.1.1. Identificación de las cepas bacterianas .....	36
<b>3.2. Serotipificación .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Conservación de las cepas .....</b>	<b>41</b>
<b>3.4. Determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos .....</b>	<b>41</b>
3.4.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) .....	41
<b>3.5. Determinación de la actividad <math>\beta</math>-lactamasa .....</b>	<b>44</b>
<b>3.6. Revisión de las bases de datos relacionadas .....</b>	<b>44</b>
3.6.1. Bases de datos utilizadas para conocer el número de casos de MEB causados por <i>Haemophilus influenzae</i> , desde enero 1989 hasta diciembre 2005, en Cuba.....	44
<b>3.7. Análisis estadístico .....</b>	<b>45</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1. Distribución de las cepas de <i>Haemophilus influenzae</i>.....</b>	<b>46</b>
4.1.1. Relación de casos reportados de MEB y cepas viables de <i>Haemophilus influenzae</i> recibidas por año. LNRM-IPK. Cuba. 1989-2005 .....	46
4.1.2. Distribución por regiones geográficas de cepas viables de <i>H. influenzae</i> b recibidas en el LNRM-IPK. Cuba. 1989-2005 .....	48
<b>4.2. Susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de <i>H. influenzae</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>4.3. Susceptibilidad a los antimicrobianos y producción de <math>\beta</math>-lactamasa .....</b>	<b>52</b>
4.3.1. Variabilidad geográfica y producción de $\beta$ -lactamasa.....	54
<b>4.4. Resistencia de <i>H. influenzae</i> a los antimicrobianos .....</b>	<b>55</b>
4.4.1. Resistencia de <i>Haemophilus influenzae</i> en Cuba a los antimicrobianos en la etapa prevacunal ....	56
4.4.2. Resistencia a los antimicrobianos en Cuba de <i>Haemophilus influenzae</i> en la etapa postvacunal..	57
<b>4.5. La multirresistencia.....</b>	<b>59</b>
<b>4.6. Vacuna conjugada anti <i>H. influenzae</i> b .....</b>	<b>61</b>
<b>4.7. Contribución del Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología IPK-MINSAP a la vigilancia de los Síndromes Neurológicos Infecciosos en Cuba.....</b>	<b>67</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>71</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA DE LA AUTORA .....</b>	<b>90</b>
<b>8.1. Bibliografía de la autora relacionada con la tesis .....</b>	<b>90</b>
<b>8.2. Bibliografía de la autora no relacionada con el tema .....</b>	<b>90</b>

<b>8.3. Informes técnicos de la autora.....</b>	<b>96</b>
<b>8.4. Presentación en eventos científicos.....</b>	<b>98</b>
<b><i>ANEXOS.....</i></b>	<b><i>100</i></b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>A/C</b>	Amoxicilina/ácido clavulánico.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>AMP</b>	Ampicilina.
<b>CAT</b>	Enzima cloranfenicol acetil transferasa.
<b>CHL</b>	Cloranfenicol.
<b>CIM</b>	Concentración Inhibitoria Mínima.
<b>CRO</b>	Ceftriaxona.
<b>CTX</b>	Cefotaxima.
<b>D.O</b>	Densidad óptica.
<b>DNE</b>	Dirección Nacional de Estadística.
<b>DTT</b>	Vacuna triple contra difteria-tosferina-tétanos.
<b>ECP</b>	Electroforesis en campo pulsado.
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiamino tetracético
<b><i>H. influenzae</i> NT</b>	<i>H. influenzae</i> no tipable
<b><i>Hi</i></b>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<b><i>Hib</i></b>	<i>Haemophilus influenzae</i> serotipo b
<b>HTM</b>	<i>Haemophilus</i> Test Medium.
<b>IPK</b>	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo.
<b>LNRM-IPK</b>	Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología IPK-MINSAP.
<b>LOS</b>	Lipooligosacárido.
<b>MEB</b>	Meningoencefalitis bacteriana.
<b>MINSAP</b>	Ministerio de Salud Pública.
<b>NAD</b>	Dinucleótido de nicotinamida.
<b>NADP</b>	Dinucleótido de nicotinamida fosfato.
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud.
<b>P</b>	Proteína.
<b>PBS</b>	Solución salina fosfato.
<b>PC</b>	Polisacárido capsular.
<b>PFP</b>	Proteínas fijadoras de la penicilina.
<b>PM</b>	Peso Molecular.
<b>PME</b>	Proteínas de membrana externa.
<b>PRP</b>	Polirribosil-ribitol-fosfato.
<b>RCP</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>RIF</b>	Rifampicina.
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.
<b>SIN</b>	Síndrome Neurológico Infeccioso.
<b>SNVMEB</b>	Sistema Nacional de Vigilancia de las Meningoencefalitis Bacterianas.
<b>SVMB-IPK</b>	Sistema de Vigilancia de Meningitis Bacteriana-IPK
<b>SXT</b>	Cotrimoxazol
<b>TET</b>	Tetraciclina
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonias.

## **AGRADECIMIENTOS**

Toda obra como ésta evidencia un trabajo, pero un trabajo que posee mucho del esfuerzo colectivo, no sólo el del que la representa. El documento, por lo tanto, constituye un paso obligado o establecido entre los que hay que andar para llegar a poseer un título de grado científico. Eso es lo que para mí representa esta tesis, un paso que debo dar para documentar una parte de mi vida de trabajo para la ciencia y por la ciencia. En los años transcurridos, he tenido la oportunidad de ver crecer junto a mí y de tal manera, a muchos de mis alumnos, en el terreno científico y técnico en nuestra ciencia cubana. Ellos hoy se encuentran, entre los científicos, convertidos en brillantes y prometedores investigadores. A ellos, y muy particularmente a aquellos que me ayudaron en esta empresa, quiero agradecer profundamente el estímulo brindado, que me impulsó a dar este paso, su apoyo incondicional, su inteligencia, su preparación científica y metodológica, su paciencia, su respeto, su ayuda irrestricta sin limitaciones, con sinceridad y sobre todo con amor. No voy a mencionar nombres, ellos saben muy bien a quienes me refiero.

Pero... no sólo de ellos se trata, muchos son los que me han ayudado, apoyado y también fortalecido, preparándome para dar este paso, simples compañeros que no entran en este primer grupo, pero que me han dado iguales pruebas, a ellos también mucho les agradezco y agradeceré siempre su lealtad, su sinceridad espontánea, y también su desinteresado amor.

A mi pequeña gran familia, a mis dos hijos, siempre verdaderos pilares de mis sueños, dándome su amor y seguridad, a ellos y a todos, muchas gracias. Y junto a ellos, cómo olvidar a los que me han mantenido el ánimo en alto, siempre joven y viva, con deseos de vivir más por ellos y para ellos, imaginen que se trata de mis nietos, mi amor, ternura y mucho agradecimiento para ellos.

A la nueva dimensión de la institución científica que hace más de veinte años me acogió, ofreciéndome la posibilidad de superarme y enseñándome a continuar el camino hacia el desarrollo científico del control de las enfermedades infecciosas, tan importante para el desarrollo de la Salud Pública del país. A ella con todos los que la representan, mi agradecimiento muy especial.

Y para el que decidió que, hasta hoy, continuara dedicándome al desarrollo de la ciencia particular que aprendí, al que confió en mí y me brindó la oportunidad de seguir, en Cuba, el camino de “los hombres y mujeres de ciencia”; a él, en particular, el agradecimiento sincero, con infinito amor y admiración por su incomparable tenacidad y espíritu de lucha, y su atinada visión del futuro de la ciencia cubana.

¡Ah!,...y en fin, a la vida, por haberme permitido llegar hasta aquí.

A todos por igual, muchas gracias, Alina

## SÍNTESIS

Se presenta el resultado del Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia de las cepas circulantes de *Haemophilus influenzae* en Cuba, aisladas de pacientes con procesos invasivos de meningoccefalitis bacteriana. Fueron estudiadas 1155 cepas colectadas recibidas de todo el país, durante un período ininterrumpido de 17 años, desde enero del 1989 a diciembre de 2005. El trabajo se desarrolló en el Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” MINSAP. Todas las cepas fueron caracterizadas microbiológicamente y para su estudio, fueron divididas en dos grupos: un primer grupo (1097), correspondiente a la etapa prevacunal (1989-1999) y un segundo grupo de 58 cepas, de la etapa postvacunal (2000-2005). En ambos, se estudió la susceptibilidad a los antimicrobianos determinándose la Concentración Inhibitoria Mínima, comprobándose para el primer grupo, una elevada resistencia a: ampicilina (44.4%), cloranfenicol (40.9%), cotrimoxazol (48.3%) y tetraciclina (30.3%). En la etapa postvacunal, se evidenció una disminución relativa de la resistencia a ampicilina a 36.4%, cloranfenicol a 32.7%, cotrimoxazol a 36.4% y a la tetraciclina de 15.5%, ésta última, con resultados estadísticamente significativos. Todas las cepas resistentes a la ampicilina resultaron productoras de  $\beta$  lactamasa. La multiresistencia fue detectada en 40.6% de las cepas en la etapa prevacunal disminuyendo a 13.8% en la postvacunal. De una etapa a otra, los patrones de resistencia y multiresistencia disminuyeron significativamente. Se señala el impacto positivo de la vacunación sobre la morbilidad y la mortalidad de la meningoccefalitis bacteriana por *Haemophilus influenzae* b en Cuba, comparándola con lo sucedido en otros países desarrollados y en desarrollo, así como la potencialidad de que el país haya logrado la única vacuna conjugada conocida que hasta la fecha haya sido obtenida por síntesis química y aplicada masivamente en el 2005, con resultados positivos. Se ratifica la necesidad de mantener el Monitoreo/Vigilancia de las cepas de *Haemophilus influenzae* en el tiempo, su caracterización microbiológica y genética así como el trabajo del Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología, el que permitió sustentar la historicidad y comportamiento de las cepas de *Haemophilus influenzae* b invasivas en el país base del presente trabajo.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la lucha del hombre contra las enfermedades infecciosas, la ciencia ha contribuido con dos extraordinarias aportes que revolucionaron el accionar para lograrlo: las vacunas y los antimicrobianos.

Los avances médicos y un mejor conocimiento de los orígenes y etiologías de las enfermedades infecciosas ha devenido en un aumento, sin precedentes, en la longevidad y la calidad de vida para aquellos que en el mundo de hoy, son los afortunados en contar con la accesibilidad a los antimicrobianos y a las vacunas. Son las intervenciones médicas y el arsenal de medicamentos los que han transformado nuestra experiencia de la vida en algo más que la precaria existencia de nuestros ancestros, en la lucha contra las enfermedades infecciosas. Pero a la humanidad, le queda mucho por aprender sobre el uso de los antimicrobianos y la responsabilidad de preservar estos “preciosos compuestos” para tratar solo aquellas enfermedades para las que se encuentran específicamente indicados. La resistencia de las bacterias a las drogas antimicrobianas es un fenómeno natural, y se ha convertido en un problema mundial emergente, al punto que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado la resistencia a los antimicrobianos, como una Enfermedad Emergente (WHO, 2000).

Un componente esencial de cualquier programa de control de la resistencia a los antimicrobianos, lo constituye el uso apropiado de éstos. Sin embargo, se conoce el empleo indiscriminado que de ellos se hace tanto en el tratamiento de los humanos, como en los animales y en las plantas, ejerciéndose sobre los mismos una presión selectiva, uno de los principales factores que ha determinado la emergencia de la resistencia. Se impone pues, pensar en mejores estrategias de control. Resulta esencial que los médicos de atención a pacientes comprendan y tengan presente todos los factores que favorecen la aparición de las cepas resistentes y su posterior diseminación.

La resistencia antimicrobiana en organismos previamente susceptibles, ocurre cuando los antibióticos son usados o mal usados, en la década anterior, emergiendo así, la resistencia en toda clase de microorganismos, incluyendo al *Mycobacterium tuberculosis*. Se

imponen nuevos enfoques de abordaje para el diseño, administración y control de los programas (WHO, 2000).

Normalmente, las bacterias del suelo producen pequeñas cantidades de antibióticos, y nuestro ecosistema ha sido inundado por toneladas de antibióticos fabricados por el hombre, lo que ha creado una tensión rápida (stress) sin precedentes, en la evolución de la susceptibilidad de todos los microorganismos. La selección natural de cepas drogorresistentes se ha constituido en un arma virtual entre la tecnología y la evolución de los microorganismos (Neu, 1992).

Una nueva dimensión del problema de la resistencia antimicrobiana y la diseminación de estas bacterias resistentes al medio y a la comunidad, deberá ser observado muy de cerca por los clínicos y microbiólogos ya que constituye un problema de salud para países en desarrollo y desarrollados, los que han sugerido que el factor dominante para que se extiendan las bacterias resistentes en la comunidad, es producto del aumento del uso de los antibióticos (WHO, 2000) pero, no queda clara la cadena de causalidades.

Los mecanismos inherentes a la resistencia de las bacterias a los antibióticos, son diversos. Las bacterias pueden adquirir resistencia a los antimicrobianos por cuatro mecanismos principales: 1) Modificación de la diana de la droga en la célula, 2) Un cambio en la permeabilidad de la célula para esa droga, 3) Activación de las bombas que expelen la entrada del fármaco a la célula, y 4) La producción de enzimas u otros componentes que desnaturalizan, inactivan o detoxifican las drogas. Se plantea que estos mecanismos pueden ser adquiridos por simples mutaciones de genes cromosomales en células susceptibles por transferencia de genes desde otras bacterias resistentes. Esto último puede suceder por transformación, la adquisición de ADN libre que lleven estos genes; por conjugación por medio de elementos como son plásmidos o transposones; o por transducción, infección por un bacteriófago portador de un gen de resistencia. La resistencia mediada por plásmidos es el más común de todos los mecanismos. Esta autónoma replicación e infecciosidad de las moléculas de ADN debe llevar genes (transposones) confiriendo resistencia a cinco o más antibióticos (Levin, 1998; Leaves *et al*, 2000). No es casual que la OMS sitúe la resistencia de los microorganismos a los

antimicrobianos como una de las llamadas Enfermedades Emergentes para este siglo (WHO, 2000).

A finales de la década de los 80, dada la importancia concedida por la salud pública cubana a la mortalidad infantil y siendo las meningocelitis bacterianas (MEB) una importante causa de muerte o de secuelas, especialmente en niños menores de 5 años, se decide, por el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), en el Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología (LNRM-IPK), extender el estudio de la vigilancia a las bacterias más significativas asociadas a la MEB y otros SNI (así como, al estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos de las bacterias asociadas al síndrome). Señalemos que hasta ese momento, solo se realizaba la vigilancia microbiológica desde hacía más de 10 años, al *M. tuberculosis*. Es en 1986, que se comenzó a sistematizar el Monitoreo y la Vigilancia de la resistencia al *H. influenzae* por el impacto en la salud que este significaba en Cuba manteniéndose hasta la fecha; no solo de la resistencia sino de las características microbiológicas de las cepas circulantes en el país (LNRM, 2006)

Resulta conocido que *H. influenzae* es un patógeno exclusivo del hombre y puede ser capsulado o no, siendo el más virulento al que se le denominó serotipo b. *H. influenzae* serotipo b (*Hib*), causa enfermedades invasivas graves tales como meningitis, epiglotitis, sepsis, neumonía, celulitis y artritis entre otras (Cochi y Ward, 1991; CDC, 1998; Campos, 2001; Takemura y De Andrade, 2001; Jamison *et al*, 2006). Es el agente etiológico más frecuentemente aislado entre las MEB en la edad pediátrica y la segunda causa más importante de las neumonías bacterianas en diversas partes del mundo (Dagan, 1997; Gold, 1999). Se estima que cada año fallecen más de 250 000 niños por meningitis y más de 500 000 por neumonías, causadas por *H. influenzae* b, básicamente, en los países en desarrollo (Benguigui *et al*, 1997; Sánchez *et al*, 1999; Devarajan, 2001). Las enfermedades invasivas a este agente, en más del 85% ocurren en los menores de 5 años, y más del 65% en niños por debajo de los 2 años de edad; presentándose el número mayor de casos entre los 6 y 12 meses de edad. La MEB constituye el 52% de todas las patologías graves de etiología a *H. influenzae*. Otros factores de riesgo asociados son: el déficit inmunitario, la raza, el tabaquismo pasivo, el tipo de lactancia, el hacinamiento familiar, el número de hermanos, la asistencia a círculos infantiles, el nivel socioeconómico, así como, las

posibles alteraciones asociadas directamente al microorganismo (Novakova *et al*, 1999; Simarro *et al*, 2000; Bakir *et al*, 2002; Neto *et al*, 2003).

Los portadores de *H. influenzae* constituyen una importante fuente de infección. Pueden encontrarse portadores asintomáticos de cepas *H. influenzae* b entre el 1-5% de la población. La tasa de portadores es menos frecuente entre los adultos y niños menores de dos años y mayor en los niños en edad preescolar. La colonización con cepas no capsuladas es más común y se les encuentra asociadas a otitis media, bronquitis y sinusitis (Dimopoulou *et al*, 1997; Ayyildiz *et al*, 2003; Yano, 2003; Farjo *et al*, 2004). Estas cepas, en escasas ocasiones son responsables de enfermedad invasiva (Dagan *et al*, 2001; Murphy, 1993; Lee *et al*, 2005). La quimioprofilaxis ha sido utilizada para tratar de prevenir la transmisión secundaria por *H. influenzae* b (Santosham, 2000). Actualmente con la disponibilidad de las vacunas, los programas rutinarios de inmunización, prometen ser, el método más eficaz para prevenir los casos clínicos (Peltola, 2000<sup>a</sup>; Campos *et al*, 2004; Dickinson y Péres, 2005; Jamison *et al*, 2006).

La incidencia de enfermedad invasiva por *H. influenzae* b varía a escala continental, nacional y local (Jordens y Slack, 1995; Peltola, 2000<sup>b</sup>; Almuneef *et al*, 2001; CDC, 2001; Zhou *et al*, 2002; Preston, 2003). Antes de la introducción de la vacunación en Estados Unidos la incidencia de MEB ocasionada por *H. influenzae* b era de 50-60 x 100 000 habitantes, valores dos o tres veces superiores a los encontrados en Europa, los que oscilaban entre 20 y 23 x 100 000 habitantes; y similares a zonas geográficas como las de Sur América, Asia u Oceanía (Decker *et al*, 1992; Santosham, 1993; Peltola, 2000<sup>a</sup>; CDC, 2001). Tasas entre 20 a 50 x 100 000 habitantes han sido reportadas en Río de Janeiro, Santiago de Chile, Emiratos Árabes Unidos, Malasia, Nueva Zelanda, Canadá y en la población no aborigen de Australia. Tasas menores a 20 x 100 000 habitantes se reportaron en Uruguay, Hong Kong, Arabia Saudita y Qatar (Peltola, 2000<sup>a</sup>; Almuneef *et al*, 2001; Takemura y De Andrade, 2001; Tauber *et al*, 2001).

La incidencia de MEB, por *H. influenzae* en Cuba en menores de 4 años se mantuvo prácticamente constante antes de 1998, oscilando entre 26.59 y 21.04 x 100 000 habitantes en el período comprendido entre 1986-1998 (etapa prevacunal) (SNVMB, 2006). Valores similares se reportan en países con un desarrollo económico superior al de Cuba

para esta etapa y aún muy superiores, lo que la aleja de la hipótesis, que las mayores tasas de meningitis por *H. influenzae*, en niños menores de 4 años, ocurren en países en vías de desarrollo. Una explicación a este fenómeno lo constituye la equidad del sistema de salud cubano que brinda una cobertura total de los servicios médicos a la población y mantiene un adecuado sistema de vigilancia de las enfermedades infecciosas (DNE, 2004; Galindo, 2006; Comunicación Personal).

Cuando se han logrado coberturas de vacunación entre el 90 y 100% se observa en los países, una reducción del número de casos de enfermedad invasiva (Zhou *et al*, 2002; Garner y Weston, 2003; Hviid y Melbye, 2004; Gessner *et al*, 2005), aún cuando el *H. influenzae* no ha sido erradicado (Scheifele *et al*, 2005; SIREVA II, 2005; Reid, 2006) y los bajos valores de incidencia de MEB alcanzados después de la vacunación, se han mantenido estables. Han sido reportados discretos incrementos en el tiempo, en los niños menores de un año (McVernon *et al*, 2003; Rijkers *et al*, 2003). Esta situación hace que aumente la preocupación entre los clínicos y pediatras por lo que se justifica continuar la vigilancia microbiológica, para conocer las cepas invasivas circulantes en la etapa postvacunal, y realizar su caracterización bioquímica y molecular (McVernon y Heath, 2003; Pushparajah *et al*, 2003; Trotter *et al*, 2003; SIREVA II, 2005; Tamargo, 2005).

Los estudios realizados de vigilancia microbiológica de las cepas circulantes de *H. influenzae* se basan en el empleo de métodos que permitan caracterizar las propiedades de las bacterias relacionadas con los procesos invasivos, posibilitando establecer diferentes marcadores epidemiológicos, algunos de los cuales, constituyen importantes factores de virulencia del microorganismo (Corless *et al*, 2001).

La caracterización de las cepas de *H. influenzae* ha sido ampliamente estudiada. El primer sistema fue establecido por Pittman, en 1931, quien clasificó las cepas en seis serotipos. Esta subdivisión permitió esclarecer algo sobre la patogenia, ya que se ha demostrado que la patogenicidad severa, se asocia, casi exclusivamente, a cepas del serotipo b. Más tarde Kilian, mediante la clasificación del género en biotipos, describió una segunda división, independientemente del tipo capsular (Pittman, 1931; Kilian *et al*, 1979<sup>a</sup>).

Para la caracterización de *H. influenzae* se han sido desarrollado métodos con diferentes grados de complejidad, entre ellos, el estudio de las proteínas de membrana externa (PME) por electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE), y el tipaje electroforético, entre otros. La técnica de electroforesis del ácido desoxirribonucleico o ADN, en gel de campo pulsado (ECP), constituye actualmente, el método de elección para el estudio genético de las cepas de *H. influenzae* y resulta útil en los estudios de epidemiología molecular (Dimopoulou *et al*, 1997; Gómez de León *et al*, 2000; Dabernat *et al*, 2003; Tamargo, 2005).

El comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana es otro aspecto de interés en la caracterización de las cepas de una región geográfica determinada. Hasta 1973, no eran necesarias las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* para *H. influenzae* porque virtualmente, todos los aislamientos de importancia clínica eran sensibles a la ampicilina, fármaco de elección en ese momento para las meningitis y otras sepsis causadas por este agente. En 1968, se comenzaron a notificar fracasos del tratamiento con ampicilina en pacientes con meningitis por *H. influenzae*, los que se atribuyeron a factores no inherentes a la resistencia a la droga por parte del microorganismo. En la década del 70, aparecieron los primeros reportes de cepas de *H. influenzae* resistentes a la ampicilina con rangos que oscilaban entre el 10 y 45% (Gunn *et al*, 1974), estas cifras se han incrementado con el tiempo y se ha demostrado que varían de una región geográfica a otra (Hjaltested *et al*, 2003; Brown y Rybak, 2004).

La resistencia de *H. influenzae* b a los antimicrobianos resulta actualmente, un problema clínico y epidemiológico de dimensiones internacionales. La resistencia a la ampicilina se ha extendido ampliamente a varias partes del mundo y en algunos países alcanza hasta el 50% (Campos, 1999). También se han reportado cepas resistentes al cloranfenicol, cotrimoxazol, tetraciclina, cefalosporina y a la rifampicina (Machka *et al*, 1988). Es por esta razón que resulta obligada, la vigilancia microbiológica y el monitoreo de los patrones de resistencia, con el fin de, orientar las acciones terapéuticas a seguir y conocer si se operan cambios en las nuevas cepas de *H. influenzae* b..

La introducción de las vacunas de polisacáridos primero, las conjugadas después (Weinberg y Granoff, 1988) y mas recientemente, la vacuna conjugada de *H. influenzae* b por síntesis

química, obtenida por Vérez-Bencomo *et al*, (2004) en Cuba, y utilizada ya en el 2005 (Galindo, 2006; Comunicación Personal), indudablemente revoluciona el campo de la vaccinología abriendo nuevas perspectivas a vacunas bacterianas todavía no logradas, o logradas a alto costo, casi exclusivas para el mundo desarrollado.

No cabe duda, que nos enfrentamos a una nueva era de la epidemiología de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* en el mundo, es incuestionable que requerirá de un sistema de vigilancia en especial microbiológica, el que permita realizar un adecuado estudio y seguimiento de las cepas circulantes, antes, durante y posteriormente a las vacunaciones masivas (Dickinson y Pérez, 2005; Tamargo, 2005; SIREVA II, 2005).

En el presente trabajo, se muestran los resultados obtenidos en Cuba, con el monitoreo sistemático de la resistencia a las drogas antimicrobianas de *H. influenzae*, desde el año 1989 hasta el 2005, con el objetivo de, determinar la susceptibilidad “in vitro” de las cepas frente a las drogas de elección como tratamiento, los patrones de resistencia de las cepas de *H. influenzae* circulantes en el país, así como, el impacto del uso de la vacunación masiva con la vacuna conjugada anti *H. influenzae* desde su introducción en el país.

### **1.1. Hipótesis**

A partir de los antecedentes expuestos fue posible formular la siguiente hipótesis de trabajo:

Las cepas circulantes de *Haemophilus influenzae* asociadas a procesos invasivos en Cuba, muestran en el tiempo, variación en la susceptibilidad a los antimicrobianos utilizados. La vacunación masiva anti *Haemophilus influenzae* b impacta sobre la circulación y el comportamiento de las cepas de *Haemophilus influenzae* en general y en particular de *Haemophilus influenzae* b.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. General

Contribuir al conocimiento de la susceptibilidad a los antimicrobianos y al impacto ejercido por la aplicación de la vacuna conjugada anti *Haemophilus influenzae* b sobre las cepas circulantes en Cuba

### 1.2.2. Específicos

- Determinar la susceptibilidad de *Haemophilus influenzae* en las cepas estudiadas
- Definir la actividad de la enzima  $\beta$ -lactamasa en las cepas de *Haemophilus influenzae* resistentes a la ampicilina
- Identificar los patrones de multirresistencia en las cepas de *Haemophilus influenzae*
- Determinar el impacto producido por la vacunación anti *Haemophilus influenzae* b sobre las características de las cepas circulantes de *Haemophilus influenzae* b

## 1.3. Novedad científica

El estudio de las características de las cepas de *H. influenzae* en Cuba, en cada provincia del país durante 17 años, establece una referencia científica para el uso adecuado de las drogas recomendadas por la literatura internacional y la OMS, permitiendo la utilización de drogas de segunda y tercera generación como reserva para el tratamiento. Ha posibilitado además, el análisis del comportamiento de las cepas obtenidas en el período de los años posteriores, al inicio de la inmunización masiva con la vacuna conjugada anti *Hib* y en especial, y en el último año, con la vacuna conjugada sintética anti *Haemophilus influenzae* b obtenida en Cuba, experiencia única en el mundo.

## 1.4. Valor teórico

El estudio permitió identificar el alto nivel de resistencia a la ampicilina, la presencia de la enzima beta lactamasa y la asociación de ésta, con la resistencia, así como la no aparición, hasta el momento, de resistencia a fármacos de segunda y tercera generación. Todo ello

permite trazar la historicidad de la resistencia del microorganismo a través del tiempo en el país y de la región y compararla con lo ocurrido en otros países de las Américas.

### **1.5. Valor práctico**

Los resultados del trabajo realizado, permiten perfeccionar la vigilancia microbiológica de las cepas circulantes de *Haemophilus influenzae* y la conducta frente a la MEB por *Hib* en Cuba. El Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología del IPK, ha capacitado y perfeccionado los recursos humanos del laboratorio y de los laboratorios de microbiología del país, ha introducido la tecnología internacional, así como “el estado del arte”, y ha participado en los talleres internacionales con las evidencias basadas en los resultados obtenidos. Este trabajo forma parte de la vigilancia establecida por el MINSAP para el seguimiento de la vacunación anti *Hib* en Cuba, sobre todo, tratándose de que ésta, se realiza desde 2005 con la vacuna conjugada obtenida por síntesis química, lograda por científicos cubanos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Epidemiología de las enfermedades invasivas por *Haemophilus influenzae b*

Las infecciones invasivas por *H. influenzae b* son reconocidas como un problema de salud pública que afecta niños menores de 5 años de los países en desarrollo e industrializados. Según las estimaciones de la OMS, *H. influenzae b* es responsable de más de 350 000 muertes anuales por neumonía y de 250 000 muertes por meningitis en los niños menores de 5 años que habitan en países en desarrollo (Cochi y Ward, 1991; Dagan, 1997; Gold, 1999; Novakova *et al*, 1999; Lolekha *et al*, 2000; Debbia *et al*, 2001; Jamison *et al*, 2006).

Se recoge en la literatura que el mayor impacto recae sobre las poblaciones infantiles más pobres (Jamison *et al*, 2006; Obonyo y Lau, 2006). Las tasas de incidencias de las infecciones graves producidas por *H. influenzae* en América Latina son desconocidas en gran parte de esta región, mientras que algunas cifras disponibles de Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Cuba y Uruguay reflejan valores similares a los referidos en Estados Unidos antes de la introducción de la vacunación, y no ofrecen la realidad del resto de los países de la región, con una situación económica mucho más compleja (De Andrade *et al*, 2001; Takemura y De Andrade, 2001; DNE, 2006; Galindo, 2006; Comunicación Personal).

El principal factor predisponente a tener en cuenta, para adquirir meningitis por *H. influenzae b* es la edad. La enfermedad afecta fundamentalmente a los menores de 5 años (90% de todos los casos) y la incidencia más elevada se reporta entre los seis y los once meses de edad (Shapiro y Ward, 1991; Munson *et al*, 1999; Kurkdjian *et al*, 2000; Simarro *et al*, 2000). Otros factores de riesgo pueden ser el estado de portador y el asistir a guarderías (Moxon, 1993; Mendelman y Smith, 1999; Skoczynska *et al*, 2000). Otros factores influyen en la carga de enfermedad, y no deben despreciarse como son: los factores geográficos, los patrones estacionales, los estados nutricionales, genéticos, los viajes desde y hacia diferentes países del planeta, así como las posibles diferencias genéticas de las poblaciones que pueden incidir en el grado de severidad de la enfermedad (Lee *et al*, 2005; Jamison *et al*, 2006).

Los portadores sanos, que albergan el microorganismo en la nasofaringe, constituyen la principal fuente de infección por *H. influenzae* (Varon *et al*, 2000; Campos y Saez-Nieto, 2001; Yano, 2003; Farjo *et al*, 2004). La frecuencia de niños portadores de *H. influenzae* se incrementa en aquellos que asisten a las guarderías, o a cualquier tipo de institución cerrada, en los cuales la presencia del microorganismo en la nasofaringe puede persistir durante varios meses (Raymond *et al*, 2001; Neto *et al*, 2003; Menzies y McIntyre, 2006).

Dentro de la población general la prevalencia de portadores de *H. influenzae* b fluctúa entre el 0.4-5% en los menores de 5 años, pudiendo variar entre un 10 y 15% (CDC, 2001; Raymond *et al*, 2001; Fuentes *et al*, 2003; Dabernat *et al*, 2003; Menzies y McIntyre, 2006). La prevalencia de los portadores para los tipos capsulados a y c-f es del 1-2% (Dabernat *et al*, 2003; Fuentes *et al*, 2003). En los niños en edad pre-escolar el estado de portador de cepas de *H. influenzae* no tipables (*H. influenzae* NT) es elevada, incrementándose en aquellos, que asisten a las guarderías, en la que llega a ser entre el 50 - 80% (Sarangi *et al*, 2000; Raymond *et al*, 2001; Neto *et al*, 2003).

El *H. influenzae* b se transmite de un sujeto infectado a uno susceptible a través de las gotas de las secreciones respiratorias. Por lo general, el contagio da lugar a un período transitorio de colonización nasofaríngea de algunas semanas de duración, y sólo en una minoría de los casos se traduce en infecciones invasivas (Sarangi *et al*, 2000; Neto *et al*, 2003).

## **2.2. Patogenia de las infecciones por *H. influenzae***

La colonización de la nasofaringe precede usualmente a la infección por *H. influenzae* b. La presencia de *H. influenzae* b en la orofaringe puede dar lugar a un estado transitorio de portador asintomático, pero en ocasiones, esta colonización origina una infección sintomática localizada en las mucosas respiratorias altas (otitis media, sinusitis o rinofaringitis), y provocar posteriormente, una infección del tracto respiratorio bajo como neumonía o en el menor de los casos, una diseminación hematógica con focos secundarios distantes a la puerta de entrada y ocasionar cuadros de meningitis, epiglotitis, celulitis, pericarditis, osteoartritis y otras manifestaciones clínicas (Sánchez *et al*, 1999; Rodríguez *et al*, 2002; Leibovitz *et al*, 2004; Pereira *et al*, 2004). Básicamente dos factores, la edad y la

presencia de anticuerpos séricos o de memoria inmunológica contra el polisacárido capsular de *H. influenzae* b, influyen en que la colonización orofaríngea derive o no en una enfermedad invasiva. La edad, se relaciona en forma directa con la capacidad del sistema inmune para responder a la exposición al polisacárido de *H. influenzae* b y dar lugar a una respuesta adecuada de anticuerpos específicos a través de la activación de células B, T-independiente. Una concentración sérica mayor que 0.15 µg/mL asegura una rápida eliminación de las bacterias que pudieran traspasar la mucosa faríngea e invadir el torrente sanguíneo. La colonización por *H. influenzae* b en un niño mayor de 2 años de edad tiene altas probabilidades de actuar como estímulo inmunizante o como un refuerzo de la inmunidad pre-existente. Por el contrario, el lactante que ha perdido la inmunidad materna y cuyo sistema inmune no ha alcanzado la madurez necesaria para reconocer los antígenos polisacáridicos reúne las condiciones propicias para desarrollar las consecuencias más graves de la colonización faríngea por *H. influenzae* b (Moxon y Anderson, 1989; Shapiro y Ward, 1991; Kurkdjian *et al*, 2000; Lolekha *et al*, 2000; Rolle, 2000; Pereira *et al*, 2004; Kelly *et al*, 2005).

La meningitis es la manifestación aguda más grave de la infección sistémica por *H. influenzae* b. Es usual el antecedente de una infección del tracto respiratorio superior y es muy frecuente la presencia previa o concomitante de una otitis media (Rubin y Moxon, 1983; Shapiro y Ward, 1991; Lister, 2000; Leibovitz *et al*, 2004; Pereira *et al*, 2004); a menudo puede asociarse con antecedentes de un traumatismo craneal reciente o remoto, neurocirugía, sinusitis, otitis o un escape de LCR. Esta afección grave, la meningitis, puede cursar de forma fulminante y conducir a la muerte en pocas horas, por lo general en los niños menores de 1 año de edad (Wilfred, 1990; Gold, 1999; Kurkdjian *et al*, 2000; Yeh *et al*, 2004).

La cápsula protege al microorganismo de la fagocitosis, de la desecación y de la acción de algunas enzimas como lisozimas. Además está relacionada con la colonización de la mucosa nasal y la supervivencia de *H. influenzae* b en el torrente sanguíneo (Chang *et al*, 2000; Kurkdjian *et al*, 2000).

Un componente de patogenicidad, el LOS, al inducir la formación de Interleukina I y el Factor de Necrosis Tumoral; activa la vía alternativa del complemento, altera la

permeabilidad de la barrera hematoencefálica, provoca la activación policlonal de los linfocitos B y tiene una acción tóxica sobre los cilios del epitelio respiratorio (Flesher e Insel, 1978; Tuyau y Sims, 1983; Rubin y Moxon, 1983). Además, provoca inflamación meníngea en el modelo de meningitis por *H. influenzae* b en ratas lactantes (Moxon y Anderson, 1989; Mertsola, 1991; Weiser, 1993).

Las PME como son P2 y P5, así como las fimbrias o pili, cooperan con la colonización y la invasión a través de la nasofaringe (Van Alphen *et al*, 1983<sup>a</sup>), mientras que la síntesis de la IgA proteasa, rompe a la IgA secretora y sérica, inactivando el sistema de defensa del huésped. Este mecanismo facilita la adherencia, colonización y la subsiguiente infección de mucosas, por lo que resulta un papel importante en la patogénesis (Van Alphen, 1993; Geme y Cuther, 1996).

Han sido descritos los mecanismos de respuesta inmune más importantes del huésped, contra la infección por *H. influenzae* ellos son: 1. Factores mucosos locales que previenen la adherencia e invasión, 2. La activación de la opsonización mediada por el complemento y de otros mediadores de la inflamación, 3. La producción de anticuerpos locales (IgA) y sistémicos (IgG, IgM), 4. La estimulación de la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y, por último, 5. El papel no totalmente comprendido de la inmunidad celular (Sell y Wright, 1982; Dawson *et al*, 1999; Kurkdjian *et al*, 2000).

La interacción de los determinantes de patogenicidad de este microorganismo con los mecanismos de respuesta inmune del huésped, conduce al establecimiento de la enfermedad localizada o invasiva por *H. influenzae* (Granoff y Cates, 1985; Dawson *et al*, 1999; Choo *et al*, 2000; Peltola, 2000<sup>a</sup>).

### **2.3. Inmunidad**

Los primeros investigadores en demostrar que en los humanos existe una estrecha relación entre la edad y el riesgo de adquirir meningitis por *H. influenzae* y que la inmunidad contra esta grave afección se encontraba mediada por anticuerpos bactericidas presentes en el suero del enfermo, fueron Fothergill y Wright (1933), otros autores como McVernon *et al* (2003), en estudios realizado en el Reino Unido, en que la mayoría de los niños se encontraban vacunados contra *H. influenzae* b, estiman que el papel relativo de la

memoria inmunológica y de otros mecanismos inmunes en conferir protección, no se encuentran suficientemente explicados.

Se conoce que la concentración de anticuerpos anti-PC es alta durante los primeros 2 a 3 meses de vida, debido a la presencia de anticuerpos transplacentarios, pero decae rápidamente a partir del segundo trimestre y se mantiene baja hasta los 18-24 meses de edad (Pichichero e Insel, 1983; Weinberg y Granoff, 1988). A partir de entonces, se produce un aumento sostenido de los anticuerpos séricos anti-PC como consecuencia de la exposición natural a *H. influenzae* b, y/o, a otros gérmenes antigénicamente relacionados. El inicio de la fase de ascenso de estos anticuerpos está determinado por la maduración de los mecanismos de la inmunidad timo-independiente (necesarios para el reconocimiento de la mayoría de los antígenos polisacáridicos), fenómeno que, por lo general, ocurre entre los 18 y los 30 meses de edad (Santosham, 1993; Santosham, 2000). Así, la incidencia de enfermedad invasiva muestra una curva inversa a la de los anticuerpos anti-PC: es baja durante el primer trimestre de la vida; se incrementa de forma progresiva para alcanzar su máxima expresión durante el tercero o cuarto, y luego declina a medida que aumentan los anticuerpos séricos anti-PC (Clemans *et al*, 2001).

Entre los 3 a 5 años de edad, muchos niños no inmunizados han adquirido de manera natural anticuerpos anti-PC, los que estimulan la actividad bactericida y opsonica mediada por el complemento, así mismo, otorgan la inmunidad protectora contra la infección sistémica en el humano; sin embargo, aún no se han determinado con certeza los mecanismos responsables de la adquisición natural, relacionada con la edad, y la presencia de anticuerpos séricos anti-PC observada, en prácticamente todos los niños de esta edad (Anderson *et al*, 1987; CDC, 2001; Puliyel *et al*, 2001; McVernon *et al*, 2003; Trotter *et al*, 2003).

Asociados al riesgo de una infección invasiva por *H. influenzae* b existen otros factores, entre estos se incluyen aquellos que determinan la mayor posibilidad de exposición al agente (hacinamiento, asistencia a círculos infantiles y presencia de escolares en el hogar) y los que condicionan mayor susceptibilidad a la enfermedad (deficiencias inmunológicas congénitas o adquiridas). La exposición al humo del tabaco y otros irritantes ambientales han sido implicados en el incremento del riesgo de la colonización por *H. influenzae* b y

secundariamente al de una enfermedad invasiva (Mendelman y Smith, 1999; CDC, 2001; Millar *et al*, 2000; Skoczynska *et al*, 2000).

Se conoce que la inmunidad protectora adquirida de forma natural contra la infección por *H. influenzae* es mediada por la actividad combinada de anticuerpos dirigidos contra los antígenos capsulares y de membrana. Recientemente, se ha intentado definir el papel y la especificidad de los anticuerpos génicos contra los antígenos de membrana. La infección natural por microorganismos del serotipo b produce como resultado una respuesta de anticuerpos contra los antígenos somáticos (Ej. LOS y PME), la capacidad protectora de estos anticuerpos ha sido demostrada en infecciones experimentales (Pichichero e Insel, 1983; Anderson *et al*, 1987; Moxon y Anderson, 1989; Adegbola *et al*, 1999; Trotter *et al*, 2003).

#### **2.4. *Haemophilus influenzae*. Recuento histórico**

Robert Koch, es a quien en 1883 se atribuye la primera descripción de bacterias similares a *Haemophilus*, lo describe en un examen directo, coloreado por tinción de Gram, de un exudado conjuntival en pacientes procedentes de Egipto. En 1890, Robert Pfeiffer lo aísla por primera vez del esputo y tejido pulmonar de pacientes con neumonía y lo señala como causa de la epidemia ocurrida entre 1889-1892 y lo denomina *Pfeiffer influenza bacillus* (Pfeiffer, 1893). Durante la pandemia de gripe entre 1918-1919 se asoció a ella, quizás basados en el hallazgo como invasor secundario en los casos clínicos y necropsias de pulmón de fallecidos.

En 1920, la Sociedad Americana de Bacteriología, cambió su nombre por el de *Haemophilus influenzae*; *Haemophilus* que significa “amigo de la sangre” pues requiere para su crecimiento *in vitro* de los factores X y V ambos presentes en la sangre y el término *influenzae* por su histórica asociación con la influenza (Winslow *et al*, 1920). En 1933, Smith y colaboradores establecieron que la gripe era causada por un virus y finalmente se rechazó cualquier asociación entre *H. influenzae* y el síndrome gripal (Smith *et al*, 1933; Smith-Vaughan *et al*, 1998).

## 2.5. Taxonomía

Atendiendo a la novena edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Garrity *et al*, 2004), presenta la siguiente posición taxonómica:

<b>Reino</b>	Procarionte
<b>División</b>	Bacteria
<b>Sección V</b>	Bacilos Gram negativos anaerobios facultativos
<b>Orden</b>	Eubacteriales
<b>Familia</b>	<i>Pasteurellaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Haemophilus</i>
<b>Especie</b>	<i>influenzae</i>

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

Las especies que están asociadas con infecciones humanas son: *H. 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* (Campos, 1999).

## 2.6. *Haemophilus influenzae*. Algunas características biológicas relevantes

La biología de la especie tipo del género, *H. influenzae* resulta interesante. *H. influenzae*, es un patógeno exclusivo del hombre, son bacilos o cocobacilos Gram negativos, por lo general son cortos, menores de 1µm de ancho y 0.5-2 µm de longitud, en ocasiones pueden formar hilos largos y filamentos con marcado pleomorfismo formando en ocasiones cadenas pequeñas. Son inmóviles, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos. El crecimiento óptimo se alcanza de 18 a 24 horas a una temperatura entre los 35-36 °C,

un pH de 7.4-7.8 y en atmósfera húmeda con concentraciones de CO<sub>2</sub> entre 5-10% (Dajani *et al*, 1979; Mendelman y Smith, 1999).

Se destaca su capacidad metabólica de fermentar una serie de carbohidratos como: glucosa, sacarosa y xilosa, obteniéndose como productos finales: ácidos láctico, succínico y acético; no produce gas, produce ureasa y triptofanasa. Son microorganismos quimiorganotróficos, reducen los nitratos a nitritos y la mayoría de los aislamientos son oxidasa y catalasa positivos (Leidy *et al*, 1960; Peter, 1994).

### **2.6.1. Características de Crecimiento.**

*H. influenzae* se considera un germen “fastidioso” al requerir los factores de crecimiento V y X. El factor V, reemplazable por el dinucleótido de nicotinamida (NAD) o por el NAD fosfato (NADP) constituye una coenzima termolábil de la piridina, una de las principales enzimas de óxido reducción del metabolismo celular. El factor X, que es termoestable y es proporcionado por diversos pigmentos que contienen hierro como la hematina, la bacteria lo utiliza en la síntesis de catalasas, peroxidases y en el sistema de transporte de electrones en los citocromos. El factor V puede ser biosintetizado por levaduras, bacterias, tejidos animales y vegetales (Evans *et al*, 1974; Campos y Sáez-Nieto, 2001). Ambos factores, se hallan en células sanguíneas, incluyendo los eritrocitos de carnero, que son los más utilizados en las fórmulas de agar sangre, medio empleado de rutina en los laboratorios de microbiología. El calentamiento suave al agregar la sangre a una base de agar licuado, provoca la lisis de los eritrocitos y con ello la liberación de los factores X y V, con este proceder también se eliminan enzimas que hidrolizan e inactivan lentamente al factor V. Otros factores nutricionales que estimulan el crecimiento de *H. influenzae* son: el ácido pantotéico, la tiamina, el uracilo, la purina y la cisteína (Leidy *et al*, 1960; Evans *et al*, 1974; Campos, 1999; Perilla *et al*, 2003).

## **2.7. *Haemophilus influenzae*. Factores de virulencia**

### **2.7.1. La Cápsula: Estructura y composición antigénica**

*H. influenzae* puede ser capsulado o no. Las cepas capsuladas causan la mayoría de las infecciones invasivas ocasionadas por este agente y son raramente aisladas de infecciones

respiratorias o en los portadores (Gold, 1999; Devarajan, 2001; Preston, 2003). Las cepas no capsuladas suelen ser parte de la microbiota normal de la nasofaringe de los individuos sanos y se aíslan frecuentemente en las infecciones de la mucosa del tracto respiratorio (Moxon, 1993; Talon *et al*, 2000; Dabernat *et al*, 2003; Fuentes *et al*, 2003). La cápsula, constituye la envoltura más superficial de este microorganismo, es uno de los componentes más estudiados, se le considera el determinante de patogenicidad más importante e induce la formación de anticuerpos específicos (Geme y Cuther, 1996). La cápsula está compuesta por un polisacárido (PC) y su estructura le confiere la especificidad serológica de tipo, constituyendo la base para la agrupación de 6 serotipos diferentes: a, b, c, d, e y f (Pittman, 1931). El tipo b es el más común entre las cepas aisladas de casos con infecciones invasivas, constituyendo aproximadamente el 95% de todos los aislamientos clínicos tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo (Wilfred, 1990; Perdue *et al*, 2000; Skoczynska *et al*, 2000; Devarajan, 2001; Tamargo, 2005). El PC de las cepas del tipo b está constituido por un polímero lineal que contiene como unidad monomérica al polirribosil-ribitol-fosfato (PRP), a diferencia de las cepas de los otros serotipos cuyo polisacárido capsular contiene como constituyente básico una hexosa, algunas hexosaminas y/o un grupo fosfato. Estos componentes capsulares confieren la especificidad inmunitaria diferencial de los serotipos, propiedad de gran utilidad para identificar, sobre todo, al serotipo b, el más aislado en infecciones invasivas graves, y diferenciarlo de los demás serotipos con antisueros capsulares específicos (Pittman, 1931).

Las propiedades antifagocíticas de la cápsula, le confieren al microorganismo la capacidad de que pueda permanecer mayor tiempo en los epitelios mucosos y una mayor protección contra la lisis por anticuerpos independientes del complemento, lo que le otorga a la bacteria mayor posibilidad de sobrevivir en la circulación sanguínea (Wood, 1960; Tuyau y Sims, 1983; Zwahlen *et al*, 1983; Geme y Cuther, 1996).

### **2.7.2. Las Proteínas de la Membrana Externa (PME)**

Las proteínas de la membrana externa (PME) son componentes químicos estructurales de la envoltura celular. La gran mayoría de estas proteínas no tienen funciones bien definidas, algunas pueden actuar como adhesinas y otras simplemente cumplen funciones de porinas (Turk, 1984).

El subtipaje basado en el análisis de la migración de las PME en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio ha sido utilizado como un método útil, discriminatorio para estudios epidemiológicos. En *H. influenzae* b se han descrito aproximadamente 15 PME. Dentro de las principales proteínas mayoritarias se encuentran la P1 o “a” (46 kd); P2 o “b/c” (39-40kd); P5 (37-39 kd); P4 o “d” (34 kd); “e” (28kd); “f” (20 kd); P6 o “g” (15 kd) y la proteína con peso molecular de 98 kd, las cuales han sido blanco de anticuerpos bactericidas mediados por el complemento (Turk, 1984; Gómez de León *et al*, 1991). La proteína que se encuentra en mayor concentración (más del 50%), tanto en cepas del serotipo b, como en las no tipables es la denominada P2 (b/c) (Hiltke *et al*, 2002).

Parece que las PME P2, así como la P5, muestran tener relación con la expresión de la virulencia de esta bacteria (Hiltke *et al*, 2003), relacionadas de importante manera con la adherencia del microorganismo a la superficie mucosa, como factor que propicia la colonización. También estas proteínas se han asociado a fenómenos de invasividad y con la resistencia que presentan algunos microorganismos al efecto bactericida del suero humano normal (Van Alphen *et al*, 1983<sup>a</sup>; Kimura *et al*, 1985; Munson, 1990).

### 2.7.3. Fimbrias filamentosas (pili)

Las fimbrias o pili, son estructuras filamentosas de naturaleza proteica que miden aproximadamente 5 nm de ancho y más de 450 nm de largo, están formadas por múltiples subunidades proteicas llamadas pilinas. Ellas se encuentran en la membrana externa de *H. influenzae* (Clemans *et al*, 2001) y se extienden a la superficie. Estudios *in vitro* indican que *H. influenzae* es capaz de expresar dos estructuras adhesinas filamentosas, morfológicamente distintas (Van Alphen *et al*, 1983<sup>b</sup>; Gómez de León *et al*, 1991) y que el principal epitope en los pili de *H. influenzae* es altamente conformacional e inmunológicamente heterogéneo (Pichichero *et al*, 1982; Geme y Cuther, 1996; Gilford *et al*, 1997).

Las fimbrias han sido consideradas como mediadores de la adherencia a las células epiteliales bucales humanas *in vitro*, observándose que están asociados con la capacidad para aglutinar eritrocitos humanos, hecho por el cual, se les ha denominado *Pili hemaglutinantes* (Pichichero e Insel, 1983; Gilford *et al*, 1997). Tomando como base esta

propiedad, han sido identificados 14 grupos serológicos de pilis hemaglutinantes, otorgándoles, algunos autores, propiedades como posibles candidatos vacunales (Brinton *et al* 1989; Forney *et al*, 1992).

#### **2.7.4. Proteasa IgA1**

La enzima proteasa IgA1, ha sido encontrada en cepas en las membranas mucosas, ellas según Liu (1992) pueden llegar a hidrolizar las moléculas de inmunoglobulina A secretora (IgA). Han sido reportados pocos informes acerca de la producción de anticuerpos de tipo secretor “IgA1” con especificidad hacia la cápsula de *H. influenzae* a nivel de la mucosa respiratoria (Male, 1979; Grundy *et al*, 1990; Liu, 1992) y no está esclarecido, el papel de la inmunidad contra el microorganismo en este sitio, no obstante, resulta importante tomar en cuenta el potencial que tiene esta enzima, como un determinante de virulencia adicional en la génesis de la enfermedad (Kilian *et al*, 1979<sup>b</sup>).

#### **2.7.5. Lipooligosacárido (LOS)**

El lipooligosacárido (LOS) es un componente estructural de la membrana externa celular y contribuye de manera importante a la patogenicidad de este microorganismo (Weiser, 1993). Se ha dividido en tres regiones para su estudio: lípido A, núcleo y antígeno O. El lípido A, constituye la parte tóxica de la molécula, responsable de la actividad proinflamatoria durante el desarrollo del proceso infeccioso. El antígeno O, contiene unidades repetitivas del azúcar responsable de la diversidad antigénica observada dentro del serotipo b (Mertsola, 1991; Liu, 1992). A pesar de que existe diversidad genética entre el LOS de diversas cepas de *H. influenzae* b con respecto a su composición de azúcares, movilidad electroforética en SDS-PAGE y propiedades antigénicas con sueros hiperinmunes obtenidos en animales, ninguno de estos métodos ha demostrado ser lo suficientemente discriminatorio como marcador epidemiológico (Flesher e Insel, 1978; Van Alphen *et al*, 1983<sup>a</sup>; Liu, 1992; Van Alphen, 1993).

### **2.8. Diagnóstico microbiológico de *H. influenzae* b**

Para el diagnóstico de *H. influenzae* b pueden variar los productos patológicos utilizados en dependencia del proceso infeccioso, no obstante, en el caso de las infecciones invasivas,

son muy útiles las muestras de sangre, líquido céfalo raquídeo (LCR), líquido articular, líquido pleural y la orina, entre otras (Campos y Sáez-Nieto, 2001; Rodríguez *et al*, 2002; Perilla *et al*, 2003).

### **2.8.1. Examen microscópico**

La tinción de Gram resulta de gran utilidad cuando se efectúa a partir de muestras obtenidas de sitios normalmente estériles, y permite observar las características morfológicas aunque no constituye un método confirmatorio de diagnóstico (Campos y Sáez-Nieto, 2001; Devarajan, 2001; Perilla *et al*, 2003).

### **2.8.2. Diagnóstico rápido**

Diferentes sistemas para el diagnóstico rápido de *H. influenzae* b han sido desarrollados, a partir directamente de las muestras clínicas. Los métodos utilizados varían desde algunos relativamente simples como la aglutinación de látex o coaglutinación hasta otros más complejos como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) (Ueyama *et al*, 1995; Rodríguez *et al*, 2002; Singhi SC *et al*, 2002; Zasada y Paciorek, 2003; Fohlman *et al*, 2004).

### **2.8.3. Cultivo**

El aislamiento de cepas de *H. influenzae* directamente de muestras clínicas, puede obtenerse preferiblemente, en medios que contienen eritrocitos lisados de carnero o conejo (agar-chocolate) elaborados con Base de Columbia o GC enriquecido con Isovitalex u otros suplementos que contengan los factores X y V. Las colonias son de color gris, circulares, con un tamaño de 0.5-0.8 mm de diámetro durante las primeras 24 horas de desarrollo el cual llega a 1-1.5 mm a las 48 horas. La temperatura óptima de crecimiento es de 35-36 °C y debe procurarse una atmósfera de CO<sub>2</sub> entre un 5-10% (Evans *et al*, 1974; Jorgensen *et al*, 1987; Campos y Sáez-Nieto, 2001; Perilla *et al*, 2003). La adición de bacitracina al medio de cultivo crea condiciones selectivas para el desarrollo de *H. influenzae* en el caso de ser aislado de los exudados nasofaríngeos o en aquellas muestras que normalmente no son estériles (Fuentes *et al*, 2003).

*H. influenzae* en el laboratorio se identifica mediante la comprobación de las características morfológicas y culturales, así como la determinación de los requerimientos de los factores X y V (Campos y Sáenz-Nieto, 2001; Perilla *et al*, 2003). La técnica de la estría estafilocócica en agar sangre, se utiliza para recuperar especies de *H. influenzae* a partir de muestras clínicas y sigue siendo igualmente utilizada como una prueba de identificación presuntiva útil para los miembros de esta especie. *H. influenzae* crecen como colonias diminutas satélites (satelitismo) y de forma parecida a las gotas de rocío, dentro de la zona hemolítica de una estría estafilocócica en agar sangre de carnero; ya que los eritrocitos lisados en el agar que rodea la estría de *Staphylococcus aureus* proporcionan el factor X, y las propias células estafilocócicas excretan gran cantidad de factor V durante la fase exponencial de crecimiento (Kilian *et al*, 1979<sup>a</sup>; Evans *et al*, 1974; Campos y Sáenz-Nieto, 2001).

## **2.9. *Haemophilus influenzae*. Caracterización microbiológica**

### **2.9.1. Serotipificación**

Para la clasificación de cepas capsuladas son utilizados los antisueros específicos, obtenidos a partir de los antígenos capsulares que son serológicamente específicos.

Se les denomina *H. influenzae* NT a los aislamientos que no poseen cápsulas. La cápsula puede perderse en los subcultivos y esta estructura se deteriora en los cultivos viejos; por lo tanto es necesario realizar la serotipificación a partir de siembras frescas con menos de 24 horas de incubación y lo más pronto posible a partir del aislamiento primario (Pittman, 1931; Campos y Sáenz-Nieto, 2001; Bokermann *et al*, 2003).

La serotipificación puede realizarse por aglutinación en lámina, hinchamiento capsular (reacción de Quellung), coaglutinación y contrainmuno-electroforesis. La técnica más simple, rápida y económica para serotipificar los aislamientos es la aglutinación en láminas portaobjeto (Campos y Sáenz-Nieto, 2001; Bokermann *et al*, 2003).

La serotipificación por aglutinación en lámina, es el método recomendado para la identificación del tipo capsular en los aislamientos de *H. influenzae*, pero algunas cepas aisladas de procesos invasivos, no son reconocidas como tipo b por este método; y se

sugiere que pueden ser variantes de cepas de *H. influenzae* b, ya que genéticamente tienen la capacidad de sintetizar PC pero no lo expresan, haciendo imposible su detección por los métodos convencionales. Cuando esto sucede y teniendo en cuenta la evolución del estado del arte en tal sentido se recomienda utilizar métodos moleculares. La técnica de RCP resulta un método rápido y confiable para confirmar el tipo capsular de *H. influenzae* (Falla *et al*, 1994; Jordens y Slack, 1995; Ishiwada *et al*, 2004).

Utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del gen necesario para la expresión de la cápsula, en el caso del tipo b (*bexA*) se pueden diferenciar las cepas mutantes del tipo b ( $b^-$ ) de las de *H. influenzae* NT (Falla *et al*, 1994; Jordens y Slack, 1995). El locus *capB*, usualmente duplicado en las cepas de *H. influenzae*, puede sufrir espontáneamente eventos de recombinación, que dan como resultado una sola copia de los genes *cap* y la pérdida del gen necesario para la expresión de la cápsula del tipo b (*bexA*) (Hobson *et al*, 1995). Estas cepas que no expresan cápsula del tipo ( $b^-$ ) son indistinguibles de las cepas de *H. influenzae* NT por el método de aglutinación en lámina, sin embargo, al emplear la RCP para amplificar los genes que codifican para la cápsula, se obtiene un producto claramente visible con los cebadores específicos para el tipo b, pero no se observan productos de amplificación con los cebadores generales para determinar el tipo capsular (Falla *et al*, 1994; Hobson *et al*, 1995).

### 2.9.2. Biotipificación

En 1979, se desarrolló un sistema de identificación que permite la subdivisión de *H. influenzae* en base a tres reacciones bioquímicas: producción de indol, actividad de la ureasa y descarboxilación de la ornitina (Kilian *et al*, 1979<sup>a</sup>). En 1994, Gratten describió un nuevo biotipo, denominándolo VII, y Sottnek y Albritton describieron al biotipo VIII (Gratten *et al*, 1994).

Existen diferencias descritas entre los aislamientos de *H. influenzae* implicados en procesos severos de los que colonizan las vías respiratorias. Los primeros, además de poseer una cápsula serotipo b, son bioquímicamente diferentes a los que se encuentran formando parte de la microbiota del tracto respiratorio (Oberhofer y Back, 1993; Sharma *et al*, 2002; Begun *et al*, 2003), predominando las cepas de los biotipos I y II. Los biotipos III y IV, se

encuentran con mayor frecuencia en cepas de *H. influenzae* NT aisladas de exudados conjuntivales y de esputo, mientras que el biotipo IV, ha sido documentado como un patógeno importante de infecciones obstétricas, ginecológicas y neonatales por cepas de *H. influenzae* NT (Oberhofer y Back, 1993). En los portadores nasofaríngeos pueden ser encontrados los 8 biotipos descritos (Raymond *et al*, 2001; Fuentes *et al*, 2003).

A continuación se muestra el esquema de biotipificación de *H. influenzae*.

### Biotipificación de *Haemophilus influenzae*

Biotipos	Producción de:		
	Indol	Ureasa	Ornitina
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
Van	-	-	+
VII	+	-	-
VIII	-	-	-

Fuente: MOP, 2005; LNRM, 2005.

### 2.9.3. Subtipificación

Las cepas de *H. influenzae* pueden agruparse utilizando técnicas de SDS-PAGE. Se han descrito hasta 21 subtipos proteicos diferentes circulantes en Estados Unidos (Barenkamp *et al*, 1981; Granoff y Ward, 1984), mientras que trabajos realizados en Europa (Van Alphen *et al*, 1983<sup>a</sup>) han diferenciado 6 subtipos en cepas invasivas. Se deduce que los diferentes estudios sobre la utilización de las PME como marcadores microbiológicos son de poca utilidad en los estudios epidemiológicos por abarcar un número limitado de subtipos.

### 2.9.4. Electroforesis en Campo Pulsado (ECP)

La ECP consiste en la lisis *in vitro* de microorganismos embebidos en agarosa y la digestión de su ADN con endonucleasas de restricción de baja frecuencia de corte. En un

gel de agarosa previamente elaborado, se insertan pequeños bloques de agarosa conteniendo el ADN cromosomal fraccionado y mediante la utilización de una cámara de electroforesis octogonal, se aplica corriente eléctrica en pulsos alternos de acuerdo al diseño de fabricación. Como resultado, se obtienen los patrones de bandas de restricción los cuales se comparan con patrones de pesos moleculares (PM) conocidos (Schwartz y Cantor, 1984).

Para los estudios del ADN cromosomal de *H. influenzae*, la enzima SmaI resulta útil reportándose la existencia de 10 a 12 sitios de reconocimiento de ella, la cual genera fragmentos con tallas de 10 a 500 kilobases (Curran *et al*, 1994; Tenover *et al*, 1995).

La ECP ha sido recomendada por diferentes grupos de investigadores como una herramienta útil en los estudios epidemiológicos de diferentes agentes bacterianos (Fujita *et al*, 1995; Tsen *et al*, 1999; Yano *et al*, 2000; Popovic *et al*, 2001; Ben-Hamouda *et al*, 2003). Actualmente, es la técnica más comúnmente utilizada para los estudios de epidemiología molecular de *H. influenzae* y es capaz de establecer diferencias entre las cepas (Wang *et al*, 2001; Omikunle *et al*, 2002; O'Neill *et al*, 2003). Mediante el empleo de la ECP se ha confirmado que el serotipo b constituye una población genéticamente homogénea y altamente conservada (Campos, 1999; Gold, 1999), mientras que las cepas no capsuladas, engloban un grupo de agentes muy heterogéneos y difíciles de agrupar (Cerquetti *et al*, 2000; Gómez de León *et al*, 2000; Yano *et al*, 2000; Pettigrew *et al*, 2002).

### **2.10. *Haemophilus influenzae*. Resistencia a los antimicrobianos**

Cuando existe fracaso del tratamiento de una enfermedad infecciosa con un antimicrobiano al que hasta ese momento resultaba sensible el microorganismo sospechado o confirmado por el laboratorio, se identifica como resistencia del microorganismo (WHO, 2000).

Virtualmente, y hasta 1973, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* para *H. influenzae* no eran necesarias, porque todos los aislamientos de importancia clínica resultaban sensibles a la ampicilina, fármaco de elección hasta entonces para tratar la meningitis y la sepsis causadas por este agente. En 1968, se informaron fracasos de tratamiento con ampicilina en pacientes con meningitis por *H. influenzae*, los que se atribuyeron a otros factores y no a la resistencia por parte del microorganismo. En 1972,

Mathies describe por primera vez cepas  $\beta$ -lactamasa positiva, mientras que en 1974, se detectan rangos de cepas resistentes a la ampicilina entre el 10-45% (Mathies, 1972). En general, los reportes de resistencia en *H. influenzae* se han incrementado con el tiempo y se han encontrado variaciones geográficas en relación a las tasas de resistencia existente, detectándose valores elevados en algunos países (Valdivia *et al*, 1995; Llop *et al*, 1999; De Andrade *et al*, 2001; Stratchunski *et al*, 2001; Jones *et al*, 2002).

La resistencia de *H. influenzae* a los antimicrobianos es un problema clínico y epidemiológico que alcanza actualmente, dimensiones internacionales. La resistencia a la ampicilina se ha difundido ampliamente en varias partes del mundo (Machka *et al*, 1988; Rey y Farhat, 1997; Klugman y Madhi, 1999; Marco *et al*, 2001). Mientras que la resistencia al cloranfenicol, que fue descrita a finales de 1977 para cepas NT de *H. influenzae*, después se reconoció en el serotipo b, y a pesar de que al comienzo se comprobó de manera esporádica (0.5% en EUA), la prevalencia en otros países se incrementó (Klugman y Madhi, 1999; Llop, *et al*, 1999; Zhanel *et al*, 2000; Marco *et al*, 2001).

Se ha reportado resistencia a otros antimicrobianos como el cotrimoxazol, las tetraciclinas, las cefalosporinas y a la rifampicina (Llop *et al*, 1999; Zhanel *et al*, 2000; Turnak *et al*, 2001; Arendrup *et al*, 2001; Jones *et al*, 2002; Tamargo, 2005). Mientras que, el hallazgo de cepas multirresistentes es un grave problema a tener en cuenta (Campos *et al*, 1984; Amarnath *et al*, 1992; Tamargo, 2005). Todo ello obliga a perfeccionar la vigilancia microbiológica y el monitoreo de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana en cada región, con vistas a contribuir a mejorar las acciones terapéuticas (Llop *et al*, 1999; Campos, 2001; Tamargo 2005).

### **2.10.1. Mecanismos de Resistencia**

La flora que habita el cuerpo humano es versátil y puede cambiar bajo determinadas circunstancias y factores, asociados o no al hombre. Ella se constituye en el reservorio de un gran número de agentes bacterianos cuyo rango incluye todo tipo de bacterias Gram negativas y Gram positivas, hasta gérmenes anaerobios e incluso microorganismos aeróbicos desprovistos de pared celular (Ferguson, 2004).

El hombre es un ser rodeado o habitado por microorganismos por todas partes y esa población de la microflora bacteriana no es estática. Ella cambia en base a la edad, el estado hormonal, la dieta y el estado de salud de un individuo. De forma adicional, diariamente se ingieren o inhalan nuevos y diferentes microorganismos. El número exacto de especies puede variar a través del tiempo en un mismo individuo (Roberts, 1996).

La flora, provee una excelente oportunidad para la transferencia de genes de resistencia. La flora del cuerpo humano, actúa como un reservorio para los mecanismos de resistencia (Del Campo *et al*, 2003; Shimada *et al*, 2003) contribuye como tal, a mantener las cepas resistentes, por el uso profiláctico de antibacterianos previo a procedimientos quirúrgicos, tratamientos de abscesos orales o enfermedades periodontales entre otras, (Ferguson, 2004).

La primera  $\beta$ -lactamasa reportada en una bacteria comensal del tracto respiratorio superior fue la enzima TEM-1, hallada en una cepa de *H. influenzae* en la década de los 70, la que había sido descrita por primera vez en *Escherichia coli*. La enzima TEM-1, es el principal mecanismo de resistencia de cepas de *H. influenzae* resistentes a la ampicilina, ha sido encontrada en cepas de *H. parainfluenzae* y *H. parahaemolyticus* y está usualmente asociada con plásmidos conjugativos mayores, específicos del género *Haemophilus* (Leaves *et al*, 2000), los cuales a su vez, pueden portar resistencia al cloranfenicol, los aminoglucósidos y a las tetraciclinas (Campos *et al*, 1984). Más de 190  $\beta$ -lactamasas han sido identificadas en bacterias Gram positivas y Gram negativas de la orofaringe (Roberts, 1996; Ferguson, 2004).

El mecanismo por el cual actúan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, es bloqueando la síntesis de la pared celular bacteriana; por lo que se obtiene un efecto bacteriostático y más tarde bactericida. Su excelente efecto antimicrobiano se ve limitado por la existencia de  $\beta$ -lactamasas producidas por una gran variedad de microorganismos, entre los cuales se cuenta *H. influenzae*. Estas enzimas rompen eficientemente el anillo  $\beta$ -lactámico con la producción de ácido penicilínico, causando muchos de los fracasos terapéuticos con el uso de las penicilinas, ampicilinas y cefalosporinas (Thornsberry, 1985). La resistencia a drogas  $\beta$ -lactámicas puede ser codificada genéticamente en el cromosoma bacteriano o bien por plásmidos; en este caso, se permite la transferencia de la resistencia entre bacterias de la

misma especie y aún entre bacterias de diferentes géneros y especies (Ponte *et al*, 1999; Miyazaki *et al*, 2001; Del Campo *et al*, 2003).

La enzima ROB es otra enzima  $\beta$ -lactamasa, ha sido descrita en *H. influenzae* asociada a un pequeño plásmido, idéntico virtualmente a uno detectado en patógenos bacterianos tales como especies de *Actinobacillus* y *Pasteurella* (Juteau y Levesque, 1990; Roberts, 1996).

La explicación de la resistencia no enzimática a la penicilina en bacterias naturalmente transformables (*Haemophilus*, *Neisseria*, *Streptococcus*), puede ser debida a la sustitución de una parte de los genes que codifican para las proteínas fijadoras de la penicilina (PFP), sitio de unión de la penicilina con la región correspondiente de la bacteria (Dawson *et al*, 1999). Este mecanismo es menos común que la resistencia causada por la producción de  $\beta$ -lactamasa.

El mecanismo de resistencia al cloranfenicol de *H. influenzae* está mediado por plásmidos que codifican la producción de la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (CAT); esta enzima cataliza la transferencia de los grupos acetilo a partir de acetil coenzima A, a sitios activos en la molécula del cloranfenicol, impidiendo que el antimicrobiano inhiba a la síntesis de proteínas bacterianas, que es su función normal. También se ha descrito como otro posible mecanismo, presente en cepas *H. influenzae* NT, la disminución en la permeabilidad de la membrana externa por pérdida de porinas (Forney *et al*, 1992).

La resistencia a la tetraciclina ha sido descrita por 18 determinantes de resistencia que resumen dos mecanismos de resistencia: eflujo y protección ribosomal. La distribución de los diferentes determinantes *tet* varían en la transferencia que ocurre de un particular determinante *tet* entre varios aislamientos y géneros (Roberts, 1996).

La responsable de la resistencia al trimetoprim es una enzima hidrofolato reductasa, la cual está codificada por genes móviles integrados en el cromosoma, también puede ser mediada por plásmidos que codifican para la producción de enzimas farmacorresistentes, como la dihidropteroato sintetasa, que pueden determinar menor permeabilidad de la célula bacteriana a este fármaco (Campos *et al*, 1984; Levy *et al*, 1993).

## **2.11. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos *in vitro***

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* son aquellos métodos de laboratorio que permiten estudiar la sensibilidad de un microorganismo frente a la acción de los antimicrobianos. El término sensible es usado como sinónimo de susceptible y significa que un microorganismo es inhibido o muerto en las pruebas *in vitro*, por una concentración dada del antimicrobiano circulante en la sangre, cuando el mismo se utiliza *in vivo* (OPS, 1998).

Esta prueba puede ser de tipo cualitativo, si el resultado expresa la característica de la sensibilidad o resistencia de un microorganismo frente a un antimicrobiano; o de tipo cuantitativo, si permite obtener una información gradual, cuantificable de esa susceptibilidad (OPS, 1998).

### **2.11.1. Prueba Cualitativa**

#### **Método por difusión en agar**

El método de Kirby-Bauer para antibiogramas, utiliza un medio de cultivo sólido en placas de Petri y discos de papel impregnados con el antimicrobiano a una concentración estandarizada. Si el microorganismo en estudio es sensible a la acción del antimicrobiano, se formará un halo de inhibición (sector que bordea al disco sin crecimiento microbiano alrededor del mismo), luego de haber incubado las placas a la temperatura y el tiempo adecuados (OPS, 1998; Perilla *et al*, 2003)

La prueba estándar de Kirby-Bauer puede aplicarse a microorganismos exigentes o de los llamados “fastidiosos” como los *Haemophilus*, añadiendo factores de crecimiento al agar *Haemophilus* Test Medium (HTM) y se conoce como Kirby- Bauer modificado (Jorgensen *et al*, 1990).

El método de Kirby-Bauer para antibiograma, es el más utilizado en los laboratorios de microbiología por su sencillez, rapidez de ejecución, economía y reproducibilidad en condiciones estandarizadas (Jorgensen *et al*, 1991).

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se siguen de acuerdo a las indicaciones revisadas y publicadas cada dos años por el National Committee for Clinical Laboratory Standards

(NCCLS) de los Estados Unidos para una serie de microorganismos. En cada publicación se analizan nuevas modificaciones por lo que es necesario que los diferentes laboratorios se encuentren actualizados en este tema (OPS, 1998; NCCLS, 2002).

## **2.12. Pruebas cuantitativas. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)**

### **2.12.1. Método por Dilución**

La concentración mínima inhibitoria (CIM), es un método utilizado para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano frente a un microorganismo aislado, la cual se expresa en la concentración del antibiótico en microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/mL}$ ). La CIM, representa la menor concentración del antimicrobiano capaz de producir inhibición total del crecimiento bacteriano (OPS, 1998). La determinación de la CIM se puede realizar por la técnica de dilución en caldo, dilución en agar y la prueba de Epsilon o E-test (Jorgensen *et al*, 1990; Jorgensen *et al*, 1991; Ohkusu *et al*, 2000; Perilla *et al*, 2003).

#### **2.12.1.1. Dilución en Agar**

Las diluciones del antimicrobiano, se agregan al agar fundido a una temperatura de 50°C. Se mezclan adecuadamente y se vierten sobre las placas de Petri. Una vez solidificado el agar, se pueden guardar a 4 °C durante un tiempo que no supere los 7 días, para evitar la pérdida de actividad del antimicrobiano (MOP, 2005).

Para llevar a cabo esta determinación, las placas se inoculan con el aislamiento bacteriano a ensayar y se incuban a 36-37 °C durante 18-24 horas (NCCLS, 2000; NCCLS, 2002).

#### **2.12.1.2. Dilución en Caldo**

El método de dilución también puede realizarse en medio líquido (caldo). Existen dos formas para llevar a cabo esta técnica: la dilución en tubo (macrodilución), que utiliza volúmenes mayores de 1 mL y la dilución en placas de 96 pocillos o microdilución que trabaja con volúmenes entre 50-100  $\mu\text{L}$ . El método de dilución en caldo, se considera como

el más reproducible y económico en el caso de *H. influenzae* (NCCLS, 2000; NCCLS, 2002; MOP, 2005).

### **2.12.1.3. Prueba de Epsilon o E-test**

La prueba de Epsilon o E-test, es un método desarrollado para determinar la CIM en  $\mu\text{g/mL}$  de los agentes antimicrobianos individuales en medio con agar. El método consiste en una tira de nitrocelulosa, inerte y delgada, impregnada con un gradiente de concentración continuo, predefinido y estabilizado del antimicrobiano a probar, que es colocada en una placa de agar que porta un inóculo estandarizado de la bacteria a investigar (Jorgensen *et al*, 1991; Ohkusu *et al*, 2000).

Las placas deben ser incubadas en condiciones apropiadas (atmósfera, temperatura) durante el tiempo necesario, observándose, las concentraciones inhibitorias, como una zona elíptica de inhibición del crecimiento. La intersección entre el valor impreso en el borde de la tira y la zona de inhibición es lo que se corresponde a la CIM (Jorgensen *et al*, 1991; Ohkusu *et al*, 2000).

### **2.13. Tratamiento de las infecciones invasivas ocasionadas por *Haemophilus influenzae***

La ampicilina conjuntamente administrada con cloranfenicol, constituyeron los fármacos de elección durante mucho tiempo para el tratamiento inicial de la enfermedad invasiva por *H. influenzae*. El primero de estos antimicrobianos, la ampicilina, ya ha sido descartado por la aparición frecuente de cepas de *H. influenzae* que producen  $\beta$ -lactamasa y muestran resistencia creciente a la ampicilina (Seaton *et al*, 2000; Dabernat *et al*, 2002).

Siguiendo las recomendaciones de clínicos y pediatras de numerosos países, se han establecido pautas a seguir en el caso de las MEB las cuales plantean el uso de las cefalosporinas de tercera generación y una prolongación del tratamiento durante una a dos semanas (Kurkdjian *et al*, 2000; Devarajan, 2001).

Para la correcta elección del antimicrobiano a utilizar debe tenerse en cuenta los patrones de resistencia del microorganismo en una localidad ante los diferentes antimicrobianos, la

forma clínica de presentación y la gravedad de la misma, el estado inmunológico, la edad así como los datos epidemiológicos tales como: asistencia a círculos infantiles, contactos con familiares enfermos y la exposición en epidemias (Ponte *et al*, 1999; Lolekha *et al*, 2000; Ferguson, 2004).

#### **2.14. Quimioprofilaxis**

En los contactos de pacientes con infección por *H. influenzae* b el riesgo de enfermedad secundaria es mayor del habitual. Por lo que se recomienda que todos los miembros de la familia (niños y adultos) donde exista un contacto menor de 4 años de edad, deban recibir profilaxis con rifampicina oral, ello no es aplicable cuando los contactos menores de 4 años de edad han sido completamente inmunizados con una vacuna conjugada. Se recomienda que los niños menores de 12 años deban ser tratados con rifampicina en una dosis de 20 mg/kg, una vez al día durante 4 días (Granoff y Ward, 1984; Peltola, 2000<sup>b</sup>; Santosham, 2000).

Es necesario considerar la profilaxis con rifampicina a los contactos en las guarderías o círculos infantiles; cada decisión debe ser individualizada y tomando en cuenta los antecedentes de la vacunación de estos contactos, el tamaño de la guardería, la intensidad del contacto y la posibilidad de que la exposición se haya producido frente a uno o múltiples casos (Sell y Wright, 1982; Cochi y Ward, 1991; Shapiro y Ward, 1991).

#### **2.15. Inmunogenicidad y eficacia de las vacunas conjugadas contra *H. influenzae* b**

La primera generación de vacunas contra *H. influenzae* b, consistente en PRP, demostró ser muy inmunogénica en niños mayores de 2 años, pero no logró proteger a los lactantes, en quienes se concentra el mayor riesgo de contraer una infección invasiva por *H. influenzae* b. Estos resultados conllevaron la búsqueda de mecanismos para modificar el antígeno PRP, de manera de hacerlo reconocible por las células T-dependientes. Tal efecto se obtuvo mediante el acoplamiento del polisacárido a una proteína transportadora, proceso conocido como conjugación (Peltola *et al*, 1984; Granoff y Cates, 1985; Weinberg y Granoff, 1988). Se han desarrollado hasta el 2004, cuatro tipos de vacunas conjugadas licenciadas que difieren básicamente en el tamaño y contenido del PRP, contenido de la proteína

transportadora y en el mecanismo químico de la unión entre ambos (Weinberg y Granoff, 1988; Hviid y Melbye, 2004).

Las vacunas existentes en el mercado para *H. influenzae* b en las pruebas realizadas anterior y posteriormente al registro, indican, que todas son equivalentes en su capacidad de conferir protección contra las infecciones graves por *H. influenzae* b. No existen por tanto, razones técnicas para preferir una u otra, salvo aquellas consideraciones de tipo económico (el costo), la facilidad de administración, de almacenamiento, y la posibilidad de aplicar en forma combinada con otras vacunas (Mbelle *et al*, 1999; Campos, 2001).

La Academia Americana de Pediatría, recomienda el siguiente esquema clásico de vacunación: a los 2, 4 y 6 meses, con una dosis de refuerzo entre los 12-15 meses de edad. Cuando la vacunación se inicia a la edad comprendida entre los 6 y los 11 meses, se deben aplicar dos dosis con un intervalo de 8 semanas, y un refuerzo por lo menos 2 meses después de la última dosis. En los niños mayores de 1 año, una sola dosis resulta suficiente (CDC, 1998; Olowokure *et al*, 2000). Este esquema se administra conjuntamente con la vacuna triple DPT (difteria-tosferina-tétanos) como parte integral del programa de inmunización infantil de rutina en algunos países.

#### **2.15.1. Eliminación de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* b.**

Es así, que existe la posibilidad de hablar de (la virtual) eliminación y erradicación de la enfermedad invasiva por microorganismos del *H. influenzae* b entre los niños menores de cinco años, lo que ha sucedido y es evidente en numerosos países (Garpenholt *et al*, 2001; Tauber *et al*, 2001; Campos *et al*, 2004; Hviid y Melbye, 2004).

#### **2.16. Aplicación de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* b. Epidemiología de las enfermedades invasivas por *H. influenzae***

Uno de los más importantes avances de la salud pública en la lucha contra los procesos infecciosos en las últimas dos décadas, se considera la aplicación generalizada de la vacuna conjugada contra *H. influenzae* b, expresada en una disminución considerable de las infecciones invasivas causadas por este agente. Las preocupaciones iniciales, como la posibilidad de un aumento de los casos de enfermedad causados por los serotipos diferentes

al b, o por cepas no capsuladas (NT), han quedado atrás, después de varios años de un amplio uso de estos productos en aquellos países que cuentan con estrictos sistemas de vigilancia. La efectividad de los programas de vacunación contra *H. influenzae* b ha superado, incluso, las expectativas basadas en las meras tasas de cobertura alcanzadas en una determinada comunidad. Este efecto de inmunidad colectiva es atribuido a la capacidad de la vacuna conjugada de reducir las tasas de portadores nasofaríngeos de *H. influenzae* b, y la disminución del riesgo a la exposición de los individuos no inmunizados (Adegbola *et al*, 1999; Forleo-Neto *et al*, 1999; Mbelle *et al*, 1999; Choo *et al*, 2000; Peltola, 2000<sup>b</sup>; Dickinson *et al*, 2001; Villo-Sirerol *et al*, 2004).

Fritzell (2005), destaca la importancia de las vacunas conjugadas, señalando que las bacterias patógenas encapsuladas (Ej. *H. influenzae* b, *Neisseria meningitidis*, o *Streptococcus pneumoniae*) hacen diana en niños recién nacidos y menores de cinco años los que han perdido la acción protectora de los anticuerpos maternos anticapsulares y cuyos sistemas inmunes son inefectivos contra los antígenos T-independientes como son los polisacáridos de la cápsula. Las vacunas conjugadas de polisacárido-proteína resuelven esta limitante ya que convierten el polisacárido en un antígeno T-dependiente, lo que permite a un niño pequeño vacunado alcanzar una respuesta inmune protectora. Donde han sido introducidas las vacunas conjugadas en los esquemas de vacunación pediátrica, la incidencia de las enfermedades invasiva causadas por *H. influenzae* b y otras, han descendido al menos en un 80%, lo que significa un suceso importante para la salud pública. La vigilancia ha demostrado que las vacunas conjugadas proporcionan “inmunidad asociada” a través de su impacto beneficioso en la protección de la colonización de la nasofaringe, en los niños vacunados.

### **2.17. Vacuna conjugada cubana contra *Haemophilus influenzae* b**

El conjugado de polisacárido y proteína como vacuna, ha probado ser muy efectivo para prevenir la infecciones debidas a *H. influenzae* b en o para los países industrializados. Pero, tecnologías costo efectivas necesitan ser desarrolladas en países del mundo en desarrollo. Consecuentemente, la producción de vacunas con antígenos sintéticos parciales es algo deseado en muchos aspectos. Ellas deben ser controladas rígidamente, buscando la pureza y la efectividad y al mismo tiempo, que sean lo suficientemente económicas para que

puedan adquirirse universalmente. (Fernández-Santana *et al*, 2004). Estos autores, describen la antigenicidad e inmunogenicidad obtenidas en animales, con algunos conjugados sintéticos de oligosacáridos-proteína de *H. influenzae* b.

Vérez-Bencomo *et al* (2004) en Cuba, obtuvieron, tomando como base los estudios de Fernández-Santana *et al*, (2004), la primera vacuna conjugada por síntesis química del polisacárido capsular conocida a nivel mundial anti *H. influenzae* b.

Las vacunas glicoconjugadas, proporcionan una profilaxis efectiva contra las infecciones bacterianas. Sin embargo, no se encontraba disponible una vacuna comercial, donde los antígenos de los carbohidratos principales se produjeran sintéticamente. Los autores describen una síntesis a gran escala, desarrollada farmacéuticamente, y con evaluación clínica de una vacuna conjugada compuesta por un antígeno polisacárido capsular sintético de *H. influenzae* b. La vacuna fue evaluada por ensayos clínicos en Cuba y mostró títulos de anticuerpos protectores a largo plazo comparables con los títulos provenientes de las vacunas ya conocidas comercialmente del polisacárido capsular de *H. influenzae influenzae* b extraído de la bacteria. El estudio demostró que un antígeno capsular polisacárido sintético, permite producir a gran escala una vacuna para uso humano, efectiva contra el *H. influenzae influenzae* b (Vérez-Bencomo *et al*, 2004). Esta vacuna obtenida por síntesis química, se utiliza en Cuba desde el 2005, mostrando valores de incidencia comparables a los de las vacunas comerciales obtenidas por otros métodos.

La factibilidad de obtener vacunas sintéticas basadas en complejos carbohidratos, proporciona una base para acercarnos al futuro desarrollo de vacunas de otros patógenos bacterianos similares.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Cepas Bacterianas

El universo y muestra del presente trabajo comprendió el total de cepas bacterianas viables (n=1155) (identificadas presuntivamente como *Haemophilus influenzae*), recibidas y confirmadas como *H. influenzae*, en el período comprendido entre enero de 1989 a diciembre del 2005, aisladas de niños menores de 5 años portadores de MEB. Las cepas fueron enviadas desde todas las provincias de Cuba al Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".MINSAP, para su caracterización y estudio.

Para su análisis, las cepas (n=1155) se dividieron en dos etapas: 1. Etapa prevacunal, que comprendió aislamientos desde enero de 1989 hasta diciembre de 1999 (n=1097); y 2. Etapa postvacunal (n=58), donde se incluyeron las cepas recibidas desde enero del 2000 hasta diciembre del 2005. Las cepas a su vez, se agruparon en tres regiones geográficas según la ubicación de las provincias de donde eran enviadas:

1. Región Occidental (Pinar del Río, Habana, Ciudad de la Habana, Matanzas e Isla de la Juventud)
2. Región Central (Villa Clara, Cienfuegos, Sancti Spíritus y Ciego de Ávila)
3. Región Oriental (Camagüey, Las Tunas, Holguín, Granma, Santiago de Cuba y Guantánamo).

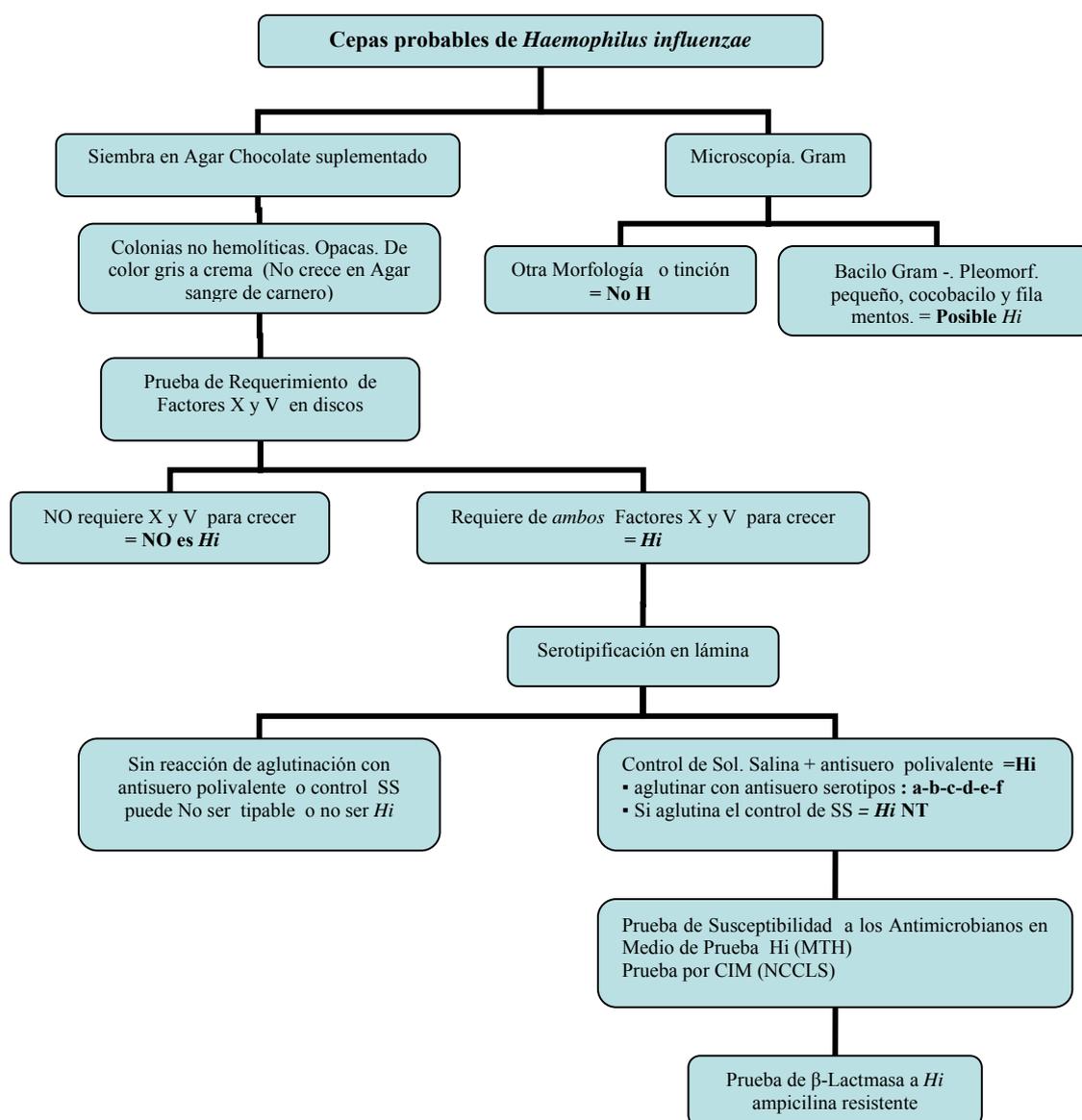
##### 3.1.1. Identificación de las cepas bacterianas

A todas las cepas se aplicó el esquema seguido para la identificación de *H. influenzae* en el LNRM-IPK (MOP, 2005) (Flujograma).

La identificación se llevó a cabo mediante el método descrito por Campos y Sáez-Nieto (2001) y el Manual de Operaciones y Procedimientos del Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología del IPK (MOP, 2005).

**LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE MICROBIOLOGÍA  
IPK-MINSAP. CONFIRMACIÓN DE CEPAS PROBABLES DE *Haemophilus influenzae***

**FLUJOGRAMA**



Fuente: LNRM-IPK-MINSAP. MOP, 2005

Perilla *et al*, 2003; NCCLS, 2000; NCCLS, 2002

### 3.1.1.1. Microscopía

Se realizó la tinción de Gram. Se comprobó la presencia de bacilos cocoides, cortos, pequeños, Gram negativos, pleomórficos, no esporulados y que en ocasiones aparecían en cadenas. Se verificó que fueran Gram negativos (Anexo: 1.1).

### 3.1.1.2. Cultivo y aislamiento

Se utilizó para el aislamiento y cultivo de las cepas el medio de Agar Chocolate con Base GC, Columbia o Tripticasa Soya (Oxoid), enriquecido con NAD (15 µg/mL) y Hematina (15 µg/mL). Se incubó a 35-36 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (OPS, 1998) (Anexos: 1.2, 1.3, 1.4, 2).

### 3.1.1.3. Determinación del requerimiento de los factores V y X

Partiendo de una asada de un cultivo puro de la cepa de *H. influenzae* investigada (OPS, 1998) se utilizaron placas de agar Mueller-Hinton (Oxoid), las cuales fueron inoculadas. Se colocaron los discos impregnados con los factores V, X y V+X (Difco), a una distancia de 1 cm entre cada uno, sobre la superficie del agar en el área de inoculación (Bisgard, 1999). Las placas fueron incubadas a 35-36 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 horas para su observación. Se tomó como probable *H. influenzae* cuando se obtuvo crecimiento solamente alrededor del disco del factor V+X, (Campos y Sáez-Nieto, 2001; Perilla *et al*, 2003) (Anexo 1.4; 2).

Como controles de la prueba se emplearon las siguientes cepas:

- *H. parainfluenzae* ATCC 49140 (Requiere sólo factor V),
- *H. aphrophilus* ATCC 49146 (Requiere sólo factor X)
- *H. influenzae* ATCC 49144 (Requiere factores V y X).

### 3.1.1.4. Determinación de β hemólisis

#### Procedimiento

Las cepas se sembraron por agotamiento sobre el Agar base Sangre Columbia (Oxoid), enriquecida con sangre de conejo o caballo al 3%, para obtener colonias aisladas. Se incubó durante 18-24 horas a 35 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. La prueba se consideró positiva cuando se observó β-hemólisis alrededor de las colonias aisladas (OPS, 1998).

Como controles de la prueba se utilizaron las siguientes cepas:

- *H. influenzae* ATCC 10211 (no hemólisis).
- *H. haemolyticus* ( $\beta$  hemólisis).

### 3.1.1.5. Prueba de la catalasa

Con un asa plástica desechable se colectaron, varias colonias de un cultivo de 18-24 horas de incubación, las cuales se colocaron en un portaobjetos de vidrio, añadiéndosele una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La prueba se consideró positiva si se observó inmediatamente la formación de burbujas (OPS, 1998).

Como control de la prueba se utilizaron las siguientes cepas:

- Control positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (catalasa positiva)
- Control negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (catalasa negativa)

### 3.1.1.6. Determinación de aumento de crecimiento en incubación con atmósfera de CO<sub>2</sub>

#### Procedimiento

Se preparó una suspensión del microorganismo en solución salina estéril, con un patrón de turbidez similar al tubo 0.5 de McFarland. (Anexo 2).

Se incubaron dos placas de agar chocolate con 1  $\mu$ l de la suspensión de la cepa a investigar. Una placa fue incubada en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y la otra en aerobiosis, pero ambas con la misma humedad.

La prueba se consideró positiva, si únicamente se obtuvo crecimiento en la placa incubada en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, o si el crecimiento que apareció en la placa incubada sin CO<sub>2</sub> se observó inhibido. Mediante la coloración de Gram, se comprobó que los microorganismos cultivados en aerobiosis aparecían atípicos al compararlos con el crecimiento de los cultivos en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> (OPS, 1998; Perilla *et al*, 2003).

### 3.1.1.7. Fermentación de carbohidratos

Se utilizó un caldo base enriquecido, con una concentración de 1% de los diferentes carbohidratos investigados y utilizando como indicador Rojo Fenol (permaneció rojo si el pH era alcalino y cambió a amarillo cuando el pH descendió por debajo de 6.8). Se utilizaron los siguientes carbohidratos: Glucosa, Lactosa, Fructosa, Manitol, Manosa, Sucrosa y Xilosa (solución al 10%, esterilizada por filtración), que se añadió a un caldo base conteniendo Rojo Fenol enriquecido con NAD y Hematina (OPS, 1998) (Anexo 2).

#### Procedimiento

Los tubos con el caldo base y el carbohidrato correspondiente, se inocularon con una asada de un cultivo puro de *H. influenzae*, de 18 a 24 horas de incubación. Se incubó a 37 °C por 24-48 horas.

La prueba se consideró positiva: si se observó la presencia de un color amarillo, después de la incubación y negativa, si el medio se mantuvo rojo.

Como controles de la prueba se utilizaron las siguientes cepas:

- *H. influenzae* ATCC 10211 (positiva a Glucosa; negativa a Sucrosa, Lactosa y Manosa)
- *H. parainfluenzae* ATCC 7901 (positiva a Glucosa, Sucrosa y Manosa; negativa a Lactosa).

### 3.2. Serotipificación

A todas las cepas (n=1155) se les realizó serotipificación. El serotipo capsular se realizó por aglutinación en lámina, mediante antiseros comerciales (Difco). Se tomó un cultivo puro y se preparó una suspensión bacteriana equivalente a la escala No.1 de McFarland en tubos con solución salina estéril al 0.85%. De esta suspensión se tomaron 50 µl y se colocaron en una lámina portaobjeto, adicionándole 50 microlitros del antisuero a probar, comenzando por el antisuero polivalente. De ser positiva la aglutinación, se pasó a probar uno por uno con los antiseros monovalentes específicos de cada serotipo: **a, b, c, d, e y f**. Las láminas se mantuvieron en movimiento de rotación constante durante 1 minuto,

observándose si se producía aglutinación evidente cuando la cepa se correspondía con el serotipo del antisuero probado. Se consideró negativa la prueba cuando no se observó aglutinación clasificando la cepa, como no capsulada o *H. influenzae* NT.

### 3.3. Conservación de las cepas

Una vez identificados como *H. influenzae*, los aislamientos se conservaron en Caldo Triptona-Soya con Glicerol grado reactivo (Merck) al 15% y se mantuvieron a -70 °C hasta la realización de la susceptibilidad a los antimicrobianos (Votava y Stritecka, 2001; Perilla *et al*, 2003).

### 3.4. Determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos

Se determinó la susceptibilidad a los antimicrobianos en todas las cepas incluidas en el estudio (n=1155) de acuerdo a las normas establecidas en el LNRM-IPK (NCCLS, 2000; NCCLS, 2002; MOP, 2005).

#### 3.4.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

##### 3.4.1.1. Método de dilución en caldo

Las cepas incluidas fueron procesadas por el método de microdilución en caldo (CIM). Se utilizaron placas de poliestireno, de 96 pocillos (Costar). El volumen de trabajo fue de 0.1mL por pocillo. (NCCLS, 2002)

#### Procedimiento

##### a) Preparación de la solución madre del antimicrobiano

Se preparó una solución madre de cada uno de los antimicrobianos en concentraciones de al menos 1000 µg/mL. Se empleó la siguiente fórmula para determinar la cantidad de los antimicrobianos a añadir en cada uno de los diluentes empleados (MOP, 2005). (Anexo 3).

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{concentración (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potencia del antimicrobiano (}\mu\text{g/mg)}}$$

$$\text{Volumen en mL} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{potencia } (\mu\text{g/mg})}{\text{Concentración } (\mu\text{g/mL})}$$

## b) Preparación de las diluciones seriadas

Se prepararon diluciones seriadas dobles de los antimicrobianos, en caldo HTM y en tubos de 16 x 125 mm.

**Antimicrobianos utilizados y rangos seleccionados**

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Rango utilizado</b>
<b>Ampicilina</b>	AMP	Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA	0.06-256 mg/L
<b>Amoxicilina/ácido clavulánico</b>	A/C	Gautier-Bagó, La Habana, Cuba	0.25/0.12-8/4 mg/L
<b>Cefotaxima</b>	CTX	Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA	0.06-4 mg/L
<b>Ceftriaxona</b>	CRO	Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA	0.06-4 mg/L
<b>Cotrimoxazol</b>	SXT	Empresa Farmacéutica, La Habana, Cuba	0.25/4.75-8/152 mg/L
<b>Tetraciclina</b>	TET	Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA	0.25-64 mg/L
<b>Cloranfenicol</b>	CHL	Merck, Barcelona, España	0.25-64 mg/L
<b>Rifampicina</b>	RIF	Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA	0.25-8 mg/L

*Fuente:* NCCLS, 2002; Tamargo 2005

## c) Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue el recomendado por el NCCLS (caldo HTM), compuesto por caldo Mueller Hinton ajustado con cationes y suplementado con Extracto de Levadura (Difco) (5 mg/mL), Hematina Bovina (Sigma) (15  $\mu\text{g/mL}$ ) y NAD (Sigma) (15  $\mu\text{g/mL}$ ) (MOP, 2005).

d) Recubrimiento de la microplaca

Se utilizaron microplacas (Costar). Se colocaron 50  $\mu$ L de la primera dilución del antimicrobiano en los pozos de la columna 1, en la columna 2, se colocaron 50  $\mu$ L de la dilución del tubo 2 y así sucesivamente hasta la columna 10 (Anexo 4).

En las columnas 11 y 12 de la microplaca se depositaron 50  $\mu$ l del caldo HTM (control de esterilidad y control de crecimiento respectivamente).

e) Preparación del inóculo

A partir de un cultivo puro de *H. influenzae* incubado durante 18 horas en agar chocolate, se preparó una suspensión del microorganismo en 3 mL de solución salina estéril al 0.85%, hasta alcanzar un patrón de turbidez equivalente a la escala 0.5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

Se realizó una dilución 1/100 de la suspensión (0.1 mL de la suspensión y 9.9 mL de caldo HTM), de forma tal de obtener una concentración de  $10^6$  UFC/mL.

f) Inoculación de la microplaca

Se adicionaron 50  $\mu$ L de la suspensión del microorganismo con la micropipeta en los pozos del 1 al 10 y el 12. En el pozo 11 no se añadió suspensión microbiana al pozo destinado para el control de esterilidad, adicionándole 50  $\mu$ l de caldo HTM. El volumen final de cada pozo de la microplaca fue de 100  $\mu$ L. La incubación se realizó a 35 °C, en aerobiosis por 16-18 horas, en ambiente húmedo.

g) Lectura

La lectura de la CIM se realizó determinando la menor concentración del antimicrobiano que inhibió visiblemente el crecimiento bacteriano, teniendo en cuenta los criterios de la NCCLS, (2002). Para proceder a la lectura se comenzó leyendo los controles de crecimiento (turbidez, pozo 12) y el control de esterilidad (transparencia, pozo 11). Se comprobó la lectura de la CIM de la cepa control, y que la misma se encontrara dentro del rango establecido por las normas del NCCLS (2002). Posteriormente se procedió a leer e interpretar los resultados de las cepas en estudio.

## h) Control de Calidad

Cepas control utilizadas.

- *H. influenzae* ATCC 49766: Para el estudio de cefalosporinas
- *H. influenzae* ATCC 49247: Otros antimicrobianos
- *H. influenzae* ATCC 10211: Control de crecimiento
- *E. coli* ATCC 35218: Para evaluar los antibióticos  $\beta$ -lactámicos combinados con inhibidores de  $\beta$ -lactamasa.

### 3.5. Determinación de la actividad $\beta$ -lactamasa

La prueba de  $\beta$ -lactamasa se realizó a todas las cepas resistentes a la ampicilina.

#### Procedimiento

Utilizando láminas portaobjetos, se colocó una gota de la solución de nitrocefina (Glaxo Research) y con ayuda de un asa microbiológica plástica descartable y estéril, se seleccionó una colonia de la cepa a probar y se realizó una emulsión con el reactivo. Para evitar la evaporación, las láminas fueron colocadas en cámaras húmedas. La reacción se consideró como positiva si ocurría un cambio de color amarillo a rosado intenso. Si pasado 30 minutos no se observaba variación en la coloración, la prueba se interpretó como negativa (OPS, 1998; Bisgard, 1999).

Como controles se emplearon una cepa de *S. aureus* ATCC 29213 (control positivo) y una de *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 29216 (control negativo) (NCCLS, 2002).

### 3.6. Revisión de las bases de datos relacionadas

#### 3.6.1. Bases de datos utilizadas para conocer el número de casos de MEB causados por *Haemophilus influenzae*, desde enero 1989 hasta diciembre 2005, en Cuba

Se utilizaron dos bases de datos:

1. Programa de Inmunizaciones MINSAP (1994-2005) y

2. Registro existente de SNI-LNRM (desde 1986-2005).

#### **3.6.1.1. Programa de Inmunizaciones MINSAP (1994-2005)**

La base de datos del Programa de Inmunización del MINSAP (2006) para el período comprendido desde su creación, de enero de 1994 hasta diciembre del 2005 (DNE, 2006; Galindo, 2006; Comunicación Personal). Esta base comprende el registro de los casos reportados como MEB de etiología por *H. influenzae*. Se seleccionaron para el estudio (el comienzo de la vigilancia), los casos reportados como MEB por *H. influenzae* registrados como tales, a partir de esa fecha.

#### **3.6.1.2. Registro existente de SNI-LNRM (desde 1986-2005)**

Se utilizó la base de datos del registro existente (desde enero de 1986 a diciembre de 2005) del Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología del IPK-MINSAP (2006), con el fin completar los datos no contenidos en la base de datos de SNI, MEB, MINSAP .

### **3.7. Análisis estadístico**

Se llevó a cabo el análisis estadístico aplicando las pruebas no paramétricas de MacNemar para dos muestras relacionadas. Se aplicó la prueba de significación ( $\chi^2$ ) para más de dos categorías, y la prueba de probabilidad exacta de Fisher fue empleada para analizar los valores de resistencia antimicrobiana en los diferentes años analizados.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Distribución de las cepas de *Haemophilus influenzae*

#### 4.1.1. Relación de casos reportados de MEB y cepas viables de *Haemophilus influenzae* recibidas por año. LNRM-IPK. Cuba. 1989-2005

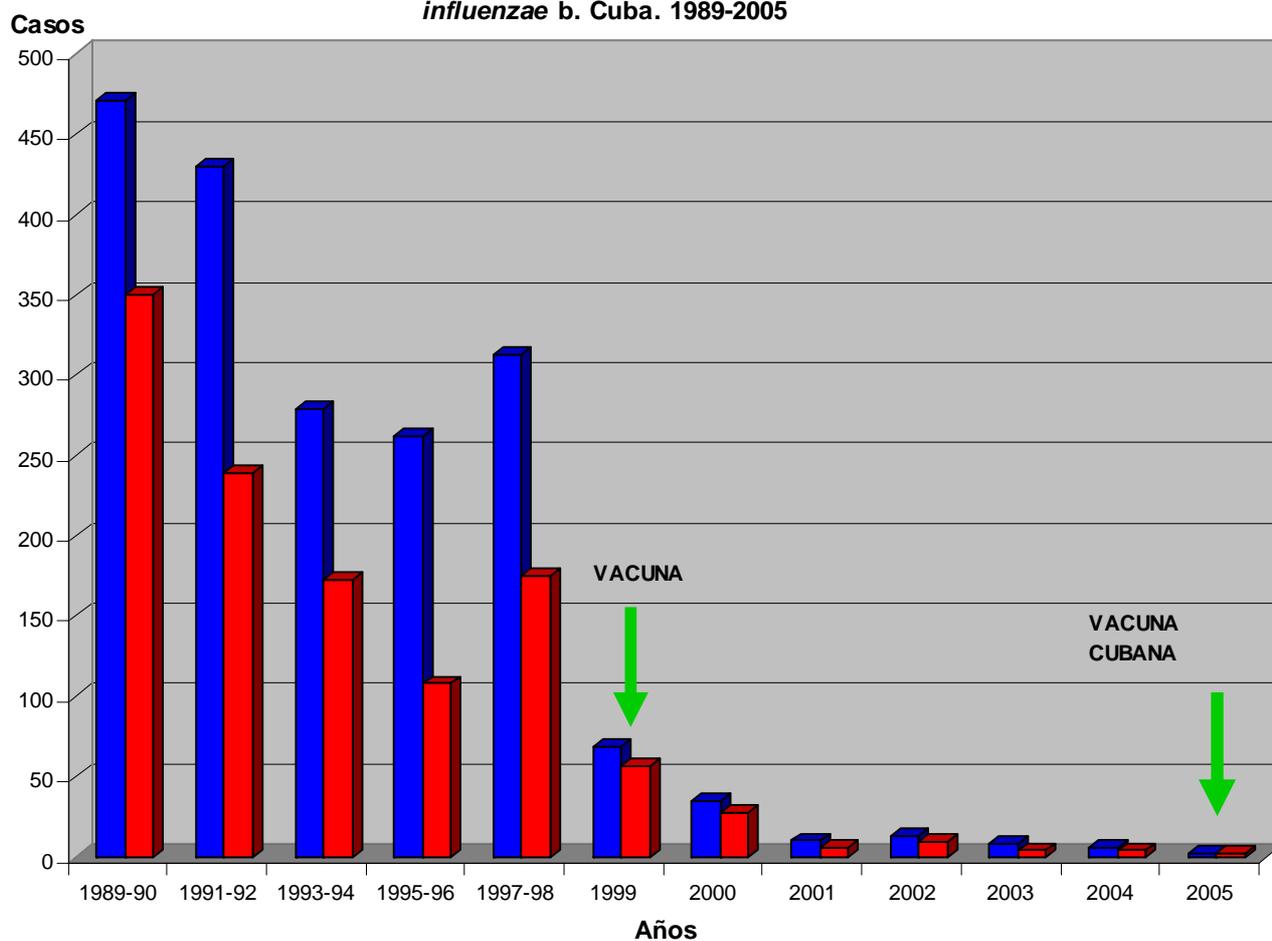
Se presenta la relación mantenida entre los casos reportados de enfermedad invasiva MEB y las cepas viables de *Haemophilus influenzae* recibidas en el LNRM-IPK desde enero de 1989 hasta diciembre del 2005. En total, la base de datos recogió 1898 casos de MEB por *H. influenzae* y un total de 1155 cepas viables. Estas cepas representan el 60.9% de las cepas asociadas al SNI durante el período que comprendió el estudio (Figura 1). (LNRM, 2006).

El mayor número de casos de MEB (1824), se concentra en la Etapa Prevacunal en los años 1989-1999, así como el mayor número de cepas viables (1097), y dentro de estos años, la mayor concentración de casos (471), se produjo entre 1989-90, coincidiendo también con el mayor número de cepas recibidas en el LNRM-IPK (350), en los 17 años que abarcó el estudio (Figura 1). En la Etapa Postvacunal (2000-05), sólo fueron reportados 74 casos, los que aportaron 58 cepas viables, Figura 1, (DNE, 2006; LNRM, 2006).

	<b>Casos de MEB</b>	<b>Cepas <i>Hib</i> Viables</b>
<b>Etapa prevacunal (1989-99)</b>	1824 (96.1%)	1097 (95%)
<b>Etapa postvacunal (2000-05)</b>	74 (3.9%)	58 (5%)
<b>TOTAL</b>	<b>1898 (100%)</b>	<b>1155 (100%)</b>

Estos datos coinciden con los hallazgos descritos por otros autores y en otros países de diferentes latitudes (CDC, 2001; Dickinson, 2001; Tamargo, 2005; DNE, 2006; Galindo, 2006, Comunicación Personal).

Figura 1. Casos reportados MEB por Hib y cepas recibidas 1989-2005 *Haemophilus influenzae* b. Cuba. 1989-2005



Años	1989-90	1991-92	1993-94	1995-96	1997-98	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	Total
<b>Casos Reportados</b>	471	430	279	262	313	69	35	10	13	8	6	2	<b>1898</b> <b>100%</b>
<b>Cepas Recibidas</b>	350	239	173	108	175	57	28	6	9	4	4	2	<b>1155</b> <b>60.6%</b>

Fuente: DNE, 2006; LNRM, 2006

#### 4.1.2. Distribución por regiones geográficas de cepas viables de *H. influenzae* b recibidas en el LNRM-IPK. Cuba. 1989-2005

Desde el año 1989 y hasta el 2005, fueron recuperadas un total de 1155 cepas viables. En la Tabla 1, se presenta el acumulado por regiones geográficas del país para una mejor comprensión.

**Tabla 1. Distribución por regiones geográficas de cepas viables *H. influenzae* b recibidas en el LNRM-IPK. Cuba. 1989-2005**

<b>Región</b>	<b>No. de cepas <i>Hib</i></b>	<b>%</b>
Región Occidental	450	39.0
Región Central	183	15.8
Región Oriental	522	45.2
<b>TOTAL</b>	<b>1155</b>	<b>100</b>

Fuente: LNRM, 2006

La mayor concentración de cepas, en el tiempo, proviene de la región oriental del país con una diferencia pequeña no significativa, con las enviadas por la región occidental incluyendo, la Isla de la Juventud. Las provincias de Ciudad de la Habana y Santiago de Cuba, aportaron al estudio 530, el 45.9 % de las cepas viables recibidas (Anexo 5).

Durante la etapa investigada, se realizó por Tamargo (2005), en el LNRM-IPK, la distribución de los serotipos encontrados en el período 1989-2003, lo que reflejó que el 97.6 %, perteneció al serotipo b (Tabla 2). A estos datos fueron incorporados los de las cepas correspondientes a los años 2004 y 2005, produciéndose una disminución (no estadísticamente significativa) a 96.7%, lo que puede ser explicado por el hecho de que solo se recibieron en el LNRM-IPK-MINSAP en esos dos años seis cepas procedentes de ocho casos reportados en todo el país como MEB, todas, del serotipo b.

**Tabla 2. Distribución de serotipos y cepas no tipables de *H. influenzae*. Cuba. 1989-2005**

Período	Número de cepas	Serotipos				<i>H. influenzae</i> NT %
		a	b	e	f	
1989-1999	1097	3	1064	5	9	16
2000-2005	58	0	54	0	1	3
<b>Total</b>	<b>1155</b> <b>(100 %)</b>	<b>3</b> <b>(0.3%)</b>	<b>1118</b> <b>(96.7%)</b>	<b>5</b> <b>(0.4%)</b>	<b>10</b> <b>(0.8%)</b>	<b>19</b> <b>(1.6%)</b>

*Fuente:* Tamargo, 2005. LNRM, 2006

Se encuentra bien documentado en la literatura, que el serotipo b es el más frecuente entre las cepas invasivas. Ishiwada *et al* (2004), detectan en Japón 88.7% de aislamientos del serotipo b, en niños menores de 5 años con enfermedades invasivas. Resultados similares obtuvieron Takemura y Andrade (2001) en Brasil, donde señalaron al serotipo b como responsable del 90% de las MEB en niños pequeños. También Skoczynska *et al* (2000) describieron que *H. influenzae* resulta la segunda causa de MEB en Polonia, donde el serotipo b se aisló en más del 90% de los casos investigados. Los serotipos a, e y f también fueron detectados en Cuba por Tamargo (2005) entre los aislamientos de la etapa pre y postvacunal hasta el 2003, aunque en porcentajes muy bajos (Tabla 2).

Los serotipos e y f, han sido los que con mayor frecuencia se señalan en la literatura después del b, y específicamente el f ha sido encontrado con relativa frecuencia en los países donde se ha llevado a cabo un programa de vacunación generalizada. En Cuba, desde el año 2000 al 2005, sólo ha sido hallada una cepa serotipo f. Bruun *et al* (2004) plantean que el serotipo f resulta el más frecuente en Dinamarca. Campos *et al* (2004) en España encontraron cepas serotipo f y un 3.3% del serotipo e, entre los aislamientos pertenecientes a casos clínicos invasivos, mientras que en Estados Unidos, el serotipo f se ha reportado en el 17% de las cepas aisladas de MEB, según Urwin *et al* (1996). En Italia, Cerquetti *et al* (2003), plantean que el serotipo e resulta el más frecuente entre las poblaciones inmunizadas.

Los serotipos a y c han sido descritos particularmente relacionados con enfermedades respiratorias (Turk, 1984). En Cuba, el serotipo a solo se detectó en el 0.3% de las cepas

estudiadas, valor similar al encontrado por Adderson *et al* (2001) quienes reportaron el hallazgo de 5 casos de enfermedad invasiva por *H. influenzae* serotipo a, en una investigación realizada durante un período de 10 meses.

Autores de otros países notifican el aislamiento de los serotipos c y d, en meningitis y neumonía (Kwak *et al*, 2000; Sakata, 2002; Villo-Sirerol, *et al*, 2004). En Cuba, no se han encontrado los serotipos c ni d entre las cepas de *H. influenzae* estudiadas hasta el 2005.

Varios autores han demostrado el hallazgo de elevados porcentajes de cepas *H. influenzae* NT, como causa de enfermedad invasiva después de varios años de introducida la vacunación (Murphy *et al*, 1993; O'Neil *et al*, 2003). Slack *et al* (1998) señalan un 60% de cepas con similares características en Inglaterra, mientras que valores superiores han sido descritos por Domínguez *et al* (2002), quienes encontraron un 72.7% de cepas NT en casos de MEB en España. Teniendo en cuenta nuestros hallazgos de cepas NT, 19 (1.6%), consideramos que resulta de gran importancia continuar la vigilancia de las cepas aisladas en Cuba.

Con el nuevo siglo, se ha comenzado a evaluar en el mundo, las primeras vacunas contra cepas NT de *H. influenzae*, las que se reportan con buenos resultados (Yasutomi, 2001; Kyd *et al*, 2003; Xin-Xing *et al*, 2003).

#### **4.2. Susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *H. influenzae***

Los resultados de la susceptibilidad antimicrobiana de las 1155 cepas de *H. influenzae*, estudiada mediante CIM, en los grupos de aislamientos correspondientes a las etapas pre y postvacunal, frente a: ampicilina, cloranfenicol, cotrimoxazol, tetraciclina, rifampicina, ceftriaxona, cefotaxima y amoxicilina/ácido clavulánico, en Cuba, aparecen descritos en la Tablas 3 y 4. Entre las cepas estudiadas de la etapa prevacunal, 488 (44.4%), resultaron resistentes a la ampicilina (CIM  $\geq 4\mu\text{g/mL}$ ), 449 (40.9%) al cloranfenicol (CIM  $\geq 8\mu\text{g/mL}$ ), 530 (48.3%) al cotrimoxazol (CIM  $\geq 4/76\mu\text{g/mL}$ ) y 333 (30.3%) a la tetraciclina (CIM  $\geq 8\mu\text{g/mL}$ ).

El 100% de las cepas resultaron sensibles a: ceftriaxona, rifampicina, cefotaxima y amoxicilina/ácido clavulánico. El 53.9% de las cepas resultaron sensibles *in vitro*, a todos

los antimicrobianos probados. De Almeida *et al*, (2006) en Brasil, realizaron un trabajo similar al nuestro, comparando los resultados de cuatro laboratorios de Salud Pública en tres estados, en el período 1990-99 y 2000-03, este trabajo sólo comprendió 174 cepas de *H. influenzae* y obtuvieron: 17% de cepas resistentes a ampicilina; para cotrimoxazol, 32% de resistencia en la etapa prevacunal, y 65.8% en la postvacunal; y para la rifampicina una resistencia de 8.2% y 9.7% respectivamente. Sus resultados difieren de los encontrados por nosotros, ya que en la etapa postvacunal en Cuba los porcentajes encontrados disminuyeron con relación a los valores de la etapa precedente, tanto para la ampicilina como para cotrimoxazol, y no se reportó resistencia a rifampicina en ambas etapas. Resulta importante resaltar los trabajos sobre la emergencia de la resistencia de Klugman y Madhi (1999).

**Tabla 3. Resistencia antimicrobiana por CIM de cepas *H. influenzae*. Etapa Prevacunal y Etapa Postvacunal. Cuba. 1989-2005**

**Etapa Prevacunal**

Años	Cepas estudiadas	AMP n (%)	CHL n (%)	SXT n (%)	TET n (%)
1989	195	78 (40.0)	67 (34.3)	76(38.9)	44 (22.6)
1990	152	62 (40.7)	54 (35.5)	69 (45.4)	35 (23.0)
1991	108	46 (42.6)	39 (36.1)	49 (45.4)	30 (27.7)
1992	130	56 (43.0)	50 (38.5)	59 (45.4)	30 (23.0)
1993	100	43 (43.0)	45 (45.0)	48 (48.0)	36 (36.0)
1994	72	33 (45.8)	33 (45.8)	35 (46.6)	30 (41.6)
1995	50	23 (46.0)	21 (42.0)	27(54.0)	19 (38.0)
1996	58	27 (46.5)	26 (44.8)	30 (51.7)	22 (37.9)
1997	61	30 (49.2)	30 (49.2)	32 (52.4)	23 (37.7)
1998	114	60 (52.6)	54 (47.4)	74 (64.9)	39 (34.2)
1999	57	30 (52.6)	30 (52.6)	31 (54.4)	25 (43.8)
<b>Total</b>	<b>1097</b>	<b>488 (44.4)</b>	<b>449(40.9)</b>	<b>530 (48.3)</b>	<b>333 (30.3)</b>

### Etapa Postvacunal

Años	Cepas estudiadas	AMP n (%)	CHL n (%)	SXT n (%)	TET n (%)
2000	31	11(35.5)	10 (32.2)	13 (41.9)	8(25.8)
2001	6	3 (50.3)	2 (33.3)	3 (50.3)	1(16.6)
2002	10	3 (30.0)	4 (40.0)	3 (30.0)	0
2003	5	1 (20.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	0
2004	4	2	1	1	0
2005	2	1	1	0	0
<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>21(36.4)</b>	<b>19(32.7)</b>	<b>21 (36.4)</b>	<b>9(15.5)</b>

Fuente: LNRM, 2006

### 4.3. Susceptibilidad a los antimicrobianos y producción de $\beta$ -lactamasa

Todas las cepas resistentes a la ampicilina resultaron productoras de la enzima  $\beta$ -lactamasa y mostraron una CIM  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 4). Comparando los reportes de la literatura internacional, consideramos que el porcentaje de resistencia a la ampicilina encontrado en (en Cuba), este estudio (44.4% y 36.4% para la etapa pre y postvacunal respectivamente) resultó elevado, comparable con los de España, donde Campos *et al* (2004) notificaron el 45.8% de resistencia entre las cepas aisladas de infecciones invasivas en un período de 2 años. De Almeida en Brasil (2006) describió sólo un 17% de resistencia a la ampicilina para un período de 14 años.

**Tabla 4. Susceptibilidad a los antimicrobianos por CIM. Cepas de *H. influenzae*. Producción de  $\beta$ -lactamasa ( $\mu\text{g/L}$ ). Cuba. 1989-2005**

Antimicrobiano	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Rango	S (%)	No-sensible* (%)
<b>Ampicilina</b>					
<b>Total</b>	1	256	$\leq 0.06$ -256	55.6	<b>44.4</b>
$\beta$ -lactamasa -	0.5	1	$\leq 0.06$ -1	100	0
$\beta$ -lactamasa +	64	256	1-256	0	100
<b>Cloranfenicol</b>					
<b>Total</b>	2	64	$\leq 0.25$ -64	56.6	<b>43.4</b>
$\beta$ -lactamasa -	1	2	$\leq 0.25$ -64	96.6	3.4
$\beta$ -lactamasa +	32	64	$\leq 0.25$ -64	9.2	90.8
<b>Cotrimoxazol</b>					
<b>Total</b>	4/76	>8/152	$\leq 0.25/4.75$ - 8/152	43.9	<b>54.6</b>
$\beta$ -lactamasa -	$\leq 0.25/4.75$	0.5/9.5	$\leq 0.25/4.75$ - 8/152	94	6
$\beta$ -lactamasa +	4/76	>8/152	$\leq 0.25/4.75$ - 8/152	3	97
<b>Tetraciclina</b>					
<b>Total</b>	2	64	$\leq 0.25$ -64	65.5	<b>34.5</b>
$\beta$ -lactamasa -	0.5	2	$\leq 0.25$ -64	98.6	1.4
$\beta$ -lactamasa +	16	64	$\leq 0.25$ -64	34.3	65.7
<b>Amoxicilina/Ácido clavulánico</b>					
<b>Total</b>	0.25	2	$\leq 0.25$ -2	100	<b>0</b>
$\beta$ -lactamasa -	0.25	0.5	$\leq 0.25$ -2	100	0
$\beta$ -lactamasa +	0.5	2	$\leq 0.25$ -2	100	0
<b>Cefotaxima</b>					
<b>Total</b>	$\leq 0.06$	$\leq 0.12$	$\leq 0.06$ -0.12	100	<b>0</b>
$\beta$ -lactamasa -	$\leq 0.06$	$\leq 0.12$	$\leq 0.06$ -0.12	100	0
$\beta$ -lactamasa +	$\leq 0.06$	$\leq 0.12$	$\leq 0.06$ -0.12	100	0

<b>Ceftriaxona</b>					
<b>Total</b>	≤0.06	≤0.12	≤0.06-0.12	100	<b>0</b>
<b>β-lactamasa -</b>	≤0.06	≤0.12	≤0.06-0.12	100	0
<b>β-lactamasa +</b>	≤0.06	≤0.12	≤0.06-0.12	100	0
<b>Rifampicina</b>					
<b>Total</b>	0.5	0.5	≤0.25-1	100	<b>0</b>
<b>β-lactamasa -</b>	0.5	0.5	≤0.25-1	100	0
<b>β-lactamasa -</b>	0.5	0.5	≤0.25-1	100	0

*Fuente:* Tamargo 2005; LNRM, 2006

En un estudio genético muy reciente publicado por Hasegawa *et al*, (2006) con relación a la ampicilina, se analiza la resistencia de *H. influenzae* b y se señala la necesidad de estudiar el comportamiento de las cepas anualmente en relación con las mutaciones y la resistencia de estas en diferente manifestación.

#### 4.3.1. Variabilidad geográfica y producción de β-lactamasa

Se describe que la variabilidad geográfica muestra relación con la producción de β-lactamasa entre cepas de *H. influenzae*. Kristiansen *et al* (2001), detectaron un 6.7 % de cepas de *H. influenzae* productoras de β-lactamasa correspondientes a un estudio realizado en Noruega, en muestras de pacientes con infecciones respiratorias bacterianas. En una investigación multicéntrica nacional desarrollada en Portugal por Melo-Cristino *et al* (2001), demostraron que el 12.4% de las cepas aisladas de casos clínicos con neumonía producían β-lactamasa. Tasas de alrededor de 15% fueron detectadas en Francia y Bélgica (Schito *et al*, 2000).

Bussetti *et al* (2003) en el noreste de Italia, señalaron una resistencia a la ampicilina del 15.8%, en niños con procesos respiratorios, y todas esas cepas fueron productoras de β-lactamasa. Turnak *et al* (2001), identificaron un 19.3% de resistencia a la ampicilina, en un estudio en 13 países, durante el período de 1999-2000, mientras que en Alemania, Reinert *et al* (2004), notificaron tan sólo el 3.2% de producción de β-lactamasa, todas en cepas aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.

Resultan limitados en Latinoamérica, los estudios encaminados a identificar la resistencia en cepas de *H. influenzae*, De Andrade *et al* (2001), en un análisis del comportamiento de esta problemática durante un período de 10 años (1990-2000) observaron un 21.4% de cepas  $\beta$ -lactamasa positivas, aisladas de procesos invasivos, en niños menores de 5 años. Ese trabajo se refiere a un estudio de revisión, donde se exponen los resultados de autores pertenecientes a diferentes países, en ocasiones, de regiones específicas y no a estudios multicéntricos controlados. En Cuba encontramos altos valores de resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, cotrimoxazol y tetraciclina en las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa (Tablas 3 y 4).

#### 4.4. Resistencia de *H. influenzae* a los antimicrobianos

Ya desde 1999, los trabajos de Klugman y Madhi señalan la emergencia de la resistencia de *H. influenzae* b. Existen referencias de países europeos sobre la resistencia a los antimicrobianos ensayados, donde los porcentajes de cepas no sensibles al cloranfenicol, doxiciclina y cotrimoxazol son inferiores a los encontrados en Cuba (Tabla 4). El proyecto Alexander, el cual analiza los resultados de 15 países de Europa, demuestra una marcada variación geográfica de la resistencia, en el caso del cloranfenicol, los valores oscilan entre 0 y 4%, valor similar al encontrado con la doxiciclina (0-3.2%), encontrándose que en el cotrimoxazol, el porcentaje de cepas resistentes resultó por debajo del 30% (Schito *et al*, 2000; Morrissey *et al*, 2005; Tamargo, 2005).

Otros autores plantean que las cepas capsuladas suelen ser más resistentes que las no capsuladas, sobre todo en cepas del serotipo b aisladas de muestras clínicas normalmente estériles (Campos *et al*, 1984; De Andrade *et al*, 2001; Dajani, 2002).

Campos *et al* (2004), publicaron que los aislamientos capsulados fueron significativamente más resistentes a la ampicilina, tetraciclina y al cloranfenicol que los no capsulados.

Los hallazgos del LRNM-IPK, durante los diecisiete años estudiados indican que las pocas cepas pertenecientes a otros serotipos (diferentes al b, Tabla 2) mostraron valores similares a los detectados en investigaciones realizadas por otros autores de diferentes países, con cepas aisladas de procesos no invasivos, y reportan un comportamiento diferente, incluso, en casos donde resulta poco frecuente el hallazgo de cepas resistentes en

el tracto respiratorio. Cresti *et al* (2003), en un estudio realizado en portadores nasofaríngeos en una población del centro de Italia, encontraron que, las cepas de *H. influenzae* NT aisladas, tan sólo fueron resistentes al cotrimoxazol (3%), y las capsuladas sólo mostraron susceptibilidad disminuida a la tetraciclina.

Por otra parte, un estudio multicéntrico desarrollado en Japón, por Inoue *et al* (2005) en cepas de *H. influenzae* NT, aisladas del tracto respiratorio, demuestran el hallazgo de sólo 8.5% de aislamientos resistentes a la ampicilina.

Fuentes *et al* (2003) en Cuba, en un estudio de portadores realizado en un círculo infantil del municipio Marianao, detectaron que el 17.7% de las cepas mostraron resistencia a la ampicilina, 6.3% al cloranfenicol, y 4% a la tetraciclina, siendo la resistencia al cotrimoxazol más elevada (41.8%), lo que pudiera explicarse por la presión selectiva ejercida en Cuba sobre esta último fármaco en la atención primaria de salud.

#### **4.4.1. Resistencia de *Haemophilus influenzae* en Cuba a los antimicrobianos en la etapa prevacunal**

De acuerdo a los resultados obtenidos en Cuba, en el grupo de cepas pertenecientes a la etapa prevacunal, puede catalogarse de alarmante la resistencia detectada, no sólo por los elevados porcentajes encontrados desde el comienzo del estudio, sino por el incremento progresivo que manifestaron las cepas en el período 1989-1999: ampicilina (40.0-52.6%), cloranfenicol (34.3-52.6%), cotrimoxazol (38.9-54.4%) y tetraciclina (22.6-43.8%), sólo se halló diferencia estadísticamente significativa en el caso de la tetraciclina ( $p=0.011$ ; OR:0.36, 95% CI, 0.15-0.87).

Existen trabajos que demuestran un comportamiento similar en cuanto al incremento de la resistencia en el tiempo, Schito *et al* (2000) evidenciaron que la producción de  $\beta$ -lactamasa en *H. influenzae* se incrementó entre 1996 (10.3%) y 1998 (11.6%) en varios países europeos, mientras que aumentos constantes, aunque no significativos, fueron encontrados para el cloranfenicol, cotrimoxazol, y tetraciclina, en cepas procedentes de procesos invasivos y respiratorios en algunos países (Powell *et al*, 1987; Schito *et al*, 2000; Seaton *et al*, 2000; Strachunski *et al*, 2001; Jones *et al*, 2002; Jones *et al*, 2003).

#### 4.4.2. Resistencia a los antimicrobianos en Cuba de *Haemophilus influenzae* en la etapa postvacunal

En Cuba, como ha sucedido en otros países en la etapa postvacunal (2000-2005), el comportamiento de la resistencia en las cepas investigadas presentó cambios con relación a la etapa precedente (Reid, 2006). Se observó una disminución de la resistencia a: ampicilina, cloranfenicol, cotrimoxazol y para la tetraciclina. Se demostró una diferencia estadísticamente significativa en el caso de la tetraciclina ( $p=0.011$ ; OR: 0.36, 95% CI, 0.15-0.87), pudiendo los porcentajes estar influenciados por el número de cepas estudiadas ( $n=58$ ) entre el 2000 y el 2005.

La variación de la resistencia ha sido estudiada, frente a los diferentes antimicrobianos, en relación al consumo, en una región geográfica determinada y se ha comprobado que existe una relación directamente proporcional entre resistencia y consumo (Hasegawa *et al*, 2003; Ferguson, 2004). Se ha sugerido, como parte de la estrategia de control de la resistencia en general, el brindar una correcta educación a los pacientes sobre el uso adecuado, bajo prescripción médica, de los antimicrobianos y la importancia de no adquirirlos ni consumirlos en forma indiscriminada, sobre todo en aquellos países donde pueden obtenerse sin prescripción facultativa (Homedes y Ugalde, 2005).

Otro aspecto que indiscutiblemente puede ayudar a disminuir la resistencia, es el conocimiento y divulgación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas circulantes entre el personal de salud que prescribe y el análisis de cómo se puede disminuir el fenómeno de la resistencia microbiana disminuyendo el consumo de determinados antimicrobianos, los cuales deben ser solamente administrados bajo estricta prescripción médica (WHO, 2000; Low y Scheld, 1998; Ferguson, 2004; Kawai *et al*, 2004).

La Tabla 4 refleja la susceptibilidad antimicrobiana a los agentes estudiados, el rango utilizado y la CIM para el 50% y el 90% de las cepas (CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>), en relación a la producción de  $\beta$ -lactamasa. Del total de cepas resistentes al cloranfenicol, el 90.8% resultaron ser productoras de  $\beta$ -lactamasa, 97% en el caso del cotrimoxazol y el 67.7% para el tetraciclina.

Bell *et al* (2002), señalaron la eficacia de las cefalosporinas de segunda y tercera generación frente a las cepas invasivas de *H. influenzae* y encontraron menos de un 2% de cepas resistentes a estos antimicrobianos en aislamientos pertenecientes a pacientes con neumonía; y Kwak *et al* (2000), describen que el 100% de las cepas estudiadas fueron sensibles a las diferentes cefalosporinas. En el estudio realizado en Cuba por Tamargo (2005), en las cepas de *H. influenzae* hasta Diciembre del 2003, no se reporta hallazgo de cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación investigadas, lo que constituye un importante aporte al manejo terapéutico de las infecciones graves ocasionadas por *H. influenzae* b, por parte de los pediatras en particular.

En Cuba se utilizan ampliamente las cefalosporinas de tercera generación en el tratamiento de las enfermedades invasivas ocasionadas por *H. influenzae*, y los resultados *in vitro* obtenidos por Tamargo (2005) hasta el 2003 y por nosotros hasta el 2005, sugieren que para el tratamiento de la MEB pueden seguir siendo considerados los antimicrobianos de elección.

La acción de las flouoroquinolonas frente a las cepas de *H. influenzae* ha sido objeto de un estudio constante, pues aunque no son utilizadas en edades pediátricas, se consideran una excelente opción terapéutica ante la emergencia de la resistencia a otros antimicrobianos, sobre todo en pacientes con fibrosis quística, quienes las consumen frecuentemente (Barriere y Hindler, 1993; Davidson *et al*, 2002; Hoepelman, 2004). *H. influenzae*, es de forma natural, sensible a las quinolonas, y en estudios llevados a cabo se reporta una resistencia menor de 1% (García-Rodríguez *et al*, 1999; Biedenbach y Jones, 2000), comportamiento que no ha mostrado variación en el tiempo (Karlowsky *et al*, 2003; Pérez *et al*, 2003). En un estudio multicéntrico realizado en Europa, Jones *et al* (2002), durante el período 2000-2001, demostraron un 100% de sensibilidad a las quinolonas, cifras similares a las ya obtenidas en una investigación anterior. Blosser-Middleton *et al*. (2003), estudiaron 840 cepas en cuatro países europeos y demostraron que, aunque en los diferentes países se detectan variaciones en la producción de  $\beta$ -lactamasa, la sensibilidad a las quinolonas fue superior al 99% en todos los casos.

En Cuba, en 107 cepas estudiadas con diferentes patrones de susceptibilidad, fue descrito por Tamargo (2005), la no detección de cepas resistentes o con susceptibilidad disminuida

a las flouoroquinolonas investigadas, resultados a tener en cuenta en el manejo de pacientes donde se aíslen cepas multirresistentes y se justifique el empleo de las mismas.

#### 4.5. La multirresistencia

En las 1155 cepas investigadas (Tabla 5), la multirresistencia al igual que lo reportado por otros autores, se presentó en 453 (39.2%) (Campos *et al*, 1984; Tamargo, 2005). El patrón de resistencia más frecuente fue: AMP-CHL-SXT-TET (27.24%), seguido por el patrón AMP-SXT-CHL (11.05%). Excepto cuatro, todas las cepas multirresistentes, no resultaron sensibles al cloranfenicol, y 445 (98.23%), resultaron resistentes a la ampicilina y cotrimoxazol. Todas las cepas no sensibles a la ampicilina, presentaron al menos un marcador adicional de resistencia. La resistencia a la ampicilina estuvo fuertemente asociada con la resistencia a tetraciclina ( $p < 0.001$ ; OR: 41.9, 95% IC: 25.6-69.3), cotrimoxazol ( $p < 0.001$ ; OR: 202.3, 95% IC: 109.6-379.1) y con el cloranfenicol ( $p < 0.001$ ; OR: 260.15, 95% IC: 142-482.4).

El aislamiento de cepas multirresistentes resultó frecuente en la etapa prevacunal, con 445 (40.6%), no así en el período postvacunal 2000-05, donde sólo 8 cepas (13.8%) resultaron multirresistentes, lo que pudo estar en relación, con el número reducido de cepas circulantes en esta etapa. En los años 2003 al 2005, no se detectaron cepas con resistencia a tres o más antimicrobianos. En esta etapa toda la cohorte de niños menores de 4 años ya se encontraba protegida por la vacunación (Galindo 2006, Comunicación Personal).

Existen autores que señalan el hallazgo de cepas multirresistentes (Campos *et al*, 1984; Levy *et al*, 1993; Hua *et al*, 2004), mientras que otros, plantean que el aislamiento de las mismas resulta poco frecuente (Amarnath *et al*, 1992; Bajanca-Lavado *et al*, 1996; Schito *et al*, 2000; Critchley *et al*, 2001; De Andrade *et al*, 2001). ¿Estará esto condicionado a la no existencia de una política de uso racional de los antimicrobianos en algunas poblaciones? Posiblemente esa sea la respuesta a la divergencia de opiniones al respecto.

En el LNRM-IPK, se comprobó que las cepas estudiadas con resistencia documentada a 3 ó más antimicrobianos mantenían sensibilidad elevada a las quinolonas (Tamargo 2005), a las cefalosporinas de tercera generación, así como a la combinación amoxicilina/ácido clavulánico. Dabernat *et al* (2004), reportaron resultados similares en un análisis de las

cepas recibidas durante un año, en el Laboratorio Nacional de Referencia de Francia, y encontraron que las cefalosporinas de segunda y tercera generación se mantenían como los antimicrobianos más efectivos frente a cepas con diferentes mecanismos de resistencia. Otros autores como Gazi *et al* (2004), encontraron tan sólo un 1.2% de resistencia al cefaclor y amoxicilina/ácido clavulánico, en aislamientos resistentes a la ampicilina y al cotrimoxazol.

**Tabla 5. Patrones de resistencia por CIM. Cepas de *H. influenzae* aisladas de procesos invasivos. Cuba. Etapa prevacunal 1989-99 y etapa postvacunal 2000-2005**

Patrones de resistencia con uno o dos patrones	Prevacunal 1989-1999 (n= 1097)	Postvacunal 2000-05 (n=58)	Total (n=1155)
AMP/SXT	44	7	51
SXT	41	1	42
CHL/TET	8	3	11
TET/SXT	3	0	3
AMP/TET	2	5	7
<b>con tres Patrones o más</b>			
CHL /TET /SXT *	3	1	4
AMP/SXT/TET *	4	1	5
AMP/CHL/TET *	3	1	4
AMP/SXT/CHL *	125	2	127
AMP/CHL/SXT/TET *	310	3	313
<b>Total multirresistencia</b>	<b>445 (40.6%) **</b>	<b>8 (13.8%) **</b>	<b>453 (39.2%) **</b>

\* Patrones de Multirresistencia.

\*\* Números y porcentaje de cepas multirresistentes/total de cepas estudiadas.

Fuente: LNRM, 2006

En cepas de *H. influenzae* la resistencia combinada a la ampicilina y otros antimicrobianos como el cotrimoxazol, cloranfenicol y/o tetraciclina, puede ser encontrada con relativa frecuencia. Tal comportamiento sugiere mecanismos de resistencia que, aunque diferentes para cada uno de ellos, puedan estar íntimamente relacionados o combinados en un soporte

común, como puede ser la presencia de plásmidos conjugativos de resistencia. Otros antimicrobianos como las cefalosporinas y las quinolonas requieren de alteraciones o mutaciones en las cepas, que sólo pueden ocurrir bajo determinadas presiones selectivas poco frecuentes en el hábitat normal de este microorganismo, y que una vez establecidas, no se transfieren con facilidad de unas cepas a otras (Dagan *et al*, 2001; Li *et al*, 2004; Yoshizumi *et al*, 2004, Tamargo, 2005).

En los estudios en Cuba de Tamargo (2005), se sugiere: 1. Que el alto valor de la multiresistencia de las cepas de la etapa prevacunal, estuvo vinculada al hallazgo de plásmidos conjugativos de resistencia; 2. Los estudios por ECP, revelaron la clonalidad de las cepas pertenecientes al Hi serotipo b, aisladas en la etapa prevacunal y el hallazgo de tres “clusters” principales con una marcada homología entre las cepas; 3. La circulación de dos “clusters”, I y III, se asoció al alto número de cepas multiresistentes. No se encontró en este trabajo asociación de la clonalidad con el área geográfica de procedencia de las cepas (Tamargo, 2005).

#### **4.6. Vacuna conjugada anti *H. influenzae* b**

*H. influenzae* b, por la morbilidad, mortalidad y letalidad producida como agente etiológico de enfermedad invasiva y de MEB en particular, ha constituido y constituye un verdadero problema de salud no solo para el mundo desarrollado que ya ha tomado medidas, sino para el mundo en desarrollo sobre todo, para aquellos que todavía hoy, no tienen acceso a la vacuna conjugada anti *H. influenzae* b. La utilización de la vacuna conjugada anti *H. influenzae* b, ha demostrado como el panorama sombrío que mostraba la enfermedad invasiva por *H. influenzae* b puede ser transformado y eso ha sucedido en Cuba (Figura 1; Anexos: 6, 6.1, 6.2, 6.3) (Dickinson, 2001; Tamargo, 2005; DNE, 2006; Galindo, 2006; Comunicación Personal), así como ha sucedido en otros países (Tabla 6). Los datos aportados por la vigilancia del comportamiento de las cepas de *H. influenzae* b asociadas a MEB, en Cuba y mundialmente (Olowokure *et al*, 2000), así lo demuestran y brindan además, evidencias de que también se modifican los marcadores de sensibilidad a los antimicrobianos de las nuevas cepas de *H. influenzae* b cuando son comparadas con las correspondientes al período prevacunal. En el período postvacunal se presenta una

marcada disminución de la circulación de las cepas de *H.influenzae* y *H.influenzae b* (Figura 1) (De Abreu- Freitas y Merchán-Hamann, 2006; Obonyo *et al*, 2006).

Ya desde 1988, en Estados Unidos, las vacunas conjugadas anti *H. influenzae b* han estado disponibles y en 1991, recomendaron que todos los niños de 2 meses de edad (de acuerdo a sus posibilidades económicas) comenzaran a recibir esta vacuna. Para 1996, la incidencia de enfermedad invasiva compatible clínicamente con *H. influenzae b*, en niños menores de 5 años había declinado alrededor del 99%. Este reporte presenta los datos de la vigilancia de *H. influenzae* realizada desde 1998-2000. En Estados Unidos se ha planteado, que espera que en el 2010, se reduzca a cero la enfermedad invasiva por *H. influenzae b* en la población indígena, en niños menores de 5 años (CDC, 2001). Otros autores con igual problemática de poblaciones indígenas, plantean la necesidad de estrategias de vacunación anti *H. influenzae b* como es el caso de Australia, Canadá y Nueva Zelanda (Menzies y McIntey, 2006).

La introducción de la vacuna conjugada *H. influenzae b* en el programa de vacunación del Reino Unido, se produce en 1992, y se anuncia que se encuentran cercanos a la eliminación de la MEB por *H. influenzae b*. Basan esta afirmación en una alta efectividad de la vacunación, a la presencia de inmunidad, y a la frecuencia de factores de riesgo asociados a casos reportados como fallos vacunales y enfermedad invasiva debida a *H. influenzae* no del serotipo b. Estudios paralelos han demostrado en la población vacunada inmunogenicidad, inducción de la memoria inmunológica y persistencia de la inmunidad después de la aplicación del esquema adoptado. También han medido el impacto de la vacunación sobre los portadores nasofaríngeos de *H. influenzae b*, pues continúan apareciendo casos y complicaciones lo que consideran “un aviso”, particularmente, refiriéndose a otras vacunas y combinaciones de vacunas que han sido introducidas, por lo que otorgan valor a la vigilancia de la enfermedad por *H.influenzae b* en el Reino Unido (McVernon y Heath, 2003; Zhang y Finn, 2004).

En Canadá, la vacunación anti *H. influenzae b* fue iniciada en 1992, y desde entonces se utiliza rutinariamente, pero se han reportado casos de MEB en niños vacunados y no vacunados entre los años 2001 y 2003, aunque Scheifele *et al* (2005), consideran la enfermedad invasiva por *H. influenzae b* rara en el país.

En 1994, la OMS recomendó la introducción de la vacuna anti *H. influenzae* b al esquema primario de vacunación de los Estados Miembros, dada la alta morbilidad que significaba la enfermedad invasiva por este germen, sobre todo, en países en desarrollo, ya que, en ausencia de tratamiento específicos e intensivo con antimicrobianos, los casos de MEB, podían significar cerca del 100% de mortalidad, y de ser tratados, podía ser reducida a un 5-8%. La mortalidad por neumonía por *H. influenzae* b puede estimarse en un rango entre 1-12% en países en desarrollo, el 12% corresponde a África Sub Sahariana (Jamison *et al*, 2006).

Las autoridades cubanas en 1999, considerando los resultados obtenidos por serotipaje de *H. influenzae*, en el LNRM-IPK, con la evidencia de que el serotipo b era el más frecuente, decidieron comenzar la vacunación con la vacuna conjugada anti *H. influenzae* b. La estrategia cubana para la vacunación, empleada por el MINSAP, consistió en inmunizar durante 1999, mediante campaña y programa, a todos los niños nacidos entre enero de 1998 y octubre de 1999. Se decidió utilizar la vacuna conjugada Vaxem-Hib® (Chiron SPD), compuesta por un oligosacárido, conjugado con una proteína no tóxica portadora (CRM 197), obtenida a partir de una cepa mutante de *Corynebacterium diphtheriae* no productora de toxina (Steinhoff y Goldblatt, 2003; Finn, 2004). El programa de vacunación se inició el 1 de enero de 1999 (Dickinson *et al*, 2001) (Anexos: 7, 7.1, 7.2, 7.3), lo que significa actualmente una cobertura nacional del 96% según el Programa Nacional de Inmunización (2006) (Galindo, 2006; Comunicación Personal) (Anexo 6).

En la Figura 1 y en el Anexo 6, se muestra la reducción obtenida en el número de casos de MEB por *H. influenzae* b, así como el impacto de la vacunación en la circulación de cepas, observándose un marcado descenso a partir de 1999. Este descenso continúa en los primeros cinco años del siglo XXI (DNE, 2006).

Posteriormente a la inmunización, se apreció una disminución considerable (52.8%) del total de casos de MEB, en los menores de dos años, lo que representó, además, un descenso importante de la incidencia general, de entre 1.5 x 100 000 habitantes en 1998, a 0.3 en el 2000, y a 0.0 x 100 000 habitantes en el 2005 y de la mortalidad en esos mismos años de 0.2 a 0.0 (Anexo 6; DNE, 2006; Programa Nacional de Inmunización, 2006; Galindo, 2006, Comunicación Personal). Estos resultados reflejan la efectividad, eficiencia y eficacia de la

vacuna, así como la excelente estrategia de inmunización puesta en práctica en Cuba (Dickinson *et al*, 2001), la que descansa, desde el 2005, en el empleo de la Vacuna Cubana Quimi-*Hib* (Heber-Biotec), (Vérez-Bencomo *et al*, 2004) (Anexo 7.3). Similares resultados a los de Cuba (Figura 1) han sido señalados por otros autores. En Estados Unidos, antes del comienzo de la inmunización contra *H. influenzae* b, las tasas de incidencia anuales de meningitis por este agente, en los menores de 4 años, fluctuaban entre 50 y 60 x 100 000 habitantes y luego de la introducción de la vacunación en 1988, la incidencia de la enfermedad disminuyó a 3.7 casos x 100 000 habitantes en 1991. En otros países como Gambia, después de iniciada la vacunación anti *H. influenzae* b en 1993, la incidencia anual de meningitis por este agente disminuyó de 200 x 100 000 habitantes en 1990 a 21 x 100 000 habitantes en 1993 (Santosham, 1993; Peltola, 2000<sup>b</sup>; CDC, 2001). Otros estudios realizados aportan evidencias de reducciones importantes en la incidencia de la enfermedad por este microorganismo. Datos provenientes del Reino Unido, Francia, Finlandia, Dinamarca, Holanda, Alemania, Australia y España, plantean una considerable disminución de casos en las poblaciones de niños donde la vacuna ha sido utilizada y la cobertura alcanza hasta el 90% (Peltola, 2000<sup>b</sup>; CDC, 2001) (Tabla 6). El informe realizado en el 2005 de los resultados del Programa SIREVA II (2005) de la región de las Américas, muestra lo ocurrido en Uruguay (1994), Chile (1996), Argentina (1998) y Colombia (1999) después de la vacunación (Anexo 8). En el mismo informe, se constata la relación que existe entre la disminución de la MEB a *H. influenzae* b, a medida que, se generaliza la vacunación. Esto lo hemos constatado en Cuba (Tabla 8; DNE, 2005; DNE, 2006; Galindo, 2006; Comunicación Personal; SNVMB, 2006).

**Tabla 6. Impacto de la introducción de la vacuna conjugada anti *H. influenzae* b en algunos países. Incidencia Pre y Postvacunal.**

País	Año de introducción	Tasa prevacunal	Tasa postvacunal
E. U.	1988	50-60 x 100000	3.7 x 100000
<b>REINO UNIDO</b>	1992	23.8 x 100000	0.9, 2.81 x 100000
<b>Gambia</b>	1997	200 x 100000	21 x 100000
<b>Brasil</b>	1998	168 x 100000	15 x 100000

Fuente: CDC, 2001; Peltola, 2002; DNE, 2006 ; Freitas, 2006

Expertos en el tema, plantearon que después de la introducción de la inmunización anti *H. influenzae* b, la epidemiología de la meningitis causada por este patógeno cambiaría definitivamente (Santosham, 2000; Adderson *et al*, 2001; Zhou *et al*, 2002), e incluso se plantearon nuevas hipótesis epidemiológicas postvacunales como son: una posible emergencia de otros tipos capsulares de cepas de *H. influenzae* (sobre todo los serotipos f, a y e, incluyendo cepas del serotipo b, con cápsula deficiente), la presentación de la MEB por traslado a otros grupos de edades no frecuente antes de comenzar la inmunización con vacuna anti *H. influenzae* b, aumento de casos de enfermedades invasivas por cepas *H. influenzae* no capsuladas y los posibles fallos vacunales (Barbour *et al*, 1995; Abegdola *et al*, 1998; Campos, 1999; Campos, 2003; Wandt *et al*, 2004; Fritzell, 2005).

Actualmente, se observa atentamente si estos planteamientos teóricos han cumplimentado o no las expectativas planteadas (Reid, 2006). En el caso de Cuba, los casos notificados de MEB por *H. influenzae* han sido escasos después de la introducción masiva de la vacunación en el 2000 y no se ha detectado un incremento de las cepas correspondientes a serotipos diferentes al b o de *H. influenzae* NT (Tabla 2).

El Sistema Nacional de Vigilancia de Meningitis Bacteriana IPK-MINSAP, reportó en los años 2004 y 2005: 413 casos de MEB (Tasa de 3.67 x 100 000) y 510 casos de MEB (Tasa de 4.5 x 100 000 habitantes) respectivamente, de los que eran de etiología *H. influenzae* b, solo 6 pacientes en el 2004 (Tasa de 0.1 x 100 000 habitantes). En el 2005, se reportó un aumento de las MEB, pero sólo a *H. influenzae* b dos casos (Tasa de 0.0 x 100 000) (DNE.

2004; DNE 2005; DNE, 2006; SNVMB-IPK, 2006). (Anexo 6). Los pacientes afectados por *H. influenzae* b en Cuba, después de la puesta en marcha del programa de vacunación, han sido niños, generalmente con esquemas de inmunización incompletos (Pérez, 2003, Comunicación Personal; Galindo, 2006, Comunicación Personal). Resultados similares se reportaron también en otros países (Barbour *et al*, 1995; Adegbola *et al*, 1999). Estudios bien documentados, exponen casos esporádicos debidos al serotipo b en países donde la vacuna se ha aplicado de forma generalizada, pero sin responder a un programa (Aracil y Campos, 2003). En el Reino Unido, la incidencia al comienzo de la vacunación se calculó en 23.8 x 100 000 habitantes en 1992, valor que disminuyó a 0,92 x 100 000 habitantes, al incorporar la vacuna conjugada al calendario de inmunizaciones (Tabla 6), pero este valor aumentó a 1.88 x 100 000 habitantes en el 2001 y a 2.81 x 100 000 habitantes, a finales del 2002, lo que puso en “alerta” a los microbiólogos y epidemiólogos, sobre todo, porque este ascenso fue reportado en niños “correctamente inmunizados” (Pushparajah *et al*, 2003; Trotter *et al*, 2003). En el esquema de vacunación aplicado en ese país, no se incluyó la dosis de refuerzo a los 15 meses, sin reportarse el por qué (McVernon y Heath, 2003; Pushparajah *et al*, 2003). En otros países como Holanda, donde el esquema sí incluye la dosis de refuerzo, también ha sido notificado un considerable aumento de casos por fallo vacunal y afirman desconocer sus causas (McVernon *et al*, 2003; Rijkers *et al*, 2003). Una explicación, pudiera ser, la disminución de los títulos de protectores de anticuerpos contra *H. influenzae* b, transcurrido un tiempo determinado después de implementada la vacunación de rutina o problemas en el logro de la cobertura.

La inmunidad natural contra *H. influenzae* b, basada primariamente, en anticuerpos desarrollados como respuesta a infecciones subclínicas (Leino *et al*, 2000; Tastan *et al*, 2000), puede verse seriamente afectada en las poblaciones vacunadas debido a la eliminación, casi total, de la circulación de *H. influenzae* b, incluso en los portadores sanos (Bakir, *et al*, 2002; SIREVA II, 2005). Ello hace que se cuestione, si la no reexposición natural al *H. influenzae* b, pueda influir en la presencia de anticuerpos protectores en cantidades suficientes y, de ser así, algunos se preguntan ¿cómo podrá lograrse que persista la memoria inmunológica por largos períodos? (Heath *et al*, 2000; Van Den Hof *et al*, 2001; Kelly *et al*, 2005).

Por lo que, resulta imprescindible, que al introducir la vacunación en un área determinada se mantenga un seguimiento efectivo y sistemático de la vigilancia respecto a la circulación de cepas de *H. influenzae*, así como a su caracterización, que debe incluir el análisis de las cepas obtenidas antes, durante y posteriormente a la inmunización y se necesita más investigación acerca de los portadores como fuente o reservorio de nuevas cepas de *H. influenzae* b. Esta medida puede ayudar a conocer el comportamiento de las cepas y las posibles variaciones en el tiempo y en una zona geográfica dada (Moxon, 1993, Talon *et al*, 2000; Varon *et al*, 2000; Raymond *et al*; 2001).

#### **4.7. Contribución del Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología IPK-MINSAP a la vigilancia de los Síndromes Neurológicos Infecciosos en Cuba**

Desde 1989, en el LNRM-IPK se lleva a cabo la vigilancia microbiológica de los SNI. A partir de esa fecha, todas las cepas viables de *H. influenzae* son colectadas en el país para su confirmación y caracterización. Ello ha permitido conocer las características de estas cepas asociadas a procesos invasivos, y en menor escala, las cepas aisladas de portadores. Tal como ya hemos citado al referirnos a la estrategia seguida para el comienzo de la vacunación, los resultados obtenidos por el LNRM-IPK-MINSAP mostraron desde 1986, la evidencia de que el *H. influenzae* b se encontraba asociado a procesos invasivos y el más frecuente entre los aislamientos procedentes de MEB en Cuba, con letalidad de cifras impresionantes. Las autoridades del MINSAP, decidieron aplicar la vacuna conjugada anti *H. influenzae* b, a partir de enero de 1999. Al tomar tal decisión, se tuvo en cuenta: 1. El número de casos de MEB con diagnóstico etiológico confirmado de *H. influenzae* b, (por la vigilancia microbiológica) los que se correspondían con los notificados anualmente en menores de 4 años, 2. La tórpida evolución clínica de los enfermos, con alta mortalidad, 3. Las secuelas ocasionadas, y 4. La efectividad lograda en los países con experiencia, en la aplicación de las vacunas conjugadas contra *H. influenzae* b (Mulholland *et al*, 1997; Peltola *et al*, 1999; CDC, 2001; Conyn-van Spaendonck *et al*, 2000; Garpenholt *et al*, 2001; Zhou *et al*, 2002; Garner y Weston, 2003; Hviid y Melbye, 2004; Kilgore y Nyambat, 2004; Tamargo 2005; Galindo, 2006; Comunicación Personal).

Paralelamente, un grupo de científicos en Cuba, dirigidos por Vérez-Bencomo, (2004) comenzó a investigar sobre la obtención de una vacuna anti *H. influenzae* b, lográndose en

el 2004, la primera vacuna conjugada anti *H. influenzae* b por síntesis química que se conozca, usada en el país desde el 2005, con valores de incidencia comparables a los obtenidos en Cuba y en otros países anteriormente descritos (Tabla 6) con otra vacuna. Por todo lo expuesto, se deduce a partir de esta experiencia positiva, la apertura de prometedoras expectativas para Cuba en el campo de la vacunología para el desarrollo de nuevas (hoy muy costosas) vacunas, dirigidas al control de enfermedades de etiología bacteriana (Vérez-Bencomo *et al*, 2004) (Tabla 6).

El hecho de la drástica disminución de casos de MEB por *H. influenzae*, en Cuba (Figura 1, Anexo 6), así como la reducción evidente en la disminución de la resistencia de *Hi* encontrada en la etapa postvacunal (Tabla 5), hace que podamos inferir como Tamargo (2005), que la estrategia de vacunación realizada en Cuba, no sólo ha contribuido significativamente a la disminución de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* b, sino también, a la reducción de la circulación de cepas resistentes y multirresistentes en nuestro medio.

No obstante, no se abandona la vigilancia clínico-epidemiológica-microbiológica y sistemática del *H. influenzae*, que comenzó en Cuba en el aspecto microbiológico hace ya diecisiete años en el LNRNM-IPK-MINSAP (Valdivia *et al*, 1995; Llop *et al* 1999).

## 5. CONCLUSIONES

- 1.- El estudio de las cepas de *Haemophilus influenzae* permitió conocer el comportamiento de la resistencia a los antimicrobianos utilizados.
- 2.- Se detectaron un alto nivel de resistencia a la ampicilina, la presencia de la enzima  $\beta$  lactamasa y la asociación de ésta con la resistencia mostrada.
- 3.- No se comprobó resistencia de las cepas a los antimicrobianos de segunda y tercera generación.
- 4.- Las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa, mostraron igual comportamiento en la etapa prevacunal y postvacunal.
- 5.- Se detectó un alto nivel de multirresistencia en las cepas de *Haemophilus influenzae* en la etapa prevacunal.
- 6.- La introducción en el esquema de inmunización de Cuba, de la vacuna conjugada anti *H. influenzae b*, resultó una estrategia efectiva en el control y eliminación de la MEB por este agente.
- 7.- El contar con la primera vacuna conjugada obtenida por síntesis química, coloca a Cuba entre los países con potencialidad en el campo de desarrollo de nuevas vacunas bacterianas.
- 8.- El LNRM-IPK ha conservado la historicidad de las cepas cubanas de *Haemophilus influenzae* asociadas a MEB, lo que permitió la realización del presente estudio.

## 6. RECOMENDACIONES

- 1.- Continuar el Monitoreo/Vigilancia epidemiológica y microbiológica de las cepas circulantes de *Haemophilus influenzae* aisladas de procesos invasivos y de portadores en Cuba.
- 2.- Continuar en Cuba, los estudios de los mecanismos genéticos relacionados con la resistencia de *Haemophilus influenzae*.
- 3.- Vigilar anualmente, la dinámica del estado inmunitario de la población protegida con la vacuna conjugada anti *Haemophilus influenzae* b, con énfasis en la vacuna cubana Quimi-*Hib*.
- 4.- Continuar la vigilancia sistemática de los reportes de casos de MEB.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiye M, Carroll K, *et al.* Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era?. *Pediatrics* 2001; 108(1): 18-20.
- Adegbola R A, Mulholland E K, Secka O. Vaccination with a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine reduces oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b among Gambian children. *J Infect Dis* 1998; 177:1758-61.
- Adegbola RA, Usen SO, Weber M, Lloyd-Evans N, Jobe K, Mulholland K, *et al.* *Haemophilus influenzae* type b meningitis in the Gambia after introduction of a conjugate vaccine. *Lancet* 1999; 354: 926-8.
- Almuneef M, Alshaalan M, Memish Z, Alalola S. Bacterial meningitis in Saudi Arabia: the impact of *Haemophilus influenzae* type b vaccination. *J Chemother* 2001; 13(1):34-9.
- Amarnath SK, Kanungo R, Rao RS, Srinivasan S. Multiply resistant *Haemophilus influenzae* type b causing meningitis. *Indian J Med Res* 1992; 95:187-9.
- Anderson P, Smith DH, Ingram DL. Antibody to polyribophosphate of *Haemophilus influenzae* type b in infants and children. Effect of immunization with polyribophosphate. *J Infect Dis* 1987; 136: 57-62.
- Aracil B, Campos J. Reciente incremento de los fallos vacunales por *Haemophilus influenzae* serotipo b. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(7):384-5.
- Arendrup M, Knudsen JD, Jensen ET, Jensen IP. Prevalence of resistance to ampicillin and other beta-lactam antibiotics in *Haemophilus influenzae* in Denmark. *Scand J Infect Dis* 2001; 33(4):266-70.
- Ayyildiz A, Aktas AE, Yazgi H. Nasopharyngeal carriage rate of *Haemophilus influenzae* in children aged 7-12 years in Turkey. *Int J Clin Pract.* 2003; 57(8):686-8.
- Bajanca-Lavado MP, Casin I, Vaz Pato MV. Antimicrobial resistance and epidemiological study of *Haemophilus influenzae* strains isolated in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:615-25.
- Bakir M, Yagci A, Ulger N, Akbenlioglu C, Liki A, Soyletir G *et al.* Pharyngeal colonization with *Haemophilus influenzae* type b among healthy Turkish infants and children. *Pediatr Int* 2002; 44(4):381-6
- Barbour ML, Booy R, Crook DW, Griffiths H, Chapel HM, Moxon ER. The impact of the conjugate vaccine on carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1995; 171:93-8.
- Barenkamp SJ, Munson RS, Granoff DM. Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer-membrane protein profiles. *J Infect Dis* 1981; 143(5):668-76.
- Barriere SL, Hindler J. Ciprofloxacin resistant *Haemophilus influenzae* in a patient with chronic lung disease. *Ann Pharmacother* 1993; 27:309-10

- Begum NN, Al-Khattaf AA, Kambai AM, Yeboah EA. Prevalence of *H. influenzae* biotypes and their clinical significance in a University Hospital. Saudi Med J 2003; 24(12):1308-12.
- Bell JM, Turnidge JD, Jones RN. Antimicrobial resistant trends in community-acquired respiratory tract pathogens in the Western Pacific Region and South Africa: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, (1998-1999) including an in vitro evaluation of BMS284756. Int J Antimicrob Agents 2002; 19(2):125-32.
- Benguigui Y, López FJ, Schmunis G, Yunes J. Infecciones respiratorias en niños. Washington, D.C. OPS, 1997.
- Ben-Hamouda T, Foulon T, Ben-Cheikh-Masmoudi A, Fendri C, Belhadj O and Ben-Mahrez K. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. J Med Microbiol 2003; 52:427-33.
- Biedenbach, D, Jones RN. Fluoriquinolona-resistant *Haemophilus influenzae*: frequency of occurrence and analysis of confirmed strains in the SENTRY antimicrobial surveillance program (North and Latin America). Diag Microbiol Infect Dis 2000; 36:255-6.
- Bisgard KM. *Haemophilus influenzae* type b invasive disease. VPD Surveillance Manual; Chapter 2. 1999:2-10.
- Blosser-Middleton R, Sahm DF, Thornsberry C, Jones ME, Hogan P, Critchley IA, et al. Antimicrobial susceptibility of 840 clinical isolates of *Haemophilus influenzae* collected in four European countries in 2000-2001. Clin Microbiol Infect 2003; 9(5): 43-6.
- Bokermann S, Zanella RC, Lemos AP, De Andrade AS, Brandileone MC. Evaluation of methodology for serotyping invasive and nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae* in the ongoing surveillance in Brazil. J Clin Microbiol 2003; 41(12): 5546-50.
- Brinton CC, Carter M, Derber DB, Kar S, Kramarik J, Wood SW. Design and development of pilus vaccines for *Haemophilus influenzae* diseases. J Pediatr Infect Dis 1989; 8:S54-S61.
- Brown SD, Rybak MJ. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* collected from patients across the USA, in 2001-2002, as part of the PROTEKT US study. J Antimicrob Chemother 2004; 54(1): 7-15.
- Bussetti M, Longo B, Campello C. Low rates of antimicrobial resistance in respiratory pathogen a pediatric population in north-eastern Italy. Pediatr Med Chir 2003; 25(2):131-34.
- Campos J, Garcia-Tornel S, Sanfeliu I. Susceptibility studies of multiply resistant *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric patient and contacts. Antimicrob Agents Chemother 1984; 25:706-9.
- Campos J. Enfermedad invasora por *Haemophilus influenzae* serotipo b. Med Clin (Barc) 1999; 112:16-7.
- Campos J. *Haemophilus influenzae*: from the post-vaccination era to antibiotic resistance. Clin Microbiol Infect 2001; 7(6):287-90.

- Campos J, Saez-Nieto JA. Gram negative infections: *Haemophilus* and other clinically relevant Gram negative coccobacilli. Laboratory diagnosis of bacterial infections. Ed Nevio Cimolai, Inc. New York, 2001.
- Campos J, Hernando M, Román F, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Oteo J, *et al.* Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. J Clin Microbiol 2004; 42(2): 524-9.
- CDC. Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b disease among infants and children-United States, 1987-1997. MMWR 1998; 47:993-8.
- CDC. National state, and urban area vaccination coverage levels among children aged 19-35 months. United States, 2000. MMWR 2001; 50:637-41.
- Cerquetti M, Ciofi ML, Renna G, Tozzi AE, Garlaschi ML, Mastrantonio P. Characterization of non-type B *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients with invasive disease. J Clin Microbiol 2000; 38(12):4649-52.
- Cerquetti M, Atti ML, Cardines R, Salmaso S, Renna G, Mastrantonio P. Invasive type e *Haemophilus influenzae* disease in Italy. Emerg Infect Dis 2003; 9(2): 258-61.
- Chang CC, Gilsdorf JR, DiRita VJ, Marrs CF. Identification and genetic characterization of *Haemophilus influenzae* genetic island 1. Infect Immun 2000; 68(5):2630-7.
- Choo S, Seymour L, Morris R, Quataert S, Lockhart S, Cartwright K, *et al.* Immunogenicity and reactogenicity of a pneumococcal conjugate vaccine administered combined with a *Haemophilus influenzae* type b vaccine in United Kingdom infants. Pediatr Infect Dis J 2000; 19(9):854-62.
- Clemans DL, Marrs CF, Bauer RJ, Patel M, Gilsdorf JR. Analysis of pilus ashesins from *Haemophilus influenzae* biotype IV strains. Infect Immun 2001; 69(11):7010-19.
- Cochi SL, Ward JI. *Haemophilus influenzae* type b. En: Evans AS, Brachman PS (eds.). Bacterial infections of humans; Epidemiology and control. New York & London: Plenum Publishing Corporation. 1991; 3:232-37.
- Conyn-van Spaendonck MA, Veldhuijzen IK, Suijkerbuijk AW, Hirasing RA. Significant decline of the number of invasive *Haemophilus influenzae* infections in the first 4 years after introduction of vaccination against *H. influenzae* type b in children. Ned Tijdschr Geneesk 2000; 144(22):1069-73.
- Corless CE, Gulver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol 2001; 39(4):1553-8.
- Cresti S, Giordano I, Donati E, Glaccherini R, Barberi A, Cellesi C. Prevalence and chemosusceptibility of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* in a population of central Italy. New Microbiol 2003; 26(3):281-8.
- Critchley IA, Blosser RS, Karlowsky JA, Yamakita J, Barth AI. Antimicrobial resistance in respiratory pathogens isolated in Brazil during 1999-2000. Braz J Infect Dis 2001; 5(6):294-304.

- Curran R, Hardie KR, Towner KJ. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of insertion mutations in the transferring-binding system of *Haemophilus influenzae* type b. J Med Microbiol 1994; 41(2):120-6.
- Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, *et al.* Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(7): 2208-18.
- Dabernat H, Plisson-Saune MA, Delmas C, Seguy M, Faucon G, Pelissier R *et al.* *Haemophilus influenzae* carriage in children attending French day care centers: a molecular epidemiological study. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1664-72.
- Dabernat H, Seguy M, Faucon G, Delmas C. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* strains identified in France, and assessment of their susceptibility to beta-lactamics. Med Mal Infect 2004; 34(2):97-101.
- Dagan R. Epidemiología del *Haemophilus influenzae* serotipo b a nivel mundial. Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica; 1997; 11: 567-8.
- Dagan R, Leibovitz E, Cheletz G, Leiberman A, Porat N. Antibiotic treatment in acute otitis media promotes superinfection with resistant *Streptococcus pneumoniae* carried before initiation of treatment. J Infect Dis 2001; 15(183): 880-6.
- Dajani AS, Asmar BI, Thirumoorthi MC. Systemic *Haemophilus influenzae* disease: an overview. J Pediatr 1979; 94:355-64.
- Dajani AS. Beta-lactam resistance: clinical implications for pediatric patients. J Int Med Res 2002; 30(1):2-9.
- Davidson R, Cavalcanti R, Bruton JL, Bast DJ, Azavedo JC, Kibsey P. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. N Engl J Med 2002; 346:747-50.
- Dawson KG, Emerson JC, Burns JL. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. Pediatr Infect Dis J 1999; 18(9): 816-22.
- De Abreu-Freitas HS, Merchén-Hamann N. Impacto de la vacuna conjugada en la incidencia de meningitis por *Haemophilus influenzae* en el Distrito Federal de Brasil: resultado de tres años de seguimiento. Rev Panam Salud Pública 2006; 19(1): 33-7.
- De Almeida AE, De Filippis I, Ferreira DG, De Abreu AO, Rebelo C, Gemal AL, Marzochi KB. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates collected from 4 centers in Brazil (1990-2003). Diag Microbiol Infect Dis 2006; 54(1): 57-62.
- De Andrade AL, Brandileone MC, Difabio JL, Oliveira RM, Silva SA, Baiocchi SS, *et al.* *Haemophilus influenzae* resistance in Latin America: systematic review of surveillance data. Microb Drug Resist 2001 ;( 4):403-11.
- Debbia EA, Schito GC, Zoratti A, Gualco L, Tonoli E, Marchense A. Epidemiology of major respiratory pathogens. J Chemother 2001; 13(1):205-10.

- Decker MD, Edwards KM, Bradley RM, Palmer PR. Comparative trial in infants of your conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccines. J Pediatr 1992; 120(2) 184-9.
- Del Campo R, Ruiz-Garbajosa P, Sanchez-Moreno MP, Baquero F, Canton R, Coque TM. Antimicrobial resistance in recent fecal enterococci from health volunteers and food handlers in Spain: genes and phenotypes. Microb Drug Resist 2003; 9(1):47-60.
- Devarajan VR. *Haemophilus influenzae* infections. Medicine J 2001; 2(8)1-23
- Dickinson FO, Pérez AE, Galindo MA, Quintana I. Impacto de la vacunación contra *Haemophilus influenzae* tipo b en Cuba. Pan Am J Public Health 2001; 10(3):169-74.
- Dickinson FO, Pérez AE. Bacterial meningitis in children and adolescents: an observational study based on the national surveillance system. BMC Infectious Dis 2005, 5:103.
- Dimopoulou ID, Jordens JZ, Legakis NJ, Crook DW. A molecular analysis of Greek and UK *Haemophilus influenzae* conjugative resistance plasmids. J Antimicrob Chemother 1997; 39:303-7.
- Dirección Nacional de Estadística, DNE, MINSAP. CNICM. Cuba. 2004.
- Dirección Nacional de Estadística, DNE, MINSAP. CNICM. Cuba. 2005.
- Dirección Nacional de Estadística, DNE, MINSAP. CNICM. Cuba. 2006.
- Domínguez A, Bou R, Sacher F, Fontanals D, Latorre C, Salleras L *et al.* A population based study of *Haemophilus influenzae* invasive disease in Catalonia. Vacuna 2002; 3:3-7
- Evans NM, Smith DD, Wicken AJ. Hemin and nicotinamide adenine dinucleotide requirements of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. J Med Microbiol 1974; 7:359-65.
- Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, and Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 1994; 32(10):2382-86.
- Farjo RS, Foxman B, Patel MJ, Zhang L, Pettigrew MM, McCoy SI, *et al.* Diversity and sharing of *Haemophilus influenzae* strains colonizing healthy children attending day-care centers. Pediatr Infect Dis J 2004; 23(1):41-6.
- Ferguson J. Antibiotic prescribing: how can emergence of antibiotic resistance be delayed? Aust Prescr 2004; 27:39-42.
- Fernández-Santana V, Cardoso F, Rodríguez A, Carmenate T, Pena L *et al.* Antigenicity and immunogenicity of synthetic oligosaccharide-protein conjugate vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. Infect Immun 2004; 72(12):7115-23.
- Finn A, Bacterial polysaccharide-protein conjugates vaccine. Br Med Bull 2004, 70:1-14.
- Flesher AR, Insel RA. Characterization of lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. J Infect Dis 1978; 138:719-30.

- Fohlman J, Blomberg J, Froman G, Engstrand L, Johansson A, Friman G. Microbial diagnosis with PCR will become clinically beneficial with a faster analysis. *Lakartidningen* 2004; 101(17):1488-92.
- Forleo-Neto E, Oliveira CF, Maluf EM, Bataglin C, Araujo JM, Kunz Jr LF, *et al.* Epidemiology of *H.influenzae*. *J Infect Dis* 1999; 180(4):1153-8.
- Forney LJ, Gilsdorf JR, Wong DL. Effect of pili-specific antibodies on the adherence of *Haemophilus influenzae* type b to human bucal cells. *J Infect Dis* 1992; 165:464-70.
- Fritzell B. Conjugate vaccines. *Therapie* 2005; 60(3): 249-55.
- Fuentes K, Tamargo I, Toraño G. *Haemophilus influenzae* en portadores sanos que asisten a círculos infantiles. *Rev Enf Inf Ped.* 2003; 15(60):128-34
- Fujita M, Fujimoto S, Morooka T, Amako K. Analysis of strains of *Campylobacter fetus* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1676-8.
- Galindo MA. 2006. Comunicación Personal.
- García-Rodríguez, JA, Baquero F, García de Lomas J, Aguilar L. Antimicrobial susceptibility of 1422 *H. influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain results of 1-year multicenter surveillance study. *Infection* 1999, 27:265-7.
- Garner D, Weston V. Effectiveness of vaccination for *Haemophilus influenzae* type b. *Lancet* 2003; 36:395-6.
- Garpenholt O, Fredlung H, Timpka T. Immunization against *Haemophilus influenzae* type b in Sweden. A study of the introduction process. *Scand J Public health* 2001; 2984:271-8.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the prokaryotes release 5.0: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> edition, 2004.
- Gazi H, Kurutepe S, Surucuoglu S, Teker A, Ozbakkloglu B. Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens in the oropharynx of healthy school children in Turkey. *Indian J Med Res* 2004; 1205:489-94.
- Geme ST, Cuther D Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* 1996; 21(1):21-31.
- Gilford JR, McCrea KW, Marrs CF. Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. *Infect Immun* 1997; 65(8):2997-3002.
- Gold R. Epidemiology of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13(3):515-25
- Gómez de León P, Cabrera CR, Cravioto A: *Haemophilus influenzae* b. Una revisión de los determinantes de patogenicidad y de la respuesta inmune a la infección. *Salud Pública de México.* 1991; 33:504-12.
- Gómez de León P, Santos JI, Caballero J, Gómez D, Espinosa LE, Moreno I, *et al.* Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from Mexican children determined

by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38(7):2504-11.

- Granoff DM, Ward JI. Current status of prophylaxis for *Haemophilus influenzae* infections. En: Current clinical topics in infectious diseases. New York: Mc Graw-Hill Inc: 1984:290-315.
- Granoff DM, Cates KL. *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *J Pediatr* 1985; 105:330-6.
- Gratten M, Manning K, Dixon J, Morey F, Torzillo P, Hanna J, *et al.* Upper airway carriage by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in Australian aboriginal children hospitalized with acute lower respiratory infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994; 25:123-31.
- Grundy FJ, Plaut AG, Wright A. Localization of the cleavage site specificity determinant of *Haemophilus influenzae* immunoglobulin A1 protease genes. *Infect Imm* 1990; 58:320-21.
- Gunn BA, Woodall JB, Jones JF, and Thornsberry C. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Lancet* 1974; 1234:845-49.
- Hasegawa K, Kobayashi R, Takada E, Ono A, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K. High prevalence of type b beta-lactamase-non-producing ampicillin-resistant in meningitis: the situation in Japan where *Hib* vaccine has not been introduced. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(6) 1077-82.
- Heath PT, Booy R, Azzopardi H, Slack MP, Bowen-Morris J, Griffiths H *et al.* Antibody concentration and clinical protection after Hib conjugate vaccination in the United Kingdom. *JAMA* 2000; 284: 2334-40.
- Hiltke TJ, Sethi S, Murphy TF. Sequence stability of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae* in the human respiratory tract. *J Infect Dis* 2002; 185(5):627-31.
- Hjaltsted EK, Bernatoniene J, Erlendsdottir H, Kaltenis P, Bernatoniene G, Gudnason T, *et al.* Resistance in respiratory tract pathogens and antimicrobial use in Icelandic and Lithuanian children. *Scand J Infect Dis* 2003; 35(1):21-6.
- Hiltke TJ, Schiffmacher AT, Dagonese AJ, Sethi S, Murphy TF. Horizontal transfer of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*, in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* 2003; 188(1):114-7.
- Hjaltsted EK, Bernatoniene J, Erlendsdottir H, Kaltenis P, Bernatoniene G, Gudnason T, *et al.* Resistance in respiratory tract pathogens and antimicrobial use in Icelandic and Lithuanian children. *Scand J Infect Dis*.2003; 35(1):21-6.
- Hobson RP, Williams A, Rawal K, Pennington TH, and Forbes KJ. Incidence and spread of *Haemophilus influenzae* on an Antarctic base determined using the polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 1995; 114:93-103.
- Hoepelman AIM. Levofloxacin in the medical management of community-acquired pneumonia. *Penet Annual Issue* 2004:16-24.

- Homedes N, Ugalde A. Multisource drug policies in Latin America: survey of 10 countries. *Bull World Health Org* 2005; 83(1):64-70
- Hua CZ, Yu HM, Shang SQ, Li JP, Chen ZM, Wang JH. Serotypes and antibiotics-resistance patterns of 247 strains of *Haemophilus influenzae* isolated from children in Hangzhou. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2004; 42(11):854-58.
- Hviid A, Melbye M. Impact of routine vaccination with a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Vaccine* 2004; 22:378-82.
- Inoue M, Kohno S, Kaku M, Yamaguchi K, Igari J, Yamanaka K. PROTEKT 1999-2000: a multicenter study of the antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens in Japan. *Int J Infect Dis* 2005; 9(1):27-36.
- Ishiwada N, Cao LD, Kohno Y. PCR based capsular serotype determination of *Haemophilus influenzae* strains recovered from Japanese pediatric patients with invasive infection. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(10):895-8.
- Jamison D, Breman JG, Measham JR, Alleyne G, Claeson M, EvansDB, Jha P, Mills A, Musgrove P. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. Second Edit. Oxford University Press and the World Bank. 2006.
- Jones ME, Karlowky JA, Blosser-Middleton R, Critchley IA, Thornsberry C, Sahn DF. Apparent plateau in beta-lactamase production among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in the United States: results from LIBRA Surveillance initiative. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19(2):119-23.
- Jones ME, Blosser M, Critchley IA, Karlowky JA, Thomsberry C, Sahn DF. In vitro susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: a European multicenter study during 2000-2001. *Clin Microb Infect* 2003; 9(7):590-93.
- Jordens JZ, Slack MPE. *Haemophilus influenzae*: then and now. *Eur J Clin Microbiol Dis* 1995; 14:935-48.
- Jorgensen JH, Redding JS, Maher LA and Howell W. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2105-13.
- Jorgensen JH, Howell AW, Maher LA. Antimicrobial susceptibility testing of less commonly Haemophilus species using Haemophilus test medium. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (5): 985-8.
- Jorgensen JH, Howell AW, Maher LA. Quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* by using the E-test. *J Clin Microbiol* 1991; 29(1): 109-14.
- Juteau JM, Levesque RC. Sequence analysis and evolutionary perspectives of ROB-1  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(7):1354-9.
- Karlowky JA, Thornsberry C, Critchley IA, Jones ME, Evangelista AT, Noel GJ, *et al.* Susceptibilities to Levofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* Clinical Isolates from Children: Results from 2000-2001 and 2001-

- 2002 TRUST Studies in the United States. *Antimicrob Agent Chemother* 2003; 47(6): 1790-7.
- Kawai S, Ochi M, Nakagawa T, Goto H. Antimicrobial therapy in community acquired pneumonia among emergency patients in a university hospital in Japan. *J Infect Chemother* 2004 10(6):352-8.
  - Kelly DF, Pollard AJ, Moxon ER. Immunological memory. The rolls of B cells en long-term protection against invasive bacterial pathogens. *JAMA* 2005; 294(23): 3019-23.
  - Kilgore PE, Nyambat B. Introducing new vaccines in developing countries: concepts approaches to estimating burden of *Haemophilus influenzae* type b associated disease. *J Health Popul Nutr* 2004; 22(3):246-56.
  - Kilian M, Mestercky J, Shrohenloher RE. Pathogenic species of the genus *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A protease. *Infect Immun* 1979<sup>a</sup>; 26:143-49.
  - Kilian M, Sorensen J, Frederiksen W. Biochemical characteristics of 130 recent isolates from *Haemophilus influenzae* meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 1979<sup>b</sup>; 9:409-12.
  - Kimura A, Gulig P, Craken G, Lofthus T, Hansen E. A minor high molecular weight outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b is a protective antigen. *Infect Immun* 1985; 47:253-9.
  - Klugman KP, Madhi SA. Emergence of drug resistance. Impact on bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13(3):637-46.
  - Kristiansen BE, Sandnes RA, Mortensen L, Tveten Y, Vorland L. The prevalence of antibiotic resistance in bacterial respiratory pathogens from Norway is low. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(12):682-7.
  - Kurkdjian PM, Bourrillon A, Holvoet-Vermau L, Bingen E. Pathology of *Haemophilus* infections: current situation in pediatrics. *Arch Pediatr* 2000; 7(3)551-8.
  - Kwak YH, Jung HS, Park SE, Park JY, Kim EC, Lee HJ. Serotypes and antimicrobial susceptibility in clinical isolates of *Haemophilus influenzae* from Korean children in prevaccination era. *J Korean Med Sci* 2000; 15(6):616-22.
  - Kyd JM, Cripps AW, Novotny LA, Bakaletz LO. Efficacy of the 26-kilodalton outer membrane protein and two P5 fimbrin-derived immunogens to induce clearance of nontypeable *H.influenzae* from the rat middle ear and lungs as well as from the chinchilla middle ear and nasopharynx. *Infect Immun.* 2003; 71(8):4691-9.
  - Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología IPK-MINSAP. Base de Datos. 2006.
  - Leaves NI, Dimopoulou I, Hayes I, Kerridge S, Falla T, Secka O, *et al.* Epidemiological studies of large resistance plasmids in *Haemophilus*. *J Antimicrob Chemother* 2000(45):599-604.
  - Lee DK, Khoo KC, Dushianthan A, Currie GP. Are colonial *Haemophilus influenzae* responsible for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease after all? *Am J Resp Crit Care Med* 2005; 171(2):194-6.

- Leibovitz E, Jacobs MR, Dagan R. *Haemophilus influenzae*: a significant pathogen in acute otitis. *Pediatr Infect Dis* 2004; 23(12):1142-52.
- Leidy G, Hahn E, Zamenhof S, Alexander HE. Biochemical aspects of virulence of *Haemophilus influenzae*. *Annals of the New York Academy of Science* 1960; 88:1195-1202.
- Leino T, Auranen K, Makela PH, Kayhty H, Takala AK. Dynamics of natural immunity caused by subclinical infections, case study on *Haemophilus influenzae* type b (Hib). *Epidemiol Infect* 2000; 125(3):583-91.
- Levin B. Drug resistance: we may not be able to go back again. *New and resurgent infections*. Brain Greenwood and Kavin de Cock. John Wiley and Sons, 1998.
- Levy, J, Verhaegen, G., De Mol, P., Couturier, M., Dekegel, D., Butzler, J.P. Molecular characterization of resistance plasmids in epidemiologically unrelated strains of multiresistant *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology* 1993; 138: 584-97
- Li X, Mariano N, Rahal JJ, Urban CM, Drlica K. Quinolone-resistant *Haemophilus influenzae*: determination of mutant selection window for ciprofloxacin, garenoxacin, levofloxacin, and moxifloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(11):4460-2.
- Lister PD. Emerging resistance problems among respiratory tract pathogens. *Am J Manag Care* 2000; 6(89):409-18.
- Liu VC. Molecular mechanism on *H. influenzae* pathogenicity. *Antib Chemother* 1992; 45(1):30-54.
- Llop A, Tamargo IT, Pérez M, Toraño GP, Ramírez M, Bravo L, *et al*. Resistencia a los antimicrobianos y vigilancia microbiológica en Cuba. *Rev Panam Infectol* 1999 (Supp 1): 33-40.
- Lolekha S, Cooksley G, Chan V, Isahak I, Ismael S, John J, *et al*. A review of *Haemophilus influenzae* b epidemiology in Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31(4):650-57.
- Low D, Scheld WM. Strategies for stemming the tide of antimicrobial resistance. *JAMA* 1998; 279:395-5.
- Machka K, Braveny I, Dabernat H, Dornbusch K, Van Dyck E. Distribution and resistance patterns of *Haemophilus influenzae*: A European cooperative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.1988 7(1):14-24.
- Male CJ. Immunoglobulin A protease production by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1979; 26:254-61.
- Manual de Operaciones y Procedimientos. MOP. LNR-IRA-IPK. 2005
- Marco F, García de Lomas J, García RC, Bouza E, Aguilar L, Fernández MC. Antimicrobial susceptibilities of 1730 *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Spain in 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(11):3226-28.

- Mathies AW. Penicillin's in the treatment of bacterial meningitis. Journal of the Royal College of Physicians of London 1972; 6:139-46.
- Mbelle N, Huebner RE, Wasas AD, Kimura A, Cheng I, Klugman KP. Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine. Infect Dis 1999; 180(4):1171-6
- McVernon J, Andrews N, Slack MP, Ramsay ME. Risk of vaccine failure after *Haemophilus influenzae* type b (HIB) combination vaccines with acellular pertussis. Lancet 2003; 361:1521-3
- McVernon J, Heath J. Re-enforcement of *Haemophilus influenzae* immunization required. Comm Dis Public Health 2003; 6:2-4.
- Melo-Cristino J, Fernandez ML, Serrano N. A multicenter study of the antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in 1999 in Portugal. Microb Drug Resist 2001; 7(1):33-38.
- Menzies R, McIntyre P. Vaccine preventable diseases and vaccination policy for indigenous populations. Epidemiol Rev 2006; 28(1); 71-80.
- Mendelman PM, Smith AL. *Haemophilus influenzae*. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999; 117-40.
- Mertsola J. In vivo and in Vitro expression of *Haemophilus influenzae* type b lipooligosaccharide epitopes. J Infect Dis 1991; 164:555-63.
- Millar EV, O'Brien KL, Levine OS, Kvamme S, Reid R, Santosham M. Toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b carriage and disease among high-risk American Indian children. Am Public Health 2000; 90:1550-4..
- Miyazaki S, Fujikawa T, Matsumoto T, Tateda K, Yamaguchi K. Efficacy of azithromycin, clarithromycin and  $\beta$ -lactamase agents against experimentally induced bronchopneumonia caused by *Haemophilus influenzae* in mice. J Antimicrob Chemother 2001(48):430-45.
- Morrissey I, Robbins M, Viljoen L, Brown DF. Antimicrobial susceptibility of community acquired respiratory pathogens in the UK during 2002/2003 determined locally by BSAC methods. J Antimicrob Chemother 2005; 40(2):254-8.
- Moxon ER, Anderson P. Meningitis cause by *Haemophilus influenzae* in infants rats. Prospective immunity and antibody priming by gastrointestinal colonization with *Escherichia coli*. J Infect Dis 1989; 140:471-8.
- Moxon ER. The carrier state. *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother. 1993; 18 (Suppl A): 17-24.
- Mulholland K, Hilton S, Adegbola R, Usen S, Oparaugo A, Omosigho C. Randomized trial of *Haemophilus influenzae* type b tetanus protein conjugate for prevention of pneumonia and meningitis in Gambian infants. Lancet 1997; 349(1):191-7.

- Munson R. *Haemophilus influenzae*: Surface antigens and aspects of virulence. Can J Vet Res 1990; 54(Suppl):563-7.
- Munson RS, Kaber MH, Lenoir AA, Granoff DM. Epidemiology and prospects for prevention of disease due to *Haemophilus influenzae* in developing countries. Rev Infect Dis 1999; 11: S 588-97.
- Murphy TV, Pastor P, Medley F. Decreased *Haemophilus* colonization in children vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. J Pediatr 1993; 122:517-23.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 2000. Fifth Edition. Approved Standard M7-A5. Wayne, PA, USA.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth Informational Supplement 100-S12 2002; 22(1). Approved Standard M2-A5, Wayne, PA, USA.
- Neto AS, Lavado P, Flores P, Dias R, Pessanha MA, Sousa E, *et al*. Risk factors for the nasopharyngeal carriage of respiratory pathogens by Portuguese children: phenotype and antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist. 2003; 9(1):99-108.
- Neu HC. The crisis of antibiotic resistance. Science 1992; 257: 1064-1073.
- Novakova E, Gessner BD, Olear V. Incidence of *Haemophilus influenzae* type b meningitis among children less than 5 years of age in Slovakia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18 ;( 6):409-13
- Oberhofer TR, Back AE. Biotypes of *Haemophilus influenzae* encountered in clinical laboratories. J Clin Microbiol 1993; 31(3): 789-96.
- Obonyo CO, Lau J. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b vaccination of children a meta-analysis. Eur J Clin Microbiol infect Dis 2006; 25(2): 90-7.
- Ohkusu K, Nakamura A, Sawada K. Antibiotic resistance among recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in Japanese children. Diag Microbiol Infect Dis 2000; 36:249-54.
- Olowokure B, Hunwker J, Blair I, Spencer N. Decrease in effectiveness of routine surveillance of *Haemophilus influenzae* disease alter introduction of conjugate vaccine: comparison of routine reporting with active surveillance system. BMJ 2000; 321:731-3.
- O'Neill JM, St Geme III JW, Cutter D, Adderson EE, Anyanwu J, Jacobs RF *et al*. Invasive disease due to nontypeable *Haemophilus influenzae* among children in Arkansas. J Clin Microbiol 2003; 41(7): 3064-69.
- OPS. Programa especial para vacunas e inmunización. Sistema regional de vacunas. Taller sobre la identificación bioquímica y serológica de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. Managua, Nicaragua. 1998.

- Peltola H, Kayhty H, Virtanen M, Makela PH. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteriemia infections with the capsular polysaccharide vaccine. *J Med* 1984; 310:1561-66.
- Peltola H, Aavitsland P, Hansen KG. Perspective: A five-country analysis of the impact of four different *Haemophilus influenzae* type b conjugates and vaccination strategies in Scandinavia. *J Infect Dis* 1999; 179:223-9.
- Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21<sup>st</sup> Century: Global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microb Rev* 2000<sup>a</sup>; 13(2):302-17.
- Peltola H. Burden of meningitis and other severe bacterial infections of children in Africa: Implications for prevention. *Clin Infect Dis* 2000<sup>b</sup>; 11(32):12-6.
- Perdue DG, Bulkow LR, Gellin BG, Daidson M, Petersen KM, Singleton RJ. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in Alaskan residents aged 10 years and older before and after infant vaccination programs. *JAMA* 2000; 283(23):3089-94.
- Pereira MB, Pereira MR, Cantarelli J, Costa SS. Prevalence of bacteria in children with otitis media with effusion. *J Pediatr* 2004; 80(1):41-48.
- Pérez, AE. 2006. Comunicación personal.
- Pérez VM, Román F, Varela MC, Cantón R, Campos J. Activities of 13 quinolones by three susceptibility testing methods against a collection of *Haemophilus influenzae* isolates with different levels of susceptibility to ciprofloxacin: evidence for cross-resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:147-151.
- Perilla M, Ajello G, Bopp Ch, Elliot J, Facklam R, Knapp J *et al.* CDC. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.2
- Peter G. Committee on Infectious Diseases. *Haemophilus influenzae* infections in Red Book report of the Committee on infectious diseases. Elk Grove Village, IL, American Academy of Pediatric, 1994.
- Pettigrew MM, Foxman B, Ecevit Z, Marrs CF, Gilsdorf J. Use of pulsed-field gel electrophoresis, enterobacterial repetitive intergenic consensus typing, and automated ribotyping to assess genomic variability among strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2):660-2.
- Pfeiffer R. Die Aetiologie der Influenza. *Z Hyg Infektionskr* 1893; 13:357-86.
- Pichichero ME, Loeb M, Anderson P, Smith DH. Do pili play a role in the pathogenicity of *Haemophilus influenzae* b? *Lancet* 1982; 2:960-2.
- Pichichero ME, Insel RA. Mucosal antibody response to parenteral vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsule. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72:481-6.
- Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J Exp Med* 1931; 53: 471-92.

- Ponte C, Cenjor C, Parra A, Nieto E, García CG, Gimenez MJ, *et al.* Antimicrobial treatment of an experimental otitis media caused by a beta-lactamase positive isolate of *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother 1999; 44(1):85-90.
- Popovic T, Schmink S, Rosenstein NA, Ajello GW, Reeves MW, Plikaytis B, *et al.* *Haemophilus influenzae* infections. J Clin Microbiol 2001; 39(1):75-85.
- Powell M, Koutsia-Carozou C, Voutsinas D, Seymour A, Williams JD. Resistance of clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in United Kingdom 1986. British Medical Journal 1987; 295:176-9.
- Preston NW. Why the rise in *Haemophilus influenzae* type b infections? Lancet 2003; 26(362):330-1.
- Programa Nacional de Inmunización. MINSAP. 2006. Cuba.
- Puliyel JM, Agarwal KS, Abass AF. Natural immunity to *Haemophilus influenzae* b in infancy in Indian children. Vaccine 2001; 14(19):4592-4.
- Pushparajah K, Ramnarayan P, Maniyar A, Paget R, Britto J. Continued threat of *Haemophilus influenzae* type b disease in the U.K. Lancet 2003;361:90-94.
- Raymond J, Armand-Lefevre L, Moulin F, Dabernat H, Commeau A, Gendrel D, *et al.* Nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in children living in an orphanage. Pediatr Infect Dis J 2001;20(8):779-84.
- Reid S. Evolution of the New Zealand childhood immunization schedule from 1980: a personal view. N Z Med J 2006; 119(1236) U2035.
- Reinert R, Rodloff AC, Halle E, Baer W, Beyreiss B. Antibacterial resistance of community acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Germany and the ketolide telithromycin: Results from PROTEKT surveillance study (1999-2000). Chemotherap 2004; 50(3):143-51.
- Rey LC, Farhat CK. Prevalencia de *Haemophilus influenzae* resistentes a ampicilina, cefaclor, cefotaxima, cloranfenicol e cotrimoxazol isolados de laboratorios na cidade de Sao Paulo. J Pediatr 1997; 73(1):26-31.
- Rijkers GT, Vermeer-de Bondt P, Spanjaard L, Breukels MA, Sanders EAM. Return of *Haemophilus influenzae* type b infections. Lancet 2003; 31:1563-4.
- Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution. FEMS Microbiol Rev 1996(19):1-24.
- Rodríguez JC, Silva Filho LV, Bush A. Etiological diagnosis of pneumonia a critical view. J Pediatr (Rio J) 2002; 78(2):129-40.
- Rolle U. *Haemophils influenzae* cellulites after bite injuries in children. J Pediatr Surg 2000; 35(9):1408-1409.
- Rubin LG, Moxon ER. Pathogenesis of blood streams invasion with *Haemophilus influenzae* b. Infect Immun 1983; 41:280-84.

- Sakata H. Mutation of penicillin-binding protein genes and antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolated from spinal fluid or blood in children. *Kansenshogaku Zasshi* 2002; 76(4):280-4.
- Sanchez F, Mensa J, Martínez JA, Angrill J, Marco MA, Coll-Vinent B, *et al.* Pneumonia due to *Haemophilus influenzae*. Study in a series of 58 patients. *Rev Esp Quimioter* 1999; 12(4):369-74.
- Santosham M. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. *Vaccine* 1993; 11(1):53-60.
- Santosham M. Can *Haemophilus influenzae* type b disease be eliminated from the United States? *J Pediatr* 2000; 37(3):295-7.
- Sarangi J, Cartwright K, Stuart J, Brookes S, Morris R, Slack M. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults. *Epidemiol Infect* 2000(124): 441-7.
- Scheifele D, Halperin S, Law B, King A. Invasive *Haemophilus influenzae* type b infections in vaccinated unvaccinated children in Canada, 2001-2003. *CMAJ* 2005; 172(1):53-6.
- Schito GC, Debbia A, Marchese. The evolving threat of antibiotic resistance in Europe: new data from the Alexander Project. *J Antimicrob Chemother* 2000(46):3-9.
- Seaton RA, Steinke DT, Phillis G, MacDonald T, Davey PG. Community antibiotic therapy, hospitalization and subsequent respiratory tract isolation of *Haemophilus influenzae* resistant to amoxicillin: a nested case-control study. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(2):307-309.
- Sell SH, Wright P. *Haemophilus influenzae*. Epidemiology, immunology and prevention of disease. New York: Elsevier Biomedical Science Publishing Company Incorporated, 1982.
- Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell* 1984;37:67-70.
- Shapiro E D and Ward J I. The epidemiology and prevention of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Epidemiologic Reviews*. 1991; 13:113-142.
- Sharma A, Kaur R, Ganguly NK, Singh PD, Chakraborti A. Subtype distribution of *Haemophilus influenzae* isolates from north India. *J Med Microbiol* 2002; 51(5):399-404.
- Shimada K, Oguri T, Igari J, Ikemoto H, Mori T, Kitamura N, *et al.* Susceptibilities of bacteria isolated from patients with respiratory infectious diseases. *Jpn J Antibiot* 2003; 56(5):365-395.
- Simarro E, Ruiz J, Gómez J, Ortega MG, Vicente C, Martínez L. Infecciones por *Haemophilus influenzae* en niños menores de 5 años en la comunidad murciana durante el período 1992-1999. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18:325-8.
- Singhi SC, Mohankumar D, Singhi PD, Sapru S, Ganguly NK. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) for diagnosing *Haemophilus influenzae* b meningitis. *Ann Trop Paediatr* 2002; 22:347-53.

- SIREVA II. OPS/OMS. 2005.
- Sistema Nacional de Vigilancia de Meningitis Bacteriana (SNVMB). IPK-MINSAP 2006.
- Skoczynska A, Kriz P, Konradsen HB, Hryniewicz W. Characteristics of the major etiologic agents of bacterial meningitis isolated in Poland in 1997-1998. *Microb Drug Resist* 2000; 6(2):147-53.
- Slack MP, Azzopardi HJ, Hargreaves M, Ramsay ME. Enhanced surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England 1990 to 1996: impact of conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17:204-207.
- Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A Virus obtained from influenza patients. *Lancet* 1933; 2:66-8.
- Smith-Vaughan HC, Sriprakash KS, Leach AJ, Mathews JD, Kemp DJ. Low genetic diversity of *Haemophilus influenzae* type b compared to non encapsulated *H. influenzae* in a population in which *H. influenzae* is highly endemic. *Infect Immun* 1998; 60:3403-9.
- Steinhoff M, Goldblatt D. Conjugate *HIB* vaccines. *Lancet* 2003; 361:360-1.
- Stratchunski LS, Kretchkova OI, Reshedko GK, Stetsiouk OU, Kandalov MM, Egorova OA, *et al.* Antimicrobial susceptibility of nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae* from healthy children in day-care centers: results of multicenter study in Russia. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18(4):327-51.
- Takemura NS, De Andrade S. *Haemophilus influenzae* type b meningitis in the state of Paraná, Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 2001; 77(5):387-92.
- Talon D, J. Leroy, M. J. Dupont, X. Bertrand, F. Mermet, M. Thouverez *et al.* Antibiotic susceptibility and genotypic characterization of *Haemophilus influenzae* strains isolated from nasopharyngeal specimens from children in day-care centers in eastern France. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(10):519-20.
- Tamargo I. Tesis Doctoral. Caracterización de aislamientos de *Haemophilus influenzae* en Cuba. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Cuba. 2005.
- Tastan Y, Alikasifoglu M, Ilter O, Erginoz M, Arvas A, Yuksal D, *et al.* Natural immunity to *Haemophilus influenzae* type b among healthy children in Istanbul, Turkey. *Indian Pediatrics* 2000; 37:414-17.
- Tauber T, Lahat E, Dolinsky G, Karpuch J, Frenkel Y, Livne A. *Haemophilus influenzae* b type vaccine in Israel: experience in a pediatric ambulatory clinic. *Ann Trop Pediatr* 2001; 21(3):231-4.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murria BE, Persing DH. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9):2233-9.
- Thornsberry C. Review of in vitro activity of third-generation cephalosporin and other newer beta-lactam antibiotics against clinically important bacteria. *Am J Med* 1985;79 (Suppl 2A):14-20.

- Trotter CL, Vernon Mc J, Andrews NJ, Burrage M, Ramsay ME. Antibody to *Haemophilus influenzae* type b after routine and catch-up vaccination. *Lancet* 2003; 3(361):1523-4.
- Tsen HY, Lin JS, Hu HH, Liu PR, Wang TK. Use of pulsed field gel electrophoresis as an epidemiological tool for analysis of sporadic associated strains of *Salmonella thyphi* isolated in Taiwan. *J Applied Microbiol* 1999; 86:761-8.
- Turk DC. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol* 1984; 18:1-16.
- Turnak MR, Bandak SI, Bouchillon SK, Allen BS, Hoban DJ. Antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected during 1999-2000 from 13 countries. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(12):671-7.
- Tuyau JE, Sims W. Aspects of the pathogenicity of some oral and other haemophili. *J Med Microbiol* 1983; 16:467-75.
- Ueyama T, Kurono Y, Shirabe K, Takeshita M, Mogi G. High incidence of *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal secretions and middle ear effusions as detected by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33(7):1835-41.
- Urwin G, Krohn K, Deaver-Robinson K, Wenger J, Farley T. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the *Haemophilus influenzae* serotype b vaccine era. *Clin Infect Dis* 1996; 22:1069-76.
- Valdivia JA, Tamargo I, Pérez M, Lera A, Valdés A. Resistencia a drogas antimicrobianas de cepas de *Haemophilus influenzae* b aisladas de pacientes con Síndrome Neurológico Infeccioso. *Rev Cubana Med Trop* 1995 ; 45 :173-6.
- Van Alphen L, Riemens T, Zanene HC. Antibody response against outer membrane components of *Haemophilus influenzae* type b strains in patients with meningitis. *FEMS Microbiology letters* 1983<sup>a</sup>; 18:189-95.
- Van Alphen I, Riemens T, Poolman J, Zanen HC. Characteristics of major membrane proteins of *Haemophilus influenzae*: pathogenic and epidemiological implications. *J Bacteriol* 1983<sup>b</sup>; 155:878-85.
- Van Alphen L. The molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae*. *Rev Med Microbiol* 1993; 4:159-66
- Van Den Hof S, De Melker HE, Berbers GA, Van Der Kraak PH, Spaendonck MA. Antibodies to *Haemophilus influenzae* serotype b in the Netherlands a few years after the introduction of routine vaccination. *Clin Infect Dis* 2001; 32(1):2-8.
- Varon E, Levy C, De La Rocque F, Boucherat M, Deforche D, Podglajen I, *et al*. Impact of antimicrobial therapy on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Branhamella catarrhalis* in children with respiratory tract infections. *Clin Infect Dis* 2000; 31(2):477-81
- Vérez-Bencomo V, Fernández-Santana V, Hardy E, Toledo ME, Rodríguez MC, *et al*. A Synthetic Conjugate Polysaccharide Vaccine Against *Haemophilus influenzae* Type b. *Science* 2004 ; (305):522-25.

- Villo-Sirerol N, Blanco JE, Sevilla P, Vegas G, García MA. *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b invasive disease. A 12 year retrospective study. *An Pediatr* 2004; 61(2):150-5.
- Votava M, Stritecka M. Preservation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* at -70 degrees C. *Cryobiology* 2001; 43(1):85-7.
- Wandt F, Kiagi G, Duke T. Long term outcome for children with bacterial meningitis in Papua New Guinea. *J Trop Pediatr* 2004; 15(2):34-8.
- Wang CC, Siu LK, Chen MK, Yu YL, Lin FM, Ho M *et al.* Use of automated riboprinter and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological studies of invasive *Haemophilus influenzae* in Taiwan. *J Med Microbiol* 2001; 50(3):277-83.
- Weinberg AG and Granoff DM. Polysaccharide-protein conjugate vaccines for the prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. *J Pediatr* 1988; 113(4):621-31.
- Weiser JN. Relationship between colony morphology and the life cycle of *Haemophilus influenzae*: the contribution of lipopolysaccharide phase variation to pathogenesis. *J Infect Dis* 1993; 168:672-80.
- WHO Report of Infections Diseases. Overcoming Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/2000.2.
- Wilfred CM. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b infections. *Pediatrics* 1990; 85:631-5.
- Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE. The families and genera of the bacteria: final report of the committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J Bacteriol* 1920; 5:191-229
- Wood WB. Phagocytosis, with particular reference to encapsulated bacteria. *Bacteriological Reviews* 1960; 24:41-9.
- Xin-Xing Gu, Susan FR, Chiayung Chu, Linda McCullagh, Hung NK, Chen J. Phase I study of a lipooligosaccharide-based conjugated vaccine against nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Vaccine* 2003; 21:2107-14.
- Yano H, Suetake M, Kuga A, Irinoda K, Okamoto R, Kobayashi T, *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2):625-9.
- Yano H. Analysis of nasopharyngeal flora in children with acute otitis media attending a daycare center. *Jpn J Antibiot.* 2003; 56(1):87-92
- Yasutomi M. Refractory acute otitis media and the risk factors. *Jpn J Antibiot.* 2001; 54(Suppl B):101-3.
- Yeh YH, Chu PH, Yeh CH, Wu YJ, Lee MH, Jung SM, *et al.* *Haemophilus influenzae* pericarditis with tamponade as the initial presentation of systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Pract* 2004; 58(11):1045-7.

- Yoshizumi S, Takahashi Y, Watanabe Y, Okezaki E, Ishii Y, Tateda K. In vitro antibacterial activities of new fluoroquinolones against clinical isolates of *Haemophilus influenzae* with ciprofloxacin-resistance associated alterations in *GyrA* and *ParC*. *Chemotherapy* 2004; 50(6):265-275.
- Zasada AA, Paciorek J. Application of PCR to *Haemophilus influenzae* typing. PCR standardization for *bexA* gene fragment detection and for detection of DNA fragment specific for *H. influenzae* type b. *Med Dosw Mikrobiol* 2003; 55(4):357-63.
- Zhang Q, Finn A. Mucosal immunology of vaccines against pathogenic nasopharyngeal bacteria. *J Clin Pathol* 2004; 57 (10): 1051-21.
- Zhanel GG, Karlowsky JA, Low DE. Antibiotic resistance in respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected from across Canada in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:655-62.
- Zhou F, Bisgard KM, Yusuf HR, Deuson RR, Bath SK, Murphy TV. Impact of Universal *Haemophilus influenzae* type b vaccination starting at 2 months of age in the United States: an economic analysis. *Pediatrics* 2002; 110(4):653-61.
- Zwanlen A, Winkelstein JA, Moxon ER. Surface determinants of *Haemophilus influenzae* pathogenicity: comparative virulence of capsular transformants in normal and complement depleted rats. *J Infect Dis* 1983; 148:385-94.

## 8. BIBLIOGRAFÍA DE LA AUTORA

### 8.1. Bibliografía de la autora relacionada con la tesis

1. Llop A, Tamargo IT, Pérez M, Toraño GP, Ramírez M, Bravo L, *et al*. Resistencia a los antimicrobianos y vigilancia microbiológica en Cuba. Rev Panam Infectol 1999 (Supp 1): 33-40.
2. Llop A, Tamargo I, Pérez M, Toraño G, Ramírez M, Bravo L, *et al*. Resistencia Antimicrobiana y Vigilancia Epidemiológica en Cuba. En: Resistencia Antimicrobiana en las Américas. Magnitud y control del problema. Salvatierra-Y. Benguigui. OPS/HCP/HCT/163. 111-118. Wash. 2000. (Original Español/Inglés).
3. Llop A, Resistencia a los antimicrobianos y vigilancia microbiológica en Cuba. OPS. ACT. 2001. 163. 111-118.
4. Llop A, Valdés Dapena Vivanco M.M., Zuazo J. *et al*: Microbiología y Parasitología Médicas. 1era Ed. CNICM. Cuba. 2001.
5. Llop A, Tamargo I, Ramírez. M Pérez M, Toraño G, Llanes R, *et al*. Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. (2000) HCP/HCT/201/02: 72-77. Wash. OPS/OMS. 2002.
6. Llop A, Tamargo I, Ramírez M, Pérez M, Toraño G, Quiñónez D, *et al*. Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. (2001) OPS/DPC/CD/246/03: 40-47. Wash. OPS/OMS. 2003.
7. Llop A, Tamargo I, Ramírez M, Toraño G, Llanes R. Quiñónez D, *et al*. Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. (2002) OPS/DPC/CD/284/03: 41-44. Wash. OPS/OMS. 2003.
8. Llop A, Tamargo I, Ramírez M, Toraño G, Quiñónez D, Llanes R, *et al*. Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. (2003) OPS/DPC/CD/332/05: 32-5. Wash. OPS/OMS. 2005.
9. Llop A, Tamargo I, Pérez M, Ramírez M, Quiñónez D. Llanes R, *et al*. Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. (2004) OPS/DPC/CD. En prensa OPS/OMS.
10. Tamargo I, Toraño G, Rodríguez O, Pérez M, Llop A. Characterization of *Hib* obtained from Invasive Diseases in Cuban Children under five years of age. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999. 94 (4): 477-8.
11. Tamargo I, Toraño G, Pérez M, Fuentes K, Llop A *et al*. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* circulantes en Cuba. Rev Latinoam Microb 2000; 42: 603-8.
12. Tamargo I, Fuentes K, Llop A, Oteo J, Campos J. High levels of multiple antibiotic resistance among 938 *Haemophilus influenzae* type b meningitis isolates from Cuba (1990-2002). J Antimicrob Chemother 2003; (52): 695-8.

### 8.2. Bibliografía de la autora no relacionada con el tema

1. Llop A. Flora vaginal. Revisión y trabajo práctico. Tesis presentada para el título de Especialista de 1er. Grado de Microbiología. Cuba. 1964.
2. Canetti J, Llop A. Meningitis a *Salmonella* D. Reporte de un caso. Revista Servicios Médicos FAR. 1965. Vol. 3, No. 1.

3. Llop A. Estudio preliminar sobre etiología de la Epidemofitosis en las FAR. Reunión Anual de Epidemiólogos. Dirección Servicios Médicos de las FAR.
4. Rodríguez L, Castañar J, Llop A. Estudio de un brote de Neumonías Agudas. 1967. II Seminario Médico Militar Hospital Docente “Carlos J. Finlay”.
5. Real J, Fernández A, Llop A. Estudio de un brote de Faringitis Aguda en una escuela militar. 1981. II Seminario Médico Militar. 1968. Hospital Militar Docente “Carlos J. Finlay”.
6. Ciutat A, Llop A. Dinámicas de anticuerpos postvaccinales. 1968. I. II Seminario Médico Militar Docente “Carlos J. Finlay”.
7. Llop A. Flora Vaginal en las FAR. 1968. II Seminario Médico Militar. Hospital Militar Docente “Carlos J. Finlay”.
8. Ciutat A, Real J, Nocedo B, Prince A, Llop A. Los índices inmunológicos obtenidos después de la vacunación antivariólica. Boletín de Higiene y Epidemiología 1969.7: 63-72 dic.
9. Llop A. Estudio sobre la cepa VN-68. Reunión Anual de Epidemiólogos. 1969. Dirección Serv. Médicos. MINFAR.
10. Llop A. Cepas de estafilococos patógenos circulantes en el departamento de Cirugía. 1969. Hospital Militar Docente “Carlos J. Finlay”. Reunión Anual Grupos Epidemiológicos de Ejército.
11. Llop A. et al. Los índices inmunológicos obtenidos después de la vacunación antivariólica, Boletín de Higiene y Epidemiología. 1969. 7:63-72.
12. Llop A. Tendencia sobre la Microbiología Médica. 1970. (Bacteriología-Micología). Dirección Servicios Médicos, MINFAR.
13. Fariñas F, Llop A. Etiología de Epidermofitosis en las FAR. 1970. Jornada Grupo Epidemiológico Central del Ejército.
14. Soler R, Llop A. Flora bacteriana en las colecistitis agudas. 1972. Presentado en la Jornada de hospitales militares y Sociedad Cubana de Cirugía.
15. Soler R, Llop A. Flora bacteriana en las colecistitis agudas. Rev. Cub. de Cirugía, 1972. Nov. Vol. 4:104-109.
16. Borges H, Llop A. Infección a Ps. aeruginosa en los pacientes quemados. Reporte preliminar. Boletín Higiene y Epidemiología. 1974. Abril. 12: 39-50.
17. Borges H, Llop A. Infección a Ps. aeruginosa en el paciente quemado. Rev. Serv. Med. FAR. 1974 Vol. 9 No. 1.
18. Llop A. Infección intrahospitalaria. Fagotipos de estafilococos patógenos circulantes en nuestros servicios quirúrgicos. Rev. Serv. Med. FAR. 1975. Cuba: 9, 2.
19. Llop A. Modelo cubano de organización del primer plan quinquenal de investigación en salud. Rev. Cub. Adm. Salud. 1977. Junio. 3 123-126.
20. Llop A., Arce S. La Revolución Científico Técnica en el campo de la Salud en Cuba. Rev. Cub. Adm. Salud 1977. Sep. 4: 259-263.
21. Llop A., Arce S. La Revolución Científico Técnica en el campo de la Salud Pública Cubana. Procesos inseparables. Dirección Nacional de Investigación. Ministerio Salud Pública 1978. 1-4.
22. Llop A. Investigación en Salud. Modelo Cubano de Organización. Dirección Nacional de Investigación. Ministerio Salud Pública 1978. 5-16.
23. Llop A. Investigación en salud. Modelo cubano de organización. CNICM. 1978, Nov. 5-16. Cuba.
24. Llop A. Algunas consideraciones sobre los aspectos éticos de la medicina y en particular de la investigación en salud. CNICM. 1978 Nov. Cuba.
25. Llop A. Algunas consideraciones sobre Política Científica; bases conceptuales y organizativas de la investigación en Salud en Cuba. Dirección Nacional de Investigación. MINSAP. 1978
26. Llop A. Veinte años en la formación de los recursos humanos para la investigación en salud de Cuba. Rev. Cub. Adm. Salud. 1980. Enero-marzo. Vol. 6.No. 1 45-55.

27. Llop A. Los Institutos de Investigación del MINSAP. Actualización. 1981. Abril. CNICM. Cuba.
28. Llop A. Situación de la investigación en salud en los países del Área II (México, Haití, Santo Domingo y Cuba). Conferencia Panamericana sobre Políticas de Investigación en Salud. Caracas Venezuela. 1982 Abril. (PNSP/83-92. Pag.114-122. OPS/OMS. 1983).
29. Pascual M.A., Llop A., Pereira L., Herrera S. Sistema automatizado de información de la investigación en salud en Cuba. Rev. Cub. Adm. Salud. 1983. Marzo. No. 9, 32-41.
30. Llop A. Informe de los países del Área II a la Conferencia Panamericana sobre políticas de Investigación en Salud. Políticas de Investigación en Salud. 1983. Pág. 114.
31. Llop A., Criterios para el establecimiento de prioridades de investigación en salud. La experiencia de Cuba. XXIII Reunión del CAIS.1984 Sept. OPS/OMS. Washington.
32. Biango M., Llop A., de Salazar E.T., de Leñero A.E., de Almeida J. Enright T. Situación de salud de la mujer en Argentina. Mujer, Salud y Desarrollo. 1985. Pág. 59-61.
33. Llop A., Borges M. Exudado vaginal simple. Rev. Cub. Med. Gral. Integral. 1987. Nov. Vol 3 No.3 Cuba.
34. Llop A. Criterios para el establecimiento de prioridades de investigación en salud. Revista Educación Médica y Salud. 1987. Vol. 21, No. 3:93-104. OPS/OMS Washington. E.U.A.
35. González M., Llop A., Berroa M. Clasificación de cepas de Staphylococcus aureus por marcadores fagotípicos. Rev Cub. Med. Trop. 1987 39 (1) 7-11.
36. Martínez G, Llop A. et al. Hipersensibilidad retardada a Ags convencionales. Estudio comparativo entre dos baterías antigénicas. Rev. Cub. Med. Trop. 1988. Vol. 3, No. 3. 215-219.
37. Martínez G., Llop A., Expósito Gladys. Comportamiento de diferentes antígenos de naturaleza microbiana utilizados para evaluar la respuesta inmune. Rev. Cub. Med. Trop. 1988. 40 (3): 13-24.
38. Martínez M.L., Martínez G., Fernández C, Llop A. Serotyping of C. albicans isolated from clinical specimens. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Río Janeiro. 1990. Vol 85 (1): 61-64. Jan/Mar. Brazil.
39. Llop A Dinámica de Ac. a la vacuna antimeningocócica cubana en una población de 12 a 18 años. 1991. O.S.
40. Fernández C. Martínez G., Fernández R., Llop A Detección de anticuerpos anti Histoplasma capsulatum mediante la técnica de ELISA. Estudio Preliminar. Rev. Cub. Med. Trop. 1992. Agosto. Vol. 44 (2):112-117.
41. Martínez G., Álvarez P., Fernández C. Llop A. Detección de anticuerpos anti Criptococcus neoformans en 3 grupos de sueros humanos. 1992. Agosto. Rev. Cub. Med. Trop. 1992. Agosto. Vol. 44 (2):141-144.
42. Hung M., Martínez G, Fernández Abreu, Fernández R, Llop A Evaluación de un ELISA para la detección de anticuerpos anti Aspergillus fumigatus. Rev. Cub. Med. Trop. 1992. 44 (3):215-220.
43. Llop A . Editorial. Rev. Cub. Med. Trop. 1992. Dic. 44 (3):170.
44. Bravo L., Monté R., Ramírez M., Maestre J., Llop A. Detection of toxigenic Vibrio cholerae O1. Memorias del Inst. Oswaldo Cruz. 1992. Jul/Sep. Vol. 87(3):443-444. Brazil.
45. Llop A. Medical microbiology Development in Cuba. Editorial. Cub. Jour. Trop. Med. 1992. 44(3):170,
46. Álvarez Lina P., Martínez G., Fernández C., Llop A. Diagnóstico de criptococcosis. Comparación de 2 sistemas de látex para la detección de antígeno. Rev. Cub. Med. Trop. 1992. 44 (1): 29-33.
47. Martínez I, Patton A, Sosa J, Llop A. Detection of toxigenic Vibrio cholerae O1. Memorias del Inst. Oswaldo Cruz. 1992. Vol. 87(3):443-444. Jul/Sep. Brazil.
48. Bravo. L, Monte R. J., Ramírez M, Maestre J.L., Llop A. Detection of toxigenic Vibrio cholerae O1 using polymerase chain reaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 1992 jul/sep. Vol. 87 (3): 443-444.

49. Martínez I, Patton A, Sosa J, Llop A, Oropeza C. Studies of serogroup B strains of *Neisseria meningitidis*: main causal agent of the meningococcal disease in Cuba after Pathobiology and Immunology of Neisseriaceae. 1980. 1992 222-228 Ed. INSP. México.
50. Conde-González, Martínez I, Patton A, Sosa J, Llop A. Detection of DNA of Pili of pathogenic *Neisseria* sp by the Polymerase Chain Reaction. (1992) pathobiology and immunology of Neisseriaceae. 1993. 459-461 Ed.. INSP. México.
51. Más P, M, Rodríguez, M. Guzmán, Llop A. Neuropatía epidémica cubana: Breve reseña epidemiológica. Número Especial No. 1, 1993. Pág. 8. Bol. Epid. IPK.
52. Martínez I., Pattoan A. Sotolongo F, Llop A, Sosa J. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* grupo B. Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas. 1994. Vol. 3. No. 1.31-34. Venezuela.
53. Martínez I., Pattoan A, Llop A, et al. Estudio de plásmidos en cepas de *N. meningitidis* en cepas con sensibilidad disminuida a la penicilina. Acta Científica de la Soc. Ven. de Bioanalistas. 1994. Vol. 3 No. en prensa.
54. Llop A. Agentes biológicos patógenos para el hombre más frecuente en la Comunidad. Folleto Docente. ISCM-H. Habana. 1994. Cuba.
55. Martínez I., Pattoan A, Llop A. *Neisseria meningitidis* B. Strains characterization. Scie. Act. Ven. Bioa. Soc. 1994. Vol 34(1):31- 3d.
56. Martínez I., Pattoan A, Llop A. Strain's plasmids of *N. meningitidis* B with decreased sensibility to penicillin. Scie. Act. Ven. Bioa. Soc. 1994. Vol 3 (1) 35-38.
57. Llop A. Human biological pathogenic agents. Morbidity at the Community. ISCMH. 1994 Hav. Cuba.
58. Fernández, C., Cadre-Ratón A.M., Martínez G., Llop A, Suárez M. Relación entre la prueba intradérmica de histoplasmina y los niveles de anticuerpos detectables por ELISA e Inmunodifusión. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1994. 36 (1): 83-87. Janeiro.
59. Martínez I., Pattoan A, Llop A. Sensibility of *N. meningitidis*. MIC Test. Micro. Bull. Ven. Soc. 1994. Jul/dic Vol 14(2):48.
60. Martínez I., Pattoan A, Llop A. MIC Test sensibility. Longitudinal study of *N. meningitidis* strains. Enf. Inf. Micro. 1994. Vol 15(5):355. México.
61. Llop A, Rico O, Rodríguez M E, Capó V, Ruíz A, Montoro E,. Ulcera de Buruli en el distrito Amansie West, Región Ashanti, Ghana. Experiencia cubana . Rev. Cub. Med. Trop : 1994. 46 (2) : 120-26.
62. Martínez I, Patton A, Sotolongo F, Llop A, Sosa J,. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* Grupo B. Acta Cient. SVBE ; 1994.3 (1) : 31-34.
63. Pérez M, Tamargo I, Llop A, Tamargo I, Rodríguez O. Peste neumónica. Bol. Epid. IPK, 1994 .Vol 4 (32).
64. Pérez M, Tamargo I, Llop A, Tamargo I, Rodríguez O. Diagnóstico y cuadro clínico de la *L. pneumophila*. Bol. Epid. IPK 1994 .4 (31)
65. Sosa J, Llop A et al., Caracterización de cepas de *N. meningitidis* Grupo B. Acta Científica SV BF. 1994. 3 (1): 31-41.
66. Llop A, Rico O, Rodríguez M.E, Capó V., Ruíz A, Montoro E. Ulcera de Buruli en el Distrito Amansie West, Región Ashanti, Ghana. Experiencia Cubana. Rev Cub Med Trop. 1994 46 (2): 120-126.
67. Mas P., Balmaceda A. Avalos I., Castillo A., Guzmán G., Llop A, Palomera R. Neuropatía epidémica cubana. Parte III. Ac neutralizantes a cepas aisladas y otros enterovirus en pacientes y personas sanas. Vol. 47. Rev. Cub. Med. Trop. Med. 1995. No. 1.
68. Martínez I, Patton S, Valdés E, Palma S, Llanes R., Sosa, J. Llop A, Sotolongo F., Campredro M. Estudio longitudinal de la Sensibilidad por Concentración Mínima Inhibitoria en cepas de *N. meningitidis*. Act. Cient. Soc. Ven. Biom. 1995. Vol 15 (5) 355. Venezuela.
69. Kourí G, Llop A, Rogés G. Economía, Salud y Enfermedad. Revista Bimestre Cubana. 1995. Vol LXXVIII. Pag. 49-61. Cuba

70. Martínez I., Pattoan A, Llop A. Estudio longitudinal de la Sensibilidad por Concentración Mínima Inhibitoria en cepas de *N. meningitidis*. Act. Cient. Soc. Ven. Bion. Vol. 1995. 15 (5) 355. Venezuela.
71. Llop A, Montoro E, Rodríguez M E, Capó V, Ruiz A. Estudio de la Ulcera de Buruli en Ghana. Experiencia Cubana. Enf. Inf. Micro, 1996. 16 (4) 211-214.
72. Martínez I, Patton A S, Valdés E, Palma S, Llanes R, Sosa J, , Llop A, Sotolongo F, Campedro M, Estudio longitudinal de la sensibilidad por concentración mínima inhibitoria en cepas de *Neisserias meningitidis*. Enf. Inf. Microb. 1996. 16 (2) : 74-79.
73. Pérez M, Tamargo I, Llop A, Estandarización de la Técnica de Electroforesis en campo pulsante para la caracterización de las cepas de *S. pneumoniae*. Informe Preliminar. Bol Epid. IPK, 1996. 6 (18) : 14.
74. Martínez I, Patton A S, Valdés A, Llanes R, Sosa J, , Llop A, Sotolongo F, Campedro M. Estudio longitudinal de la sensibilidad por concentración mínima inhibitoria en cepas de *Neisserias meningitidis*. Enf. Inf. Micro. 1996. 16 (2) : 74-79.
75. Sosa J, Llanes R, , Llop A, Martínez I, Sotolongo F. Charaterization of *N. gonorrhoeae* strains isolated from a conjunctivitis outbreak. Gonococcal Infection Immunity Resistance. X conference of Pathogenic *Neisseria*. 1996. Maryland. USA. 51-52.
76. Llanes R, Sosa J, , Llop A, Martínez I, Palma S, Pino Y.. Antimicrobial susceptability of 42 *N. gonorrhoeae* strains isolated in 1995 in Cuba. X Conference of pathogenic *Neisseria*. 1996. Maryland. USA. 49-50.
77. Más P, Pelegrino J, Guzmán M G, Comellas M, Resik S, Alvarez M, Rodríguez R, Muné M, Capó V, Balmaseda A, Rodríguez L, Rodríguez P, Handy J, Kourí G, , Llop A :Viral isolation from cases of epidemic Neuropathy in Cuba. Arc. Pathol Lab Med ; 1997. 825-33.
78. Montoro M, Capó V, Rodríguez M E, Ruiz A, Llop A: Buruli Ulcer Ghana. Mem Inst Oswaldo Cruz : 1997. 92 (1) 31-32.
79. Rodríguez M.E, Montoro E, Capó V, Ruiz A, , Llop A : *Mycobacterium ulcerans*. Presentación de un caso. Rev. Lep. Fontilles . 1997. 21 (1) : 83-88.
80. Pérez M, , Llop A. Tamargo I, Serotipaje de *S. pneumoniae* con el empleo del método del kit Pneumotest. Bol Epid IPK , 1997. 7 (14) : 109.
81. Llop A : Enfermedades Emergentes y Reemergentes. Publicación AMECA. 1997. 1-15
82. Llop A, Enfoque sobre medios de cultivos a diferentes niveles de la Red Microbiológica Nacional. Informe Técnico. 1997. MINSAP.
83. Llop A, y col. Ley de Salud de Cuba. Asamblea Nacional P.P. 1997 Cuba.
84. Maestre J L, Cabanas M, Suárez O, Ocampo A, Paneque M, González Y, Echemendía M, , Llop A ,Valdivia J.A. Obtención de una librería genómica de las cepas 220 y 337 de *Mycobacterium habana*, Avances Biotec Mod, 1997. 40 Vol 4. Pág. V41.
85. Maestre J L, Suárez O, Llop A, Mederos L, Echemendía M, Valdivia J, Moter A, Gobel U, Secuenciación del gen que codifica la subunidad r16 S de las cepas 220 y 337 de *M. habana*. Avances Biotec Mod. 1997. Vol 4. Pag. V33.
86. Sosa J, Llanes, R, Martínez I, Patton A S, Gutierrez Y, Llop A, Gutierrez O, Guzmán D, García L C. Variación del Serotipo vacunal en cepas de *N. meningitidis* aisladas en Cuba entre 1986-96 Biotecnología Habana. Avances Biotec. Mod. 1997. Vol. 40, V21.
87. Sosa J, Llop A et al: Estudio de ADN en cepas de *N. meningitidis* por análisis de restricción. Enf. Inf. y Micro.18 (5) 192-202.
88. Sosa J, Llop A et al: Detection of Anti-pili Antibodies of *Gonococcus* Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Osv. Cruz. 1998. 94 (3): 395.
89. Maestre J, Llop A et al: Caracterización de *Vibrio* mediante Técnica (RFLP). 1998. No publicado Fondo IPK.
90. Morier L., Llop A., et al: Estudio de toxigenicidad de cepas de *Rev. Vibrio* de Células Y-1. 1998. No publicado Fondo IPK.

91. Sosa J., Dillon J., Llop A., Llanes R.: Caracterización Molecular de *N. gonorrhoeae*. Avances Biol Molecular Moderna. 1999. 5. (V13).
92. Bravo L., Llop A. et al: Fatal *Plesiomonas shigelloides* in a Newborn. Mem. Inst. Osw. Cruz. 1999. 94 (4).
93. Sosa J., Llop A., Barrero E.: Detection of anti-pili Antibodies of *Gonococcus* Using and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Mem. Inst. Osw. Cruz. 1999. 94
94. Llanes R, Acosta J, Sosa J, Guzmán Daymi, Gutierrez O, Llop A. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* por difusión con discos. Rev. Cub. Med. Trop. 1999. 51 (2): 116-9.
95. Ramírez M., Bravo L., Llop A. Cabrera R., García B., Fernández A. Caracterización de un brote de *Shigella boydii* 14 por primera vez en Cuba. Rev. Cub Hig Epidemiol 1999.; 37 (2) 90-3.
96. Col. Autores. Programa Integral de Atención y control de las enfermedades Respiratorias Agudas. 2000. MINSAP. Cuba.
97. Llop A. et al: Documentos del Taller para la preparación para enfrentar una contingencia Biológica. 2001. Nov. IPK. Cuba.
98. Llanes R Llop A. et al: *Neisseria gonorrhoeae*. Resistance to Ciprofloxacin. Sex Transm Dis . 2001. 28 (2): 82.
99. R. Llanes, A. Zamora, M. Nápoles, A. Guevara, J. Sosa, D. Guzmán, Llop A., M.I. Lantero. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in the municipality of Morón, Cuba. Emergence of isolates with intermediate resistance to fluoroquinolones.
100. Batlle MC, Romero J, Urguelles C, Berguera J, Tamargo I, Dickinson F, Llop A. Resistencia in vitro de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con Fibrosis quística. Rev. Lat. Microbiol. 2002. Vol. 44 No. 4, 15 (8).
101. Sosa J, Ramírez Arcos S, Ruben M, hilt, Llanes R, Llop A., Dillon .High percentages of resist. To tetracycline and penicillin a reduced susceptibility to azithromycin characterize the major of strain types of *Neisseria gonorrhoeae* in Cuba, 199. mayo. 1998. J. Sex Transon Dis. 2003. 30 (5): 443-8.
102. Llanes R, González M, Martínez I, Sosa J, Guzmán D, Gutierrez O, Llop A. Sánchez L. Evaluation of Methods for Detecting the Beta-lactamase Activity in *Neisseria gonorrhoeae* Isolated in Cuba. December. Mens Inst Oswaldo Cruz, 2003 Vol. 98(8): 1089-1091.
103. Llanes R., Sosa J., Guzmán D., Llop A., Valdés E., Palma S. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Cuba (1995-1999) Implications for treatment of Gonorrhea. Sex . Transm. Dis. 2003. 30 (1): 10-4.
104. Obregón A. M., Martínez G, Martínez R, Llop A. Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández C. Respuesta serológica por ELISA y MAT en voluntarios cubanos con vax SPRAL. Rev. Cub. Med. Trop. 2004. 56, 1
105. Rodríguez I, Rodríguez ME., Fernández C., Blanco O., Llop A. Diagnóstico serológico de sífilis en pacientes cubanos con VIH/SIDA. Rev Cub Med Trop. 2004 56 (1) 67-9.
106. Guzmán, M.A., Kourí, G., Díaz, M., Llop A. Dengue, one of the great emerging health challenges of the 21 st century. Expert Rev. Vaccines. 2004. 3 (5), 511-520.
107. Llanes, R, Reyes A, Rodríguez C, Guzmán D, Llop A. Factibilidad el uso del medio de cultivo base de agar GC-BIOCEN en el laboratorio de microbiología. Rev. Cub. Med. Trop. 2004; 56 (3) 237-8.
108. Rodríguez M.E., Llop A., Capó V., Kourí V., Resik S., Rojas L., Soto Y., Muné M., Rodríguez I, Hengge U.R. Human immunodeficiency virus and other sexually transmitted diseases in Cuban women. Clin Microbiology. And Inf. 2005 Sept. Vol 11 9.
109. Pupo M., Guzmán, M.G., Fernandez R., Llop A. Dickinson O., Perez D., Cruz R., González T., Estevez G., Gonzalez H., Santos P., Kourí G., Andonova M., Lindsay R., Artsob H., Drebot M. West Nile Virus Infection in Humans and Horses, Cuba. Jun 2006. Vol 12, No. 6 Trop. Med. Manitoa, Canada.

## Libros

1. Cirugía de Guerra. Tomo 1. Capítulo 8. Armas biológicas. Edit. Ciencia y Técnica. 1968.
2. Cuba. Organización de los servicios y nivel de salud. IV Servicios complementarios. Investigaciones en salud. 129-131. MINSAP. Cuba. 1974.
3. Cuba. La Salud en la Revolución. Servicios Complementarios. Investigaciones en Salud. 163-166. MINSAP. Editorial Orbe. Instituto Cubano del Libro. Habana. 1976.
4. Salud y Revolución. Antología de autores cubanos. En portugués. Editado en Brasil. 1984.
5. La investigación en salud. Pag. 261-270. Editorial Siglo XXI. México. 1985.
6. La formación de los recursos humanos para la investigación en salud. Pag. 271-275. Editorial Siglo XXI. México. 1985.
7. Situación de la Mujer y la Salud en Cuba. Ministerio de Salud y Acción Social. Primer Encuentro Nacional de: Mujer, Salud y Desarrollo. Buenos Aires. Argentina. Marzo. 1985.
8. El Diagnóstico Microbiológico Médico en Período Especial. IPK-MINFAR. Enero. 1988.
9. Agentes Biológicos de importancia médica en la comunidad. (I) Facultad Medicina Universidad Habana. Marzo. 1990.
10. Agentes Biológicos de importancia médica en la comunidad II. Actualización. Marzo. 1994.
11. Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes. IPK. Documento interno. 1995.
12. Manual. Conocimientos sobre el bioterrorismo. Col. Autores. IPK. Cuba. 2001.
13. Microbiología y Parasitología Médicas. Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL. CNIC. Cuba 2001
14. Infecciones de Transmisión Sexual pautas para su tratamiento. Ministerio de Salud Pública. 2004

## 8.3. Informes técnicos de la autora

- 1973 Reglamento orgánico de los institutos de investigación del MINSAP. Cuba. Octubre.
- 1973 Anteproyecto del Comité Nacional de la Investigación en Salud. (CONIS). MINSAP. Cuba.
- 1974 Reglamento orgánico de la Dirección Nacional de Investigación. Viceministerio de Docencia e Investigación. MINSAP. Cuba
- 1974 Documento base. Comité Nacional de Investigación en Salud. (CONIS). MINSAP. Cuba.
- 1974 Documento base. Dirección de Biomedicina del Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CNCT). Cuba.
- 1974 Algunas consideraciones sobre estructura, organización y control de la investigación biomédica en México, Venezuela y Perú. OPS/OMS.
- 1976 Plan quinquenal de investigación en salud.
- 1977 Modelo de Rama. Subrama de Ciencia y Técnica. MINSAP. Cuba. Septiembre.
- 1977 Informe anual 1976. Investigación en salud. 85-90. CNICM. MINSAP.
- 1977 Reglamento orgánico. DNI. MINSAP. Cuba
- 1978 Perspectivas 1978-85 para el desarrollo C-T del MINSAP. Cuba. Febrero.
- 1978 Informe anual 1977. Investigación en salud. 79-81. CNICM. MINSAP.
- 1978 Perspectivas de desarrollo del subsistema de C-T en el MINSAP. Grupo dirigido CECT. Abril.
- 1979 Problema 19. Tema 11. Desarrollo Científico Técnico de la Salud Pública para el año 2000. MINSAP. J' Grupo Técnico Asesor. Febrero.
- 1979 Informe anual 1978. Investigación en salud. 78-82. CNICM. MINSAP.

- 1980 Informe anual 1979. Investigación en salud. Los institutos de investigación del MINSAP. Cuba. Marzo
- 1980 Informe anual 1980. Investigación en salud. Presentado al balance del MINSAP.
- 1980 Actualización Problema 19. Tema 11. Desarrollo Científico Técnico de la Salud Pública para el año 2000. MINSAP. Grupo Técnico Asesor. Junio.
- 1981 Los institutos de investigación del MINSAP. Actualización. Abril.
- 1982 Informe evaluación sobre el trabajo de investigación de las UCT del MINSAP. 1976-1980. Enero.
- 1982 Informe anual 1981. Investigación en salud. CNICM.
- 1983 Desarrollo y Conceptualización del Laboratorio Nacional de Microbiología. Marzo.
- 1984 Desarrollo progresivo de la Red de Laboratorios de Microbiología médica. Octubre.
- 1985 Programa de desarrollo. Especialidad Microbiología. MINSAP. Enero.
- 1985 Información técnica sobre Microbiología. Balance anual 1984. Viceministerio de Higiene y Epidemiología. Febrero.
- 1986 Propuestas de control de la calidad en las pruebas diagnósticas basadas en el método ELISA para HTLV-III/LAV y HBsAg. MINSAP. Noviembre.
- 1986 Informe técnico sobre la especialidad de Microbiología. MINSAP. Junio.
- 1986 Propuestas de control de la calidad en las pruebas diagnósticas basadas en el método de ELISA para HTLV-III/LAV y HBsAg.
- 1988 Documento sobre Coordinación Técnica en la Actividad Científica. OPS/OMS. Wash. EUA.
- 1989 Papel de la OPS en la Investigación en Salud. Prioridades. Reunión CAIS. OPS. Washington. EUA. Septiembre.
- 1989 Programa de Agentes Biológicos de alumnos de Medicina. Inst. Superior Ciencias Médicas Univ. Habana. Marzo.
- 1991 Perfeccionamiento Programa de Agentes Biológicos de alumnos de Medicina. Inst. Superior Ciencias Médicas Univ. Habana. Marzo.
- 1996 Llop A. Informe Técnico. La Microbiología Médica en Cuba. MINSAP.
- Bravo L, Llop A, y col. Informe Técnico Clasificado IPK-012.
- 1996 Bravo L, Llop A, y col. Informe Técnico Clasificado IPK-013.
- 1996 Llop A, Informe Técnico. Red de Laboratorios ETS/HIV/SIDA. GTZ. Sept. CCbb. Bolivia.
- 1997 Bravo L, Llop A, y col. Informe Técnico Clasificado IPK-014.
- 1997 Llop A, Informe Técnico. Red de Laboratorios ETS/HIV/SIDA. GTZ. Feb. CCbb. Bolivia.
- 1997 Llop A, Informe Técnico. Red de Laboratorios ETS/HIV/SIDA. GTZ. Junio. CCbb. Bolivia.
- 1998 Llop A, Informe Técnico. Red de Laboratorios ETS/HIV/SIDA. GTZ. Marzo. CCbb. Bolivia.
- 1998 Llop A, Red de Laboratorios ETS/HIV/SIDA/ Manual Guía. GTZ. Marzo. Bolivia.
- 1999 Llop A, Informe Técnico. Situación de la Leptospirosis en Pinar del Río. 1997. MINSAP.
- 1998 Laboratorios de Salud. OPS/OMS. Julio-Sept. Nicaragua.
- 1998 Normas Técnicas para Bloqueo. MINSAP. Cuba.
- 1999 Laboratorios de Salud. OPS/OMS. Dic. Guatemala.
- 1999 Política de Uso de Antibióticos. OPS/OMS. Chile.
- 1999 Programa Nacional de Prevención y Control de Síndromes Neurológicos Infecciosos. MINSAP. Cuba.
- 1999 Situación de la Red de los Laboratorios de Salud del MINSA. OPS/OMS. Nicaragua.
- 2000 Resistencia a los antimicrobianos en Cuba. 1999. OPS/OMS. Paraguay.

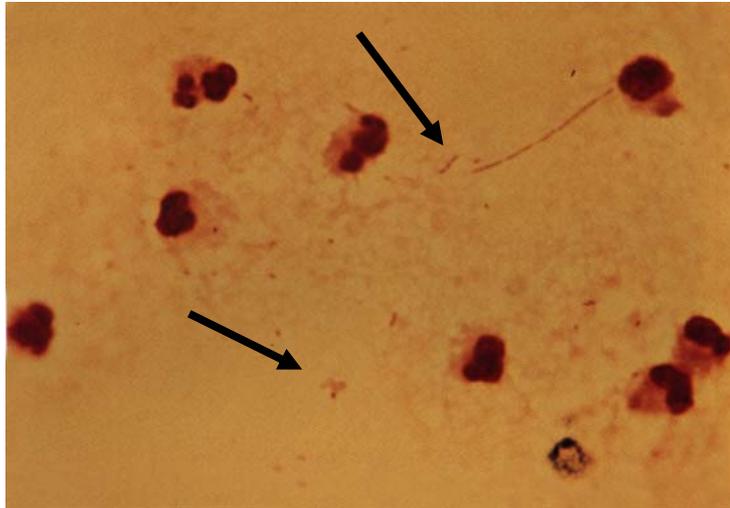
- 2000 Laboratorios de Salud. Resistencia Antimicrobiana a Enteropatógenos. LCDC/Canadá. IPK/Cuba. OPS. Nov.
- 2000 Programa Integral de Atención y Control de las Infecciones Respiratorias Agudas. MINSAP. Cuba.
- 2001 Resistencia a los antimicrobianos en Cuba. OPS/OMS. Paraguay.
- 2001 Red de Laboratorios de Salud. Guatemala. OPS/OMS.
- 2001 Red de Laboratorios de Salud. República Dominicana. OPS/OMS.
- 2001 Guía para la Evaluación Externa de Laboratorios de Salud de la Región de las Américas. OPS/OMS. Santa Cruz. Bolivia.
- 2002 Estudio microbiológico sobre la vacuna antisarampionosa. MINSAP. Cuba.
- 2002 Necesidad de laboratorio para enfrentar la vigilancia VWN. MINSAP. Cuba.
- 2002 Perfeccionamiento de los laboratorios de Microbiología y Atención Primaria. MINSAP. Cuba.
- 2003 Laboratorio de Microbiología Diagnóstica centralizada. Consejo de Estado. Cuba.
- 2005 La Microbiología en Cuba. MINSAP. Cuba.
- 2006 Situación de la Microbiología Clínico Epidemiología en Venezuela. Mayo
- 2006 Situación de los BSL-3 en la Región del Caribe y Meso- América. OPS/OMS. Julio.

#### 8.4. Presentación en eventos científicos

- 1988 Congreso 50 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Cuba 7-10 Dic.
- 1990 III Congreso de Higiene y Epidemiología. La Habana. Cuba.
- 1992 Congreso Latinoamericano de Infectología 8-12 junio. Cuba
- 1993 IV Congreso Nacional de Microbiología y I de Medicina Tropical. Cuba. Octubre.
- 1994 Congreso Latinoamericano de Infectología Cuba. Junio.
- 1996 I Congreso Nacional de Microbiología. Abril.
- 1996 IV Congreso Nacional de Higiene y Epidemiología y I Congreso Nacional de Infectología.
- 1997 Congreso Nacional de Epidemiología.
- 1997 V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, II Congreso Cubano de Medicina Tropical y Congreso 60 aniversario del IPK.
- 1998 VII Jornada Científica del CPHE-CH.
- 1998 II Jornada Provincial de Microbiología y Parasitología
- 1998 Conferencia Panamericana sobre Resistencia antimicrobiana en las Américas: Vigilancia, Monitoreo y Prevención. Venezuela.
- 1999 I Jornada Provincial de Microbiología y Química Sanitaria.
- 1999 Vigilancia de la Resistencia antimicrobiana de bacterias enteropatógenas en Suramérica, América Central y el Caribe.
- 2000 XI Jornada de Residentes IPK. Resistencia Antimicrobiana. Ironía o Paradoja. IPK. Abril.
- 2000 Jornada Gallego Cubana de Salud Pública y Epidemiología. Resistencia Bacteriana Ironía o Paradoja. IPK. Junio.
- 2000 Taller Pre Congreso XIII Seminario Científico CNIC. Conferencia. Actualización de la Situación Epidemiológica de las Enfermedades Infecciosas y el Uso de los Agentes Antimicrobianos en Cuba. CNIC. Cuba. Junio.
- 2000 Resistencia a los antibióticos de las bacterias enteropatógenas en Cuba. Conferencia. CNIC. Cuba. Junio.
- 2000 Taller sobre Resistencia. La política de uso de los antibióticos. CNIC. Cuba. Junio.
- 2000 Reunión Nacional de Vicedirectores de Laboratorios Sanitarios. MINSAP.
- 2000 XIII Seminario Científico. CNIC.
- 2000 I Jornada de Microbiología y Química Sanitaria CH.

- 2000 XV Congreso Latinoamericano de Microbiología y XXXI Congreso Nacional de Microbiología.
- 2001 III Simposio Nacional y II Encuentro Internacional “Vigilancia en Salud 2001”.
- 2002 Programa OPS Resistencia Microbiana. Sta. Cruz. Bolivia. Mayo.
- 2002 Segunda Jornada de Profesores Consultantes de Ciencias Médicas.
- 2004 Jornada Nacional de Infectología Pediátrica.
- 2004 V Jornada Internacional de Infectología Pediátrica.
- 2003 III Jornada de Profesores Consultantes, Facultad Finlay-Albarrán.
- 2003 VI Congreso Centroamericano de Parasitología y Medicina Tropical. Guatemala.
- 2004 IV Jornada de Profesores Consultantes de Ciencia Médicas Facultad “General Calixto García”.
- 2004 V Jornada Internacional de Infectología Pediátrica. Varadero. Cuba
- 2005 VII Congreso Centroamericano de Parasitología y Medicina Tropical, II Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. Conferencista Invitada. El Salvador.
- 2005 Jornada Nacional de Infectología Pediátrica. CIMEQ.
- 2005 SIREVA II, 2005, OPS/OMS. Bogotá. Colombia.
- 2006 Profesora Invitada Conferencia sobre Resistencia. Universidad Central de Guayaquil. Ecuador. Enero.
- 2006 Profesora Invitada Instituto de Altos Estudios en Salud Pública “Dr. Arnoldo Gabaldón” Venezuela.

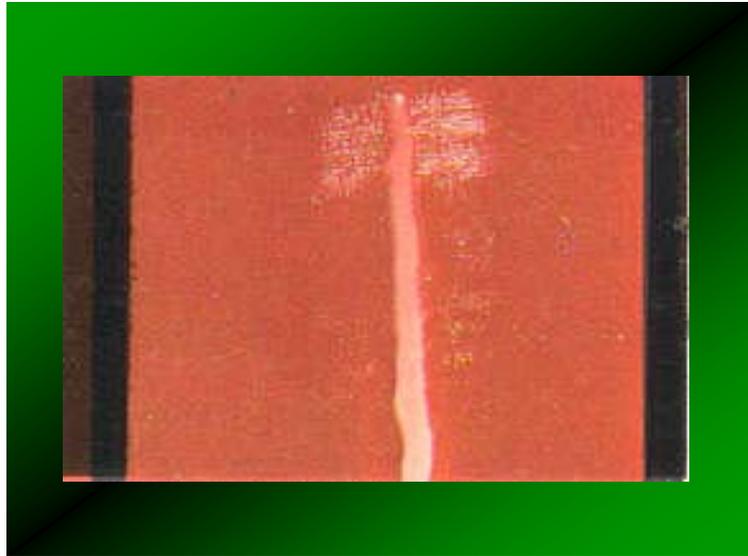
ANEXO 1.



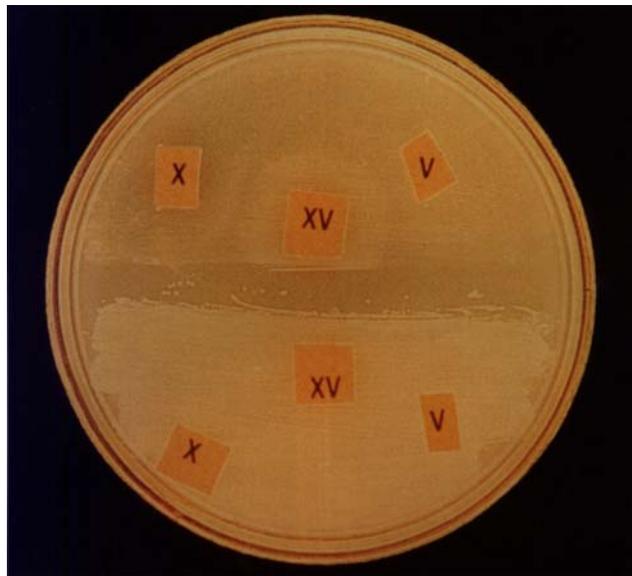
1.1. *Microscopía de H. influenzae de LCR. Coloración de Gram. Las flechas indican la morfología del cocobacilo Gram negativo.- Fuente: Perilla et al, 2003*



1.2. *Cultivo de H. influenzae. Colonias de 24-48 horas en agar sangre. Fuente: Perilla et al, 2003*



**1.3. Foto de Satelitismo**



**1.4. Foto de factores de crecimiento: X y V en discos de papel**  
**La cepa de arriba solo está creciendo alrededor del disco con factores X y V y por ello puede ser considerada Hib**

## ANEXO 2.

Comprobación microbiológica de las cepas de *H. influenzae* diagnóstico recibidas en el LNRM-IPK-MINSAP. MOP-IPK.Características diferenciales de las especies de *Haemophilus*.

Organismo	Requiere		Hemólisis sangre de caballo	Fermentación de:				Catalasa	Aumento de crecimiento en presencia de CO <sub>2</sub>
	factor X	factor V		Glucosa	Sucrosa	Lactosa	Manosa		
<i>H. influenzae</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-	+	+	-	+	D <sup>c</sup>	D
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>H. segnis</i>	-	+	-	W <sup>d</sup>	W	-	-	D	-
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>H. aphrophilus</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+

## ANEXO 3.

## Solventes y diluentes para la preparación de las soluciones de antimicrobianos

Agente antimicrobiano	Solvente	Diluyente
<b>Amoxicilina/Ácido Clavulánico</b>	Solución fosfato pH 6.0, 0.1 mol/L	Solución fosfato pH 6.0, 0.1 mol/L
<b>Ampicilina</b>	Solución fosfato pH 8.0, 0.1 mol/L	Solución fosfato pH 6.0, 0.1 mol/L
<b>Cloranfenicol y Eritromicina</b>	Etanol 95%	Agua destilada
<b>Cefalosporinas</b>	Solución fosfato pH 6.0, 0.1 mol/L	Agua destilada
<b>Sulfonamidas</b>	Agua destilada y NaOH 2.5 mol/L	Agua destilada
<b>Trimetoprim</b>	0.05 mol/L ácido clorhídrico	Agua destilada
<b>Rifampicina</b>	Metanol	Agua destilada

FUENTE: NCCLS, 2002

**ANEXO 4.****Microplaca. Esquema de la placa para las lecturas de la CIM**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

*Fuente: MOP, 2005*

## ANEXO 5.

Distribución por provincias de cepas de *H. influenzae* viables recibidas por año, en el LNRM-IPK. Cuba. 1989-2005

PROVINCIAS	1989-90	1991-92	1993-94	1995-96	1997-99	2000-05	TOTAL
Pinar del Río	14	2	1	5	19	2	43
Habana	12	9	1	3	4	0	29
<b>C. Habana</b>	91	85	43	16	56	13	<b>301</b>
Matanzas	15	13	3	5	14	7	57
Cienfuegos	15	8	7	3	12	1	46
Sancti Spíritus	13	7	5	3	12	0	40
Villa Clara	12	9	6	7	14	3	51
Ciego de Ávila	17	6	11	6	4	2	46
Camagüey	15	7	8	6	12	6	54
Las Tunas	19	6	10	10	27	1	73
Holguín	13	5	12	5	23	7	65
Stgo. de Cuba	77	61	42	25	15	12	<b>229</b>
Granma	12	7	12	6	17	3	57
Guantánamo	13	9	11	5	2	1	41
I. de la Juventud	9	4	0	3	1	0	17
<b>Cepas viables</b>	<b>347</b>	<b>238</b>	<b>172</b>	<b>108</b>	<b>232</b>	<b>58</b>	<b>1155</b>

Fuente: LNRM-IPK, 2006

## ANEXO 6.

6.1. Figura. Incidencia de MEB por *H. influenzae* b.

### INCIDENCIA DE MENINGOENCEFALITIS POR *H. INFLUENZAE* TIPO b. CUBA 1994-2005

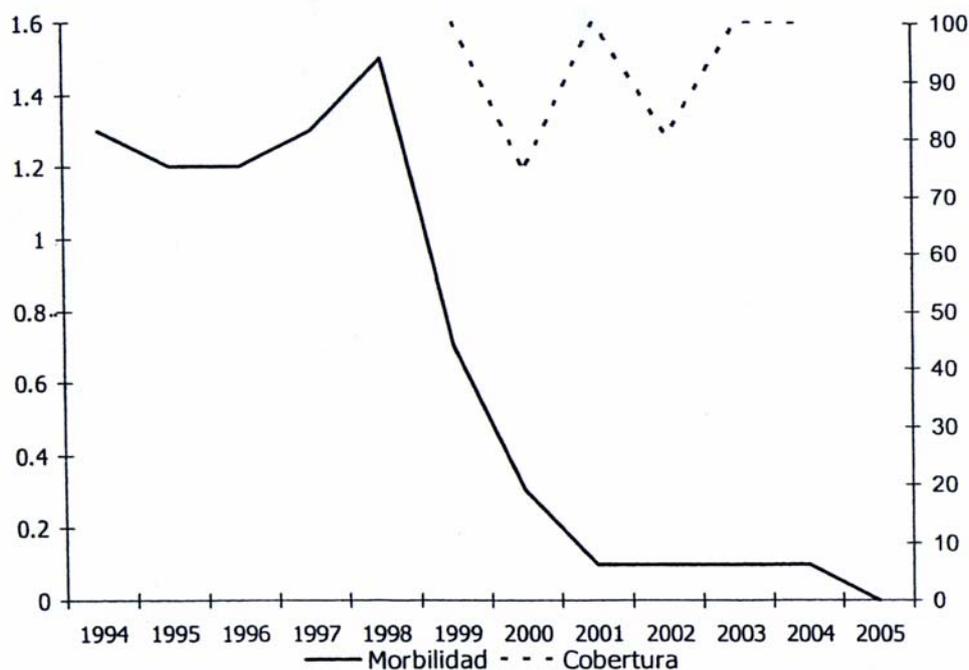


Tabla. Incidencia de meningioencefalitis por *H. influenzae* b.  
Cuba 1994-2005.

Año	Casos	Tasa
1994	146	1.3
1995	127	1.2
1996	135	1.2
1997	145	1.3
1998	168	1.5
1999	69	0.7
2000	35	0.3
2001	10	0.1
2002	13	0.1
2003	8	0.1
2004	6	0.1
2005	2	0.0

Fuente: DNE, 2006

Tasa por 100 000 habitantes

**6.2 Tabla. Mortalidad por meningoencefalitis por *H. influenzae* b.  
Cuba 1994-2005**

<b>Año</b>	<b>Fallecidos</b>	<b>Tasa</b>
<b>1994</b>	20	0.2
<b>1995</b>	21	0.2
<b>1996</b>	18	0.2
<b>1997</b>	15	0.1
<b>1998</b>	22	0.2
<b>1999</b>	9	0.1
<b>2000</b>	6	0.1
<b>2001</b>	2	0.0
<b>2002</b>	1	0.0
<b>2003</b>	1	0.0
<b>2004</b>	1	0.0
<b>2005</b>	1	0.0

*Fuente:* DNE, 2006 Tasa por 100 000 habitantes

**6.3 Tabla. Letalidad por meningoencefalitis por *H. influenzae* b.  
Cuba 1994-2005**

<b>Año</b>	<b>Casos</b>	<b>Fallecidos</b>	<b>Tasa</b>
<b>1994</b>	146	20	13.7
<b>1995</b>	127	21	16.5
<b>1996</b>	135	18	13.3
<b>1997</b>	145	15	10.3
<b>1998</b>	168	22	13.1
<b>1999</b>	69	9	13.0
<b>2000</b>	35	6	17.1
<b>2001</b>	10	2	20.0
<b>2002</b>	13	1	7.7
<b>2003</b>	8	1	12.5
<b>2004</b>	6	1	16.7
<b>2005</b>	2	1	50.0

*Fuente:* DNE, 2006 Tasa por 100 000 habitantes

## ANEXO 7.

Esquemas de Inmunización con Vacunas anti *Hib* utilizados en Cuba7.1. Esquema de vacunación por campaña con Vaxem<sup>®</sup> (Chiron) en niños de 1 año o menores. Cuba 1999.

Edad a la primera dosis (en meses)	Dosis aplicadas *	Edad en que se administró el refuerzo (en meses)
12	1	14
7-11	0-1	18
3-6	0-1-2	15
2	0-1-2	15

\* Dos meses de intervalo entre dosis

**Fuente:** Programa Nacional de Inmunización, 2006 Dickinson *et al*, 2001; Galindo, 2006 (Comunicación Personal)

7.2. Esquema de vacunación anti-*Hib* por Programa con Vaxem<sup>®</sup> (Chiron). CUBA. 2000-04

Edad (en meses)	Dosis aplicadas *	Edad en que se administró el refuerzo (en meses)
2- 4 -6	3	15

\* Dos meses de intervalo entre dosis

**Fuente:** Programa Nacional de Inmunización, 2006 Galindo, 2006 (Comunicación Personal)

7.3. Esquema de vacunación por Programa. Vacuna Conjugada Sintética Cubana Quimi-*Hib* (Heber-Biotec). CUBA 2005

Edad (en meses)	Dosis aplicadas *	Edad en que se administró el refuerzo (en meses)
2-4-6	3	18

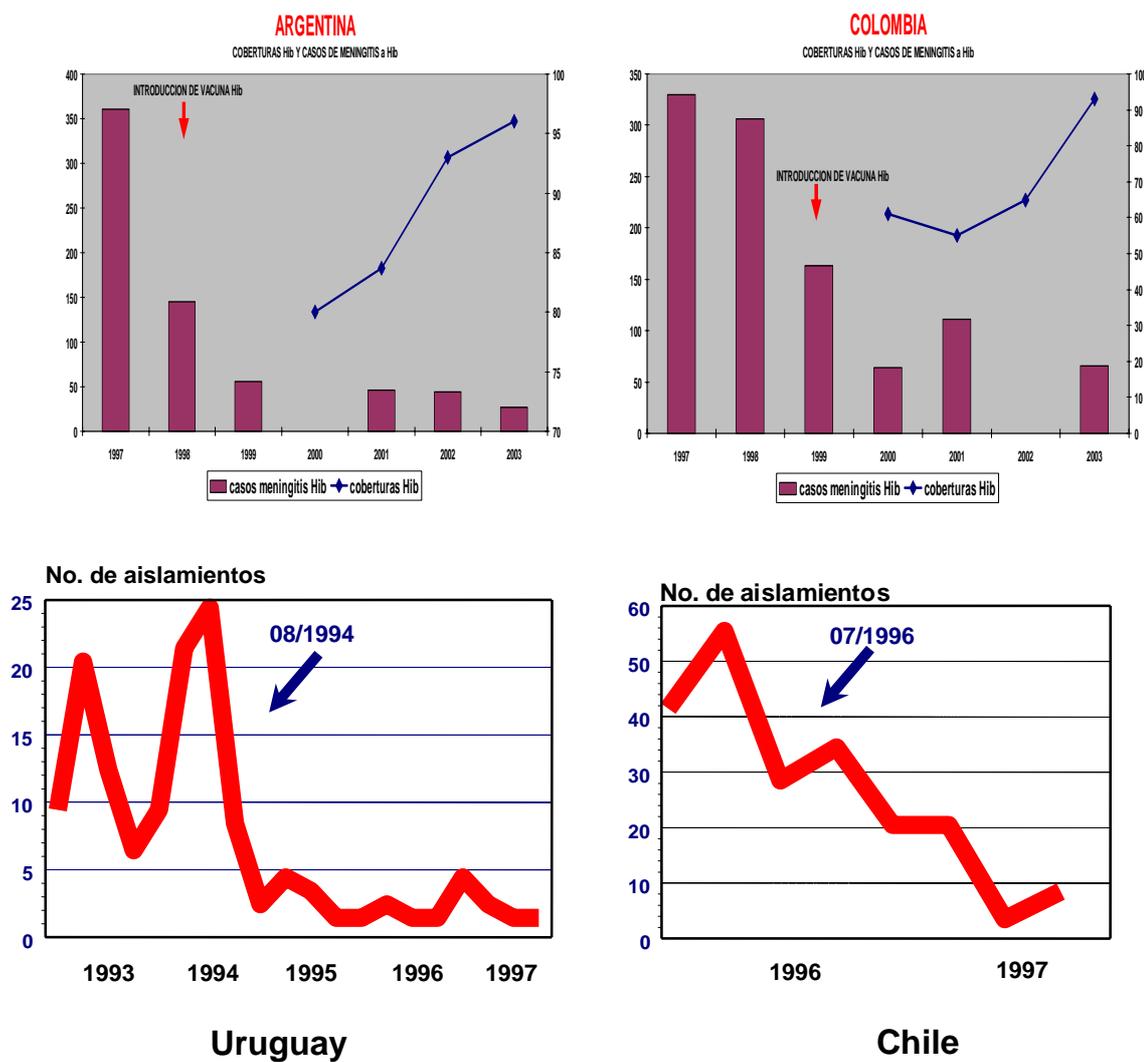
\* Dos meses de intervalo entre dosis

**Fuente:** Programa Nacional de Inmunización, 2006 Galindo, 2006 (Comunicación Personal)

**ANEXO 8.**

**Impacto de la vacunación anti-*Hib* en cuatro países de América**

**Figuras: 1, 2, 3 y 4.** Impacto de Vacunación *Haemophilus influenzae b* en Argentina, Colombia, Uruguay y Chile



Fuente: SIREVA II. 2005.