

IPK
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

**Laboratorio Nacional de Referencia de Infecciones
Respiratorias Agudas Bacterianas. Laboratorio Nacional de
Referencia de *Haemophilus* y *Streptococcus***

**Caracterización de aislamientos de
Haemophilus influenzae en Cuba**

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud

Autora: Lic. Isis Tamargo Martínez

Asesores: Dra. Alina Llop Hernández
Dr. José Campos Marqués

Ciudad de La Habana

2005

SÍNTESIS

Aún después de encontrarse disponibles en el mundo vacunas efectivas contra *Haemophilus influenzae* b, esta bacteria sigue siendo una importante causa de enfermedad invasiva en áreas donde la vacunación no ha sido introducida, y en aquellas regiones donde forma parte de los calendarios de vacunación infantil, los reportes de casos continúan. La vigilancia sistemática durante 15 años consecutivos (1989-2003) del Laboratorio Nacional de Referencia de *Haemophilus*, del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, permitió recuperar 1149 cepas de *H. influenzae* procedentes de todo el país. Todas fueron caracterizadas mediante serotipaje, biotipaje y susceptibilidad antimicrobiana. El serotipo b fue el más frecuente (97.6%), mientras que otros serotipos como el a, e y f se detectaron en menos del 1% entre las cepas investigadas. El 91% de los aislamientos perteneció al biotipo I ó II. La resistencia antimicrobiana encontrada fue elevada: ampicilina (44.4%), cloranfenicol (40.9%), cotrimoxazol (48.3%) y tetraciclina (30.3%). Todas las cepas resistentes a la ampicilina fueron productoras de la enzima β lactamasa y en todas las resistentes al cloranfenicol, se detectó la enzima cloranfenicol acetil transferasa. El 40.6% de las cepas mostró multirresistencia. El análisis de 112 cepas pertenecientes al serotipo b, aisladas, de forma consecutiva en un período de dos años, demostró que el hallazgo de plásmidos conjugativos de resistencia fue común entre las cepas multirresistentes. La técnica de electroforesis en campo pulsado fue útil para detectar la presencia de tres “clusters” principales, en uno de los cuales se agrupó el 52.6% de los aislamientos estudiadas. Las cepas multirresistentes se encontraron básicamente en dos “clusters”. De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, se demostró que la distancia genética entre las cepas pertenecientes al serotipo b fue menor del 20%, manifestándose la relación clonal existente entre las cepas circulantes en Cuba.

TABLA DE CONTENIDO

| | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----|
| I. INTRODUCCION | | 1 |
| I.1. Introducción | | 1 |
| I.2. Hipótesis | | 5 |
| I.3. Objetivos | | 6 |
| I.4. Novedad Científica | | 6 |
| I.5. Valor Teórico | | 7 |
| I.6. Valor Práctico | | 7 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | | 8 |
| II.1. Antecedentes históricos | | 8 |
| II.2. Taxonomía | | 8 |
| II.3. <i>Haemophilus influenzae</i> | | 9 |
| II.4. Factores de virulencia de <i>H. influenzae</i> | | 10 |
| II.4.1. Cápsula: Estructura y composición antigénica | | 10 |
| II.4.2. Proteínas de la membrana externa | | 11 |
| II.4.3. Fimbrias filamentosas | | 12 |
| II.4.4. Proteasa IgA1 | | 13 |
| II.4.5. Lipooligosacárido | | 13 |
| II.5. Patogenia de las infecciones por <i>H. influenzae</i> | | 14 |
| II.6. Inmunidad | | 16 |
| II.7. Epidemiología | | 17 |
| II.8. Diagnóstico microbiológico de <i>H. influenzae</i> b | | 19 |
| II.8.1. Examen directo | | 19 |
| II.8.2. Diagnóstico rápido | | 19 |
| II.8.3. Cultivo | | 19 |
| II.9 . Caracterización microbiológica | | 20 |
| II.9.1. Serotipificación | | 20 |
| II.9.2. Biotipaje | | 21 |
| II.9.3. Subtipaje | | 23 |
| II.9.4. Electroforesis en campo pulsado | | 23 |
| II.10. Inmunogenicidad y eficacia de las vacunas conjugadas contra <i>H. influenzae</i> b | | 24 |
| II.11. Epidemiología de las enfermedades invasivas por <i>H. influenzae</i> en las poblaciones vacunadas | | 25 |
| II.12. Tratamiento de las infecciones invasivas ocasionadas por <i>H. influenzae</i> | | 25 |
| II.13. Quimioprofilaxis | | 26 |
| II.14. Resistencia antimicrobiana | | 26 |
| II.15. Mecanismos de resistencia | | 27 |
| II.16. Pruebas de susceptibilidad “in vitro” | | 30 |
| II.16.1. Prueba cualitativa | | 30 |
| II.16.1.1. Método por difusión en agar | | 30 |
| II.16.2. Pruebas cuantitativas: determinación de la concentración mínima inhibitoria | | 31 |
| II.16.2.1. Método por dilución | | 31 |
| II.16.2.1a. Dilución en agar | | 31 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.16.2.1b. Dilución en caldo | 31 |
| II.16.2.1c. Prueba de Epsilon | 32 |
| III. MATERIALES Y METODOS | 33 |
| III.1. Cepas de estudio | 33 |
| III.2. Identificación de los aislamientos | 34 |
| III.2.1. Microscopia | 34 |
| III.2.2. Condiciones del cultivo y aislamiento | 34 |
| III.2.3. Determinación del requerimiento de los factores V y X | 34 |
| III.2.4. Determinación de β hemólisis | 35 |
| III.2.4.1 Procedimiento | 35 |
| III.2.5. Prueba de la catalasa | 35 |
| III.2.6. Determinación de aumento de crecimiento en incubación con atmósfera de CO ₂ | 35 |
| III.2.6.1. Procedimiento | 35 |
| III.2.7. Fermentación de carbohidratos | 36 |
| III.2.7.1. Procedimiento | 36 |
| III.3. Determinación del serotipo capsular | 37 |
| III.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa para el tipaje capsular | 37 |
| III.4. Determinación de biotipos | 38 |
| III.4.1. Producción de indol | 39 |
| III.4.2. Hidrólisis de la urea | 39 |
| III.4.3. Descarboxilación de la ornitina | 39 |
| III.5. Conservación de los aislamientos | 40 |
| III.6. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana | 40 |
| III.6.1. Método de difusión en agar o Kirby-Bauer | 40 |
| III.6.1.2. Control de calidad | 41 |
| III.6.1.3. Antimicrobianos utilizados | 41 |
| III.6.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria | 43 |
| III.6.2.1. Método de dilución en caldo | 43 |
| III.6.2.2. Procedimiento | 43 |
| III.6.2.2a. Preparación de la solución madre del antibiótico | 43 |
| III.6.2.2b. Preparación de las soluciones seriadas | 44 |
| III.6.2.3. Antimicrobianos utilizados y rangos seleccionados | 44 |
| III.6.2.4. Preparación del medio de cultivo | 44 |
| III.6.2.5. Recubrimiento de la microplaca | 45 |
| III.6.2.6. Preparación del inóculo | 45 |
| III.6.2.7. Inoculación de la microplaca | 46 |
| III.6.2.8. Lectura | 46 |
| III.6.2.9. Control de calidad | 46 |
| III.7. Determinación de la actividad β -lactamasa | 46 |
| III.7.1. Procedimiento | 47 |
| III.8. Determinación de la enzima cloranfenicol acetil transferasa | 47 |
| III.8.1. Procedimiento | 47 |
| III.8.1. Lectura | 48 |
| III.9. Detección de plásmidos conjugativos de resistencia | 48 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| III.10. Electroforesis de ADN en Gel de Campo Pulsado | 50 |
| III.10.1. Procedimiento | 50 |
| III.10.2. Extracción del ADN en bloques de agarosa | 50 |
| III.10.3. Digestión con enzimas de restricción de los bloques | 52 |
| III.10.4. Electroforesis de los bloques en el sistema de campo pulsado CHEF, Bio-Rad | 52 |
| III.10.4.1. Preparación del Gel | 52 |
| III.10.4.2. Preparación del equipo de ECP, CHEF, Bio-Rad | 52 |
| III.10.4.3. Tinción del ADN | 53 |
| III.10.5. Análisis de los patrones de ECP obtenidos y representación gráfica de las relaciones genéticas | 53 |
| III.11. Metodología general llevada a cabo en el presente trabajo | 54 |
| III.12. Análisis estadístico | 54 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSION | 55 |
| IV.1. Caracterización de los aislamientos | 55 |
| IV.1.1. Distribución de los serotipos encontrados | 55 |
| IV.1.2. Confirmación de cepas de <i>H.influenzae</i> NT mediante la técnica de RCP | 57 |
| IV.1.3. Relación entre los serotipos y biotipos | 62 |
| IV.2. Susceptibilidad antimicrobiana | 64 |
| IV.2.1. Actividad de las cefalosporinas y flouroquinolonas frente a las cepas estudiadas | 70 |
| IV.3. Análisis de la Multirresistencia | 71 |
| IV.4. Determinación de plásmidos conjugativos de resistencia | 74 |
| IV.5. Electroforesis en gel de campo pulsado | 75 |
| V. CONCLUSIONES | 84 |
| VI. RECOMENDACIONES | 85 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 86 |
| VII.1. Referencias bibliográficas | 86 |
| VII.2. Bibliografía del autor relacionada con la tesis | 111 |
| VII.3. Bibliografía del autor no relacionada con la tesis | 113 |
| VII.4. Presentación en eventos científicos | 114 |
| VIII. ANEXOS | 117 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS:

A/C: Amoxicilina/ácido clavulánico.

ADN: Ácido desoxirribonucléico.

AMP: Ampicilina.

CAT: Enzima cloranfenicol acetil transferasa.

CL: Cloranfenicol.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

CRO: Ceftriaxona.

CTX: Cefotaxima.

D.O: Densidad óptica.

DNE: Dirección Nacional de Estadística.

DTT: Vacuna triple contra difteria-coqueluche-tétanos.

ECP: Electroforesis en campo pulsado.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético

H. influenzae NT: *H. influenzae* no tipable

H. influenzae: *Haemophilus influenzae*

HTM: Haemophilus Test Medium.

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

LNR/IPK: Laboratorio Nacional de Referencia del IPK.

LOS: Lipooligosacárido.

MEB: Meningoencefalitis bacteriana.

MINSAP: Ministerio de Salud Pública.

NAD: Dinucleotido de nicotinamida.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PBS: Solución salina fosfato

PC: Polisacárido capsular.

PFP: Proteínas fijadoras de la penicilina.

PM: Peso Molecular.

PME: Proteínas de membrana externa.

PRF: Polirribosil ribitol fosfato.

RCP: Reacción en cadena de la polimerasa.

RIF: Rifampicina.

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.

SNVMEB: Sistema Nacional de Vigilancia de las Meningoencefalitis Bacterianas.

SXT: Cotrimoxazol

TBE: Solución de Tris Borato EDTA.

TET: Tetraciclina

UFC: Unidad formadora de colonias.

UV: Luz ultravioleta

I INTRODUCCIÓN

I.1. Introducción

Haemophilus influenzae es un patógeno exclusivo del hombre y puede ser capsulado o no. Margaret Pitman describió seis serotipos a principios de los años treinta, siendo el más virulento al que se le denominó serotipo b. *H. influenzae* serotipo b (*H. influenzae* b) causa enfermedades invasivas graves tales como meningitis, epiglotitis, sepsis, neumonía, celulitis y artritis entre otras (CDC, 1998; Campos, 2001; Takemura y De Andrade, 2001). Es el agente etiológico más frecuentemente aislado entre las meningoencefalitis bacterianas (MEB) de la edad pediátrica y la segunda causa más importante de las neumonías bacterianas en diversas partes del mundo (Lagerstrom et al, 2003; Russell et al, 2003). 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, 1997; Sánchez et al, 1999; Devarajan, 2001).

La edad infantil está asociada con un aumento de la incidencia de infecciones por *H. influenzae* b (Kurkdjian et al, 2000; Debbia et al, 2001; Takemura y De Andrade, 2001). Más del 85% de las enfermedades invasivas ocurren en los menores de 5 años y más del 65% en niños con menos de 2 años, el número mayor de casos se presenta entre los 6 y 12 meses de edad. Un patrón estacional característico ha sido descrito en varios estudios, con un pico entre octubre y diciembre, una disminución de los casos en enero-febrero y un segundo ascenso entre febrero-mayo. Otros factores de riesgo asociados son, los déficit inmunitarios, la raza, el tabaquismo pasivo, el tipo de lactancia, el hacinamiento familiar, el número de hermanos, la asistencia a círculos infantiles y el nivel socioeconómico, así como, las posibles alteraciones asociadas al microorganismo (Mitsuda et al, 1999; Novakova et al, 1999; Simarro, 2000; Bakir, 2002; Chi et al, 2003; Neto et al, 2003; Nielsen et al, 2004; Sulikowska et al, 2004).

I. Introducción

La meningitis ocupa el 52% de todas las patologías graves ocasionadas por este agente. No obstante, la incidencia de la enfermedad en los estudios realizados es una estimación, una aproximación a la realidad que puede ser sobreestimada o subestimada según el número de pacientes que cumplen la definición de casos, así como, la población diana en situación de riesgo. La meningitis puede diagnosticarse con un relativo éxito desde el punto de vista clínico, por lo que su incidencia puede ser comparada mientras que sean utilizadas poblaciones de referencia similares (Campos, 1999; Peltola, 2000^a).

Las cepas de *H. influenzae* tipo b, pueden ser portadas asintomáticamente entre el 1-5% de la población; la tasa de portadores es menos frecuente entre los adultos y niños menores de dos años y resulta mayor en los niños con edad preescolar. La colonización con cepas no capsuladas es más común y a las mismas se les reconoce como causa de otitis media, bronquitis y sinusitis (Dimopoulou et al, 1997; Ayyildiz et al, 2003; Chi et al, 2003; Farjo et al, 2004), pero muy raramente son responsables de enfermedad invasiva (Dagan et al, 2001; Murphy, 2003; Lee et al, 2005). La quimioprofilaxis ha sido utilizada para tratar de prevenir la transmisión secundaria por *H. influenzae* b (Bones, 1982; Santosham et al, 2000), sin embargo, con la disponibilidad de las vacunas, los programas rutinarios de inmunización, prometen ser, el método más eficaz para prevenir los casos clínicos (Peltola, 2000^b; Campos et al, 2004).

La incidencia de enfermedad invasiva por *H. influenzae* b varía a escala continental, nacional y local (Jordens y Snack, 1995; Prats et al, 1996; Peltola, 2000^b; Almuneef et al, 2001; CDC, 2001; Zhou et al, 2002; Lagerstrom et al, 2003; Preston, 2003). En Estados Unidos la incidencia de MEB ocasionada por *H. influenzae* b era de 50-60 x 100 000 habitantes antes de la introducción de la vacunación, 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 Sudamérica, Asia u Oceanía (Decker et al, 1992; Santosham, 1993; Peltola, 2000^a; CDC, 2001).

I. Introducción

Tasas superiores a 20 pero menores 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 presentan en Uruguay, Hong Kong, Arabia Saudita y Qatar (Peltola, 2000^a; Takemura y De Andrade, 2001; Tauber et al, 2001; Almuneef et al, 2001).

En Cuba, la incidencia de MEB por *H. influenzae* b 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 1989-1998 (Dirección Nacional de Estadística, DNE, Minsap), Estos valores son similares a los de países con un desarrollo económico superior al de Cuba y se aleja de la hipótesis, de que las mayores tasas de meningitis por *H. influenzae* b, en niños menores de 4 años, ocurren en países en vías de desarrollo. Una explicación a este fenómeno lo constituye la excelencia del sistema de salud cubano que da cobertura total a toda la población y mantiene un adecuado sistema de vigilancia epidemiológica con componente microbiológico, de las enfermedades de declaración obligatoria.

En los países donde se han logrado coberturas de vacunación entre el 90 y 100% se ha observado una reducción evidente del número de casos de enfermedad invasiva (Zhou et al, 2002; Garner y Weston, 2003; Hviid y Melbye, 2004; Gessner et al, 2005), no obstante el agente no ha sido erradicado (Scheifele et al, 2005) y aunque los bajos valores de incidencia de MEB alcanzados después de la vacunación se han mantenido estables, han sido reportados discretos incrementos en el tiempo, básicamente, 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 y se aconseja continuar la vigilancia microbiológica con vistas a conocer las cepas invasivas circulantes en la era postvacunal, así como, realizar su caracterización bioquímica y molecular (McVernon y Heath, 2003; Pushparajah et al, 2003; Trotter et al, 2003).

Los estudios de vigilancia microbiológica encaminados a conocer las características de las cepas circulantes de *H. influenzae* se basan en el empleo de métodos que permitan caracterizar las

I. Introducción

propiedades bacterianas relacionadas con los procesos infecciosos. Así, pueden establecerse 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, quien en 1931, clasificó las cepas en serotipos. Esta subdivisión resulta de vital importancia, si se tiene en cuenta que la patogenicidad severa se asocia casi exclusivamente a cepas que poseen cápsulas 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^a)

Se han desarrollado otros métodos, de mayor o menor grado de complejidad, para la caracterización de *H. influenzae* como son, el estudio de las proteínas de membrana externa (PME) por electroforesis en gel de arcilamida (SDS-PAGE), y el tipaje electroforético, entre otros. La técnica de electroforesis del ácido desoxirribonucléico 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 (Selander et al, 1986; Aparicio et al, 1996; Dimopoulou et al, 1997; Gómez de León et al, 2000; Dabernat et al, 2003)

Otro aspecto de gran interés en la caracterización de las cepas de una región geográfica determinada es, sin duda, el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana. Hasta 1973, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana "in vitro" para *H. influenzae* no eran necesarias 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 informaron fracasos del tratamiento con ampicilina en pacientes con meningitis por *H. influenzae*, los que se atribuyeron a factores no inherentes a la resistencia 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%

I. Introducción

(Gunn et al, 1974; Khan et al, 1974; Thomas et al, 1974; Tomeh 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; Brook y Gober, 2004; Brown y Rybak, 2004)

Actualmente, la resistencia de *H. influenzae* b a los antimicrobianos es 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; Fuchs et al, 2000; Ito y Furukawa, 2001; Anon et al, 2004). También se han reportado cepas resistentes al cloranfenicol, cotrimoxazol, tetraciclinas, cefalosporinas y a la rifampicina (Machka et al, 1988; Matsumoto et al, 2004). Es por esta razón que cobra más fuerza la vigilancia microbiológica y el monitoreo de los patrones de resistencia, con el fin de, orientar las acciones terapéuticas a seguir.

Es incuestionable que estamos en una nueva era de la epidemiología de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* que requerirá de un sistema de vigilancia capaz de realizar un adecuado estudio y seguimiento de las cepas circulantes, antes, durante y posteriormente a las vacunaciones masivas.

En el presente trabajo, se muestran los resultados obtenidos, en el monitoreo sistemático desde el año 1989 hasta el 2003, con el objetivo de, determinar las principales características de las cepas de *H. influenzae* circulantes en Cuba.

I.2 Hipótesis

La vigilancia microbiológica de las cepas de *H.influenzae*, aisladas en Cuba, permitirá comprobar su relación clonal en la etapa prevacunal, y la marcada disminución de la circulación del serotipo b y las cepas multirresistentes en el período post vacunal.

Para dar respuesta a esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

I. Introducción

I.3 Objetivos

Objetivo General:

Caracterizar por métodos microbiológicos las cepas de *H. influenzae* circulantes en Cuba durante el período comprendido entre 1989-2003

Objetivos específicos:

1. Conocer la distribución de serotipos y biotipos entre las cepas de *H. influenzae* aisladas en Cuba.
2. Estudiar la evolución de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *H. influenzae* aisladas de casos de MEB.
3. Identificar los patrones genéticos y la relación clonal de las cepas circulantes de *H. influenzae* b, mediante el empleo de la técnica de electroforesis en campo pulsado.

1.4 La novedad científica del presente trabajo consiste en los siguientes aspectos:

- Se conocieron las principales características de las cepas de *H. influenzae* en Cuba, los serotipos y biotipos más frecuentes, así como la evolución de la resistencia antimicrobiana.
- Se establecieron por primera vez en el país, nuevos procedimientos de laboratorio y novedosas tecnologías que permitieron un diagnóstico rápido, específico y la identificación confirmatoria de *H. influenzae*.
- Se aplica por primera vez en Cuba una tecnología de punta como la ECP para la caracterización de cepas de *H. influenzae*.
- Se presentan los primeros resultados sobre la caracterización molecular y la relación clonal de cepas de *H. influenzae* b aisladas de MEB en Cuba.

1.5 El valor teórico del presente trabajo, radica en que se conoce por primera vez en nuestro país el comportamiento de las cepas circulantes de *H. influenzae*, lo cual trasciende a nivel

I. Introducción

internacional. Se realiza un estudio de todas las cepas viables recibidas en el LNR/IPK en un período de 15 años consecutivos, y los cambios observados luego de la introducción de la vacunación. Mediante el trabajo realizado se cuenta con la historia microbiológica de las cepas de *H.influenzae* circulantes y un documento de valor científico que puede ser utilizado como referencia en estudios que se realicen en un futuro.

Los resultados obtenidos en esta tesis han recibido los siguientes reconocimientos: Logro de la Academia de Ciencias de Cuba (1989), Mención Provincial XIII Forum de Ciencia y Técnica (1997), Premio Relevant XV Forum Nacional de Ciencia y Técnica (1999), Resultados Relevantes Institucionales (1989, 1990, 1991, 1993, 1995, 1997, 1998, 2001) y Premio de la Academia de Ciencias de Cuba (1999). Estos resultados se encuentran publicados en 16 revistas nacionales o extranjeras y en 5 internacionales, además han sido presentados en 25 eventos científicos (9 nacionales y 16 internacionales).

1.6 El valor práctico que se deriva de este estudio es que los resultados obtenidos permitieron la introducción de nuevas tecnologías, rápidas y específicas, para el diagnóstico de las MEB causadas por *H. influenzae*, la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, y los estudios de epidemiología molecular de las cepas de *H. influenzae* pertenecientes al serotipo b.

Se perfeccionó la vigilancia de la resistencia antimicrobiana con la adopción de los criterios internacionales, y se demostró la baja circulación de cepas serotipo b multirresistentes, después de la introducción de la vacunación contra este agente en Cuba.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Antecedentes históricos

La primera descripción de microorganismos similares a *Haemophilus* se le accredita a Robert Koch, quien en 1882, lo describe en un examen directo, coloreado por tinción de Gram, de un exudado conjuntival. Sin embargo, es Robert Pfeiffer quien 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 denominándolo “Pfeiffer influenza bacillus” (Pfeiffer, 1893). No obstante, durante la pandemia de gripe entre 1918-1919 se cuestionó el papel de este microorganismo pues se observó que en ocasiones formaba parte de la flora normal del tracto respiratorio superior y no siempre causaba enfermedad.

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).

II.2 Taxonomía

De acuerdo a la novena edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Garrity et al, 2004), la posición taxonómica de este microorganismo es:

Reino Procarionte

División Bacteria

II Revisión Bibliográfica

Sección V Bacilos gramnegativos anaerobios facultativos

Orden Eubacteriales

Familia Pasteurellaceae

Género *Haemophilus*

Especie *influenzae*

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

Las especies que están asociadas con infecciones humanas son: *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* (Kilian, 1986; Campos, 1999).

II.3 *Haemophilus influenzae*

La especie tipo del género, *H. influenzae*, es un patógeno exclusivo del hombre, son bacilos o cocobacilos gramnegativos, por lo general son menores de 1µm de ancho y 0.5-2 µm de longitud, en ocasiones pueden formar hilos largos y filamentos con marcado pleomorfismo. 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 CO₂ entre 5-10% (Dajani et al, 1979; Mendelman y Smith, 1999).

Entre sus características metabólicas se destaca su capacidad de fermentar una serie de carbohidratos tales como glucosa, sacarosa y xilosa, obteniéndose como productos finales a los 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).

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 durante el agregado de 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).

II.4 Factores de virulencia de *H. influenzae*

II.4.1. Cápsula: Estructura y composición antigénica

H. influenzae puede ser capsulado o no. Las cepas no capsuladas suelen ser parte de la microbiota normal de la nasofaringe de los individuos sanos y se aislan frecuentemente en las infecciones de la mucosa del tracto respiratorio (Moxon, 1993; Talon et al, 2000; Dabernat et al, 2003; Fuentes et al, 2003), mientras que las cepas capsuladas causan la mayoría

II Revisión Bibliográfica

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).

La cápsula, constituye la envoltura más superficial de este microorganismo, actualmente 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 los casos clínicos con infecciones invasivas, constituyendo aproximadamente el 95% de todos los aislamientos de estas afecciones en los países desarrollados y en vías de desarrollo (Wilfred, 1990; Perdue et al, 2000; Skoczynska et al, 2000; Devarajan, 2001). El PC de las cepas del tipo b está constituido por un polímero lineal que contiene como unidad monomérica al polirribosil-ribitol-fosfato (PRF), 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 (Pittman, 1931).

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 tipos con antisueros capsulares (Pittman, 1931).

Debido a las propiedades antifagocíticas de la cápsula, el microorganismo puede tener una permanencia mayor en los epitelios mucosos y una mayor protección contra la lisis de la bacteria por anticuerpos independientes del complemento, otorgándole mayor posibilidad de sobrevivir en la circulación sanguínea (Wood, 1960; Tuyau y Sims, 1983; Zwahlen et al, 1983; Geme y Cuther, 1996).

II.4.2 Proteínas de la membrana externa

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; Munson y Grass, 1988).

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 discriminatorio desde el punto de vista epidemiológico. 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; Munson y Grass, 1988; 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).

Las PME P2, así como la P5, muestran tener relación con la expresión de la virulencia de este germen (Munson y Grass, 1988; Hiltke et al, 2003), y juegan un papel importante en la adherencia del microorganismo a la superficie mucosa y propician la colonización. Se han asociado también con fenómenos de invasividad y con la resistencia que presentan algunos microorganismos al efecto bactericida del suero humano normal (Van Alphen, 1983^b; Kimura et al, 1985; Munson, 1990).

II.4.3 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. Se extienden a la superficie y se encuentran en la membrana externa de *H. influenzae* (Clemans et al, 2001). Estudios “in vitro”, indican que

H. influenzae es capaz de expresar 2 estructuras adhesinas filamentosas morfológicamente distintas (Van Alphen, 1983^a; 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).

Estas estructuras han sido propuestas como mediadores de la adherencia a las células epiteliales bucales humanas "in vitro" y se ha observado 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). En base a esta propiedad, se han identificado 14 grupos serológicos de Pili hemaglutinantes y se ha señalado el posible papel potencial que tienen las fimbrias o pili como candidatos vacunales (Brinton et al 1989; Forney et al, 1992).

II.4.4 Proteasa IgA1

Este tipo de enzima ha sido encontrada en cepas que residen en las membranas mucosas, las que pueden llegar a hidrolizar las moléculas de inmunoglobulina A secretora (IgA) (Liu, 1992). Hay escasos 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 el papel que tiene la inmunidad contra el microorganismo en este sitio no está esclarecido, 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^b; Moxon y Wilson, 1991).

II.4.5. Lipooligosacárido

El lipooligosacárido (LOS) es un componente estructural de la membrana externa celular y contribuye de manera importante en 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

responsible de la diversidad antigenica 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 antigenicas 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^a; Liu, 1992; Van Alphen, 1993).

II.5. Patogenia de las infecciones por *H. influenzae*

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), provocar posteriormente una infección del tracto respiratorio bajo como neumonía o en el menor de los casos, una diseminación hematogena con focos secundarios distantes a la puerta de entrada y ocasionar cuadros de meningitis, epiglotitis, celulitis, pericarditis, osteo-artritis 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 del polisacárido de *H. influenzae* b y dar lugar a una respuesta adecuada de anticuerpos específicos a través de la activación T-independiente de células B. 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 sujeto 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

II Revisión Bibliográfica

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).

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 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).

El LOS es un componente de patogenicidad al inducir la formación de Interlukina I y el Factor de Necrosis Tumoral; activa la vía alternativa del complemento; altera la permeabilidad de la barrera hematoencéfalica; provoca la activación policlonal de los linfocitos B y tiene una acción tóxica sobre los cilios del epitelio respiratorio (Flesher e Insel, 1978; Tuyao 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).

Algunas PME como 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^a), mientras que la síntesis de la IgA proteasa, rompe a la IgA secretora y sérica con lo cual se inactiva el sistema de defensa del huésped. Este mecanismo facilita la adherencia, colonización y la subsiguiente infección de mucosas, por lo que tiene un papel importante en la patogénesis (Moxon y Wilson, 1991; Van Alphen, 1993; Gemo y Cuther, 1996).

Los mecanismos de respuesta inmune más importantes del huésped contra la infección por *H. influenzae* son los siguientes: factores mucosos locales que previenen la adherencia e invasión, la activación de la opsonización mediada por el complemento y de otros mediadores de la inflamación, la producción de anticuerpos locales (IgA) y sistémicos (IgG, IgM), la estimulación de la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y, por último, el papel escasamente 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 son los que conducen 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^b).

II.6. Inmunidad

Fothergill y Wright (1933), fueron 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.

Hoy en día 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 decrece rápidamente a partir del segundo trimestre y se mantiene baja hasta los 18 ó 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 antigenéticamente 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

II Revisión Bibliográfica

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 tercer o cuarto, y luego declina medida que aumentan los anticuerpos séricos anti-PC (Clemans et al, 2001).

Alrededor de los 3 a 5 años de edad, muchos niños no inmunizados han adquirido de manera natural anticuerpos anti-PC que estimulan la actividad bactericida y opsónica mediada por el complemento. Así mismo, otorgan la inmunidad protectora contra la infección sistémica en el ser 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; Puliye et al, 2001; Troter, 2003).

Otros factores asociados al riesgo de una infección invasiva por *H. influenzae* b 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 invasora (Mendelman y Smith, 1999; CDC, 2001; Millar et al, 2000; Skoczynska et al, 2000).

Así, pese a la indudable importancia que revisten los anticuerpos anti-PC, 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) y la capacidad protectora de estos anticuerpos ha sido demostrada en

infecciones experimentales (Pichichero e Insel, 1983; Moxon y Anderson, 1989; Anderson et al, 1987; Adegbola et al, 1998; Trotter et al, 2003).

II.7. Epidemiología

Las infecciones invasivas por *H. influenzae* b son reconocidas como un problema de salud pública que afecta a los 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).

El mayor impacto recae sobre las poblaciones infantiles más pobres. 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, Costa Rica, Uruguay, Brasil y Chile, 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).

Desde el punto de vista epidemiológico, el principal factor predisponente 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 de la enfermedad se produce entre los seis y los once meses (Shapiro y Ward, 1991; Munsonet 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).

La principal fuente de infección de *H. influenzae* la constituyen los portadores sanos que albergan el microorganismo en la nasofaringe (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

II Revisión Bibliográfica

en aquellos que asisten a las guarderías, en los cuales la presencia del microorganismo en la nasofaringe puede persistir durante varios meses (Raymond et al, 2001; Dunais et al, 2003; Neto et al, 2003).

La prevalencia de portadores de *H. influenzae* b en la población general fluctúa entre el 0.4-5%, y en los menores de 5 años puede variar entre un 10 y 15% (CDC, 2001; Raymond et al, 2001; Fuentes et al, 2003; Dabernat et al, 2003). 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). Por su parte el estado de portador de cepas de *H. influenzae* no tipables (*H. influenzae* NT) en los niños en edad preescolar es elevada y se incrementa en aquellos que asisten a las guarderías, llegando a ser entre el 50 - 80% (Sarangi et al, 2000; Raymond et al, 2001; Dunais et al, 2003; Neto et al, 2003).

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 nasofaringea, de algunas semanas de duración, y sólo en una minoría de los casos se traduce en infecciones invasivas (Sarangi et al, 2000; Dunais et al, 2003; Neto et al, 2003).

II.8 Diagnóstico microbiológico de *H. influenzae* b

Los productos patológicos utilizados para el diagnóstico de *H. influenzae* b pueden variar en dependencia del proceso infeccioso, no obstante, en el caso de las infecciones invasivas, son muy útiles las muestras de sangre, LCR, líquido articular, líquido pleural y la orina, entre otros (Campos y Sáez-Nieto, 2001; Rodríguez et al, 2002).

II.8.1 Examen directo: 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).

II.8.2 Diagnóstico rápido: Se han desarrollado diferentes sistemas rápidos para el diagnóstico de *H. influenzae* b directamente a partir 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).

II.8.3 Cultivo: La recuperación de *H. influenzae* 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 CO₂ entre un 5-10% (Evans et al, 1974; Campos y Sáez-Nieto, 2001). 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 aquellas muestras que normalmente no son estériles (Fuentes et al, 2003).

La identificación de *H. influenzae* en el laboratorio se puede lograr mediante las 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). La técnica de la estría estafilocócica en agar sangre puede utilizarse para recuperar especies de *H. influenzae* a partir de muestras clínicas y sigue siendo igualmente utilizada como una prueba de identificación presuntiva útil (denominada satelitismo) para los miembros de esta especie. Las colonias de *H. influenzae* aparecen como colonias diminutas satélites 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 (Killian, 1979^a; Evans et al, 1974; Campos y Sáez-Nieto, 2001).

II.9 Caracterización microbiológica

II.9.1 Serotipificación

Los antígenos capsulares son serológicamente específicos y los mismos son utilizados en la obtención de antisueros específicos para la clasificación de cepas capsuladas. Los aislamientos que no poseen cápsulas, se les denomina *H. influenzae* NT. Es importante recordar que la cápsula puede perderse en los subcultivos y que esta estructura se deteriora en los cultivos viejos; por lo tanto es necesario realizar la serotipificación a partir de siembras con menos de 24 horas de incubación y lo más pronto posible después del aislamiento primario (Pittman, 1931; Campos y Sáez-Nieto, 2001).

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 portaobjetos (Campos y Sáez-Nieto, 2001; Bokermann et al, 2003).

Hasta la fecha, la serotipificación por aglutinación en lámina es el método recomendado para la identificación del tipo capsular en los aislamientos de *H. influenzae*. Sin embargo, algunas cepas cuando son aisladas de procesos invasivos, no son reconocidas como tipo b por este método; y sugieren que pueden ser variantes de cepas de *H. influenzae* b, pues genéticamente tienen la capacidad de sintetizar PC pero no lo expresan, haciendo imposible su detección por los métodos convencionales. Se recomienda entonces utilizar la técnica de RCP como 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 (Jordens y Slack, 1995; Falla et al, 1994). 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 (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).

II.9.2 Biotipaje

Kilian, 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^a). Posteriormente, Gratten describió un nuevo biotipo, denominándolo VII, y Sottnek y Albritton describieron al biotipo VIII (Gratten et al, 1994).

Los aislamientos de *H. influenzae* implicados en procesos severos, 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 (Oberhofer y Back, 1993), 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*.

II Revisión Bibliográfica

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

II.9.3 Subtipaje

Las cepas de *H. influenzae* pueden agruparse de acuerdo a SDS-PAGE. Así algunos autores 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^a) han diferenciado 6 subtipos en cepas invasivas. Por todo lo anterior, se deduce que los diferentes estudios sobre la utilización de las PME como marcadores microbiológicos han demostrado un número limitado de subtipos con poca utilidad en los estudios epidemiológicos.

II.9.4 Electroforesis en campo pulsado

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

II Revisión Bibliográfica

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).

La enzima SmaI resulta eficaz para los estudios del ADN cromosomal de *H. influenzae*, reportándose la existencia de 10 a 12 sitios de reconocimiento de la enzima, 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; Tsien et al, 1999; Yano et al, 2000; Popovic et al, 2001; Ben-Hamouda et al, 2003). Actualmente, es la técnica más común 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).

II.10 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 llevaron a buscar mecanismos para modificar el antígeno PRP, de manera de hacerlo reconocible por 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). Existen cuatro tipos de vacunas conjugadas licenciadas que difieren básicamente en el tamaño y contenido del PRP,

II Revisión Bibliográfica

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

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

El esquema clásico de vacunación recomendado por la Academia Americana de Pediatría es 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. En los niños mayores de 1 año, una sola dosis resulta suficiente (CDC, 1998; Olowokure et al, 2000).

En sentido general, se administran al mismo tiempo que la vacuna triple contra la difteria-coqueluche-tétanos (DTT) y la antipoliomielítica como parte integral del programa de inmunización infantil de rutina, y la virtual erradicación de la enfermedad invasiva por microorganismos del serotipo b entre los niños de corta edad, es evidente en numerosos países (Garpenholt et al, 2001; Tauber et al, 2001; Campos et al, 2004; Hviid y Melbye, 2004).

II.11 Epidemiología de las enfermedades invasivas por *H. influenzae* en las poblaciones vacunadas

Se considera que la aplicación generalizada de la vacuna conjugada contra *H. influenzae* tipo b ha constituido uno de los más importantes avances de la salud pública contra los procesos infecciosos en las últimas dos décadas, conllevando a una disminución considerable de las infecciones invasivas causadas por este agente. Algunas 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, han quedado disipadas tras varios años de un uso amplio 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 el riesgo de 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^a; Villo Sirerol et al, 2004).

II.12 Tratamiento de las infecciones invasivas ocasionadas por *H. influenzae*

Durante mucho tiempo el tratamiento inicial fue la ampicilina más cloranfenicol, aunque el primero de estos antimicrobianos ya ha sido descartado por la aparición frecuente de cepas de *H. influenzae* que producen β-lactamasas y muestran resistencia a la ampicilina (Seaton et al, 2000; Dabernat et al, 2002).

De acuerdo a las recomendaciones de los clínicos y los 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 un total de una a dos semanas (Kurkdjian et al, 2000; Devarajan, 2001) .

De cualquier forma, es bueno destacar que para la elección del antibiótico se deben tener en cuenta los modelos de resistencia local del microorganismo ante los diferentes antimicrobianos, la forma clínica de presentación y la gravedad de la misma, así como el estado inmunológico y 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).

II.13 Quimioprofilaxis

El riesgo de enfermedad secundaria es mayor del habitual, en los contactos de pacientes con infección por *H. influenzae* b. Por lo tanto, 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. Los niños menores de 12 años deben ser tratados con rifampicina en una dosis de 20 mg/kg, una vez al día durante 4 días (Granoff y Ward, 1984; Peltola, 2000^b; Santosham, 2000).

Es necesario considerar la profilaxis con rifampicina a los contactos en las guarderías; pero cada decisión debe ser individualizada y tomado 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).

II.14 Resistencia antimicrobiana

Hasta 1973, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana "in vitro" para *H. influenzae* no eran necesarias porque virtualmente todos los aislamientos de importancia clínica eran sensibles a la ampicilina, el fármaco de elección en ese momento para tratar la meningitis y la sepsis causadas por este agente. A pesar de que en 1968, se informaron fracasos del tratamiento con ampicilina en pacientes con meningitis por *H. influenzae*, éstos se atribuyeron a otros factores y no a la resistencia por parte del microorganismo. En 1972, Mathies describe por primera vez cepas β-lactamasas positivas, 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 (Llop et al, 1999; De Andrade et al, 2001; Strathounski et al, 2001; Jones et al, 2002).

Actualmente, la resistencia de *H. influenzae* a los antimicrobianos es un problema clínico y epidemiológico que alcanza 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 señalada 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).

También se ha reportado resistencia a otros antimicrobianos como el cotrimoxazol, tetraciclinas, 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). Resulta mucho más serio aún, el hallazgo de cepas multirresistentes (Campos et al, 1984; Amarnath et al, 1992). De aquí la importancia de continuar la vigilancia microbiológica y el monitoreo de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana en cada región, con vistas a contribuir en las acciones terapéuticas a seguir (Llop et al, 1999; Campos, 2001).

II.15 Mecanismos de resistencia

La microbiota del cuerpo humano es versátil y puede cambiar bajo determinadas circunstancias y factores, asociados o no al hombre. Constituye el reservorio de un gran número de agentes bacterianos cuyo rango incluye desde bacterias gramnegativas y grampositivas, hasta gérmenes anaerobios e incluso microorganismos aeróbicos desprovistos de pared celular (Ferguson, 2004).

La 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).

II Revisión Bibliográfica

Tal microcosmos bacteriano provee una excelente oportunidad para la transferencia de genes de resistencia. La microbiota del cuerpo humano, por lo tanto, actúa como un reservorio para tales mecanismos de resistencia (Del Campo et al, 2003; Shimada et al, 2003). El uso profiláctico de antibacterianos antes de procederes quirúrgicos, tratamientos de abscesos orales o enfermedades peridontales entre otras, pueden contribuir al reservorio de cepas resistentes (Ferguson, 2004).

La primera β -lactamasa reportada en una bacteria comensal del tracto respiratorio superior, fue hallada en una cepa de *H. influenzae* en la década de los 70, consistió en la enzima TEM-1 que había sido descrita por primera vez en *Escherichia coli*. La enzima TEM-1, principal mecanismo de la 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 β -lactamasas han sido identificadas en bacterias grampositivas y gramnegativas del tracto oral (Roberts, 1997; Ferguson, 2004).

Los antibióticos β -lactámicos actúan sobre la pared celular bacteriana bloqueando su síntesis; por lo que se obtiene un efecto bacteriostático y más tarde bactericida. Su excelente efecto antimicrobiano se ve limitado por la existencia de β -lactamasas producidas por una gran variedad de microorganismos, entre los cuales se cuenta *H. influenzae*. Estas enzimas rompen eficientemente el anillo β -lactámico con la producción de ácido penicilinóico, lo que causa muchos de los fracasos terapéuticos con el uso de las penicilinas, ampicilinas y cefalosporinas (Thornsberry, 1985). La resistencia a los β -lactámicos 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 (Miyazaki et, 2001; Ponte et al, 1999; Del Campo et al, 2003).

II Revisión Bibliográfica

Una segunda enzima β -lactamasa, denominada ROB, ha sido descrita en *H. influenzae* en un pequeño plásmido, idéntico virtualmente a uno detectado en patógenos bacterianos tales como especies de *Actinobacillus* y *Pasteurella* (Juteau y Levesque, 1990; Roberts, 1997).

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), el 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 β -lactamasas.

Por otra parte, el mecanismo de resistencia al cloranfenicol 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 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).

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

La enzima responsable para la resistencia al trimetoprim es una hidrofolato reductasa, la cual está codificada por genes móviles integrados en el cromosoma, aunque 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 esta droga (Campos et al, 1984; Levy et al, 1993).

II.16 Pruebas de susceptibilidad “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 muy usado como sinónimo de susceptible, el cual significa que un microorganismo es inhibido o muerto en las pruebas “in vitro” por una concentración del antimicrobiano accesible 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 de esa susceptibilidad (OPS, 1998).

II.16.1. Prueba cualitativa

II.16.1.1. Método por difusión en agar

El método de Kirby-Bauer, utiliza un medio de cultivo sólido en placas de Petri y discos de papel impregnados con el antimicrobiano en 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 desarrollo microbiano alrededor del mismo), luego de haber incubado las placas a la temperatura y el tiempo adecuados (OPS, 1998).

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

Este método de 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).

II Revisión Bibliográfica

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).

II.16.2 Pruebas cuantitativas: determinación de la concentración mínima inhibitoria

II.16.2.1 Método por dilución

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es un método utilizado para medir cuantitativamente la actividad “in vitro” de un antimicrobiano frente a un microorganismo aislado, la cual se expresa en la concentración del antibiótico en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/mL}$). La CMI representa la menor concentración del antimicrobiano capaz de producir inhibición total del crecimiento bacteriano (OPS, 1998). La determinación de la CMI se puede realizar por la técnica de dilución en caldo, dilución en agar y la prueba de Epsilon o E-test (Jorgensen et al, 1988; Jorgensen et al, 1991; Ohkusu et al, 2000).

II.16.2.1a 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.

Para llevar a cabo esta determinación, las placas se inoculan con el aislamiento bacteriano a ensayar y se incuban a $36-37^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas (NCCLS, M7-A5, 2000).

II.16.2.1b Dilución en caldo

El método de dilución también puede realizarse en medio líquido (caldo). Existen dos formas diferentes 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 µL. Actualmente, el método de dilución en caldo, se considera como el más reproducible y económico en el caso de *H. influenzae* (NCCLS, M7-A5, 2000).

II.16.2.1c Prueba de Epsilon

La prueba de Epsilon o (E-test), es un método desarrollado para determinar la CMI en µg/mL de los agentes antimicrobianos individuales en medio agarizado. 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, la cual es colocada en una placa de agar que porta un inóculo estandarizado de la bacteria a investigar (Jorgensen et al, 1988; Ohkusu et al, 2000).

Las placas se incuban en condiciones apropiadas (atmósfera, temperatura) durante el tiempo necesario, después de lo cual se observan 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 corresponde a la CMI (Jorgensen et al, 1988; Ohkusu et al, 2000).

III. Materiales y Métodos

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. Cepas de estudio.

El Sistema Nacional de Vigilancia de las MEB (SNVMEB) vigente en Cuba, establece que todas las cepas aisladas de casos de MEB sean enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LNR/IPK) para su confirmación y estudio.

Para el presente trabajo fueron seleccionadas todas las cepas viables, recibidas y confirmadas como *H. influenzae*, en el período comprendido entre enero de 1989 a diciembre del 2003 (n=1149), aisladas de niños menores de 5 años con MEB.

Distribución de cepas viables recibidas por provincia y años 1989-2003. LNR/IPK

| Provincias | 1989-1990 | 1991-1992 | 1993-1994 | 1995-1996 | 1997-1999 | 2000-2003 | Total |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|
| Pinar del Río | 14 | 2 | 1 | 5 | 19 | 2 | 43 |
| Habana | 12 | 9 | 1 | 3 | 4 | 0 | 29 |
| Ciudad de la Habana | 91 | 85 | 43 | 16 | 56 | 10 | 301 |
| Matanzas | 15 | 13 | 3 | 5 | 14 | 7 | 57 |
| Cienfuegos | 15 | 8 | 7 | 3 | 12 | 1 | 46 |
| Sancti Spiritus | 13 | 7 | 5 | 3 | 12 | 0 | 40 |
| Villa Clara | 12 | 9 | 6 | 7 | 14 | 3 | 51 |
| Ciego de Avila | 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 |
| Santiago de Cuba | 77 | 61 | 42 | 25 | 15 | 9 | 229 |
| Granma | 12 | 7 | 12 | 6 | 17 | 3 | 57 |
| Guantánamo | 13 | 9 | 11 | 5 | 2 | 1 | 41 |
| Isla de la Juventud | 9 | 4 | 0 | 3 | 1 | 0 | 17 |
| Cepas viables | 347 | 238 | 172 | 108 | 232 | 52 | 1149 |

III. Materiales y Métodos

Para el análisis de los resultados, los aislamientos se dividieron en dos etapas, una denominada etapa prevacunal, que comprendió desde enero de 1989 hasta diciembre de 1999 (n=1097), y otra nombrada etapa postvacunal (n=52), donde se incluyeron las cepas recibidas desde enero del 2000 hasta diciembre del 2003.

III.2. Identificación de los aislamientos

La identificación se llevó a cabo mediante el método descrito por Campos y Sáez-Nieto (2001).

III.2.1. Microscopia

Mediante la tinción de Gram, se comprobó la presencia de bacilos cocoides, cortos, pequeños, pleomórficos y que en ocasiones aparecían en cadenas. Se verificó que fueran gramnegativos.

III.2.2 Condiciones del cultivo y aislamiento

Los aislamientos y cultivos de las cepas se realizaron en agar chocolate con base GC, columbia o tripticasa soja (Oxoid), enriquecido con NAD (15 µg/mL) y hematina (15 µg/mL). La incubación se llevó a cabo a 35-36 °C en atmósfera de CO₂ al 5% (OPS, 1998).

III.2.3 Determinación del requerimiento de los factores V y X

Se emplearon placas de agar Mueller-Hinton (Oxoid), las cuales fueron inoculadas con una asada de un cultivo puro de la cepa de *H. influenzae* investigada (OPS, 1998). Posteriormente, se colocaron los discos (a una distancia de 1 cm entre cada uno), impregnados con los factores V, X y V+X (Difco), sobre la superficie del agar en el área de inoculación (Bisgard, 1999). Las placas fueron incubadas a 35-36 °C con 5% de CO₂ durante 18 horas, y posteriormente se examinaron visualmente. El crecimiento solamente alrededor del disco del factor V+X, correspondió a aislamientos probables de la especie *H. influenzae* (Campos y Sáez-Nieto, 2001) (Anexo1).

III. Materiales y Métodos

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) y *H. influenzae* ATCC 49144 (Requiere factores V y X).

III.2.4 Determinación de β hemólisis

III.2.4.1 Procedimiento

Las cepas se sembraron por agotamiento sobre el agar base sangre columbia (Oxoid), enriquecida con sangre de conejo o caballo al 3%, de forma tal, que se obtuvieran colonias aisladas. Se incubó durante 18-24 horas a 35 °C en atmósfera de CO₂ al 5%.

La prueba se consideró positiva cuando se observó β-hemólisis alrededor de las colonias aisladas (OPS, 1998).

Como control de la prueba se utilizaron las siguientes cepas:

H. influenzae ATCC 10211 (no hemólisis).

H. haemolyticus (β hemólisis).

III.2.5 Prueba de la catalasa

Se recogieron con un asa plástica desechable, varias colonias de un cultivo de 18-24 horas de incubación, las cuales se colocaron en un portaobjetos de vidrio y se añadió sobre las mismas, 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)

III. Materiales y Métodos

III.2.6 Determinación de aumento de crecimiento en incubación con atmósfera de CO₂

III.2.6.1 Procedimiento.

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

Se incubaron dos placas de agar chocolate con 1 µl de la suspensión de la cepa a investigar. Una placa fue incubada en atmósfera con 5% de CO₂ y la otra en aerobiosis, pero ambas con la misma humedad.

La prueba se consideró positiva si únicamente hubo crecimiento en la placa de incubada en atmósfera con 5% de CO₂, o si el crecimiento que apareció en la placa incubada sin CO₂ se observó inhibido. Además, 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 CO₂ (OPS, 1998).

III.2.7 Fermentación de carbohidratos

Se utilizó un caldo base enriquecido, que contenía una concentración con un 1% de los diferentes carbohidratos investigados y como indicador Rojo Fenol, el cual permaneció rojo en pH alcalino y cambió a amarillo cuando el pH descendió por debajo de 6.8 (Anexo 2).

Se utilizaron los siguientes carbohidratos: glucosa, lactosa, fructosa, manitol, manosa, sacarosa y xilosa (solución al 10%, esterilizada por filtración), que se añadió a un caldo base contenido rojo fenol enriquecido con NAD y hematina (OPS, 1998) (Anexo 2).

III.2.7.1 Procedimiento

Cada tubo contenido el caldo base y el carbohidrato correspondiente, se inoculó 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.

III. Materiales y Métodos

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 control 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 Glucosa, Sucrosa y Manosa; negativa a Lactosa)

III.3 Determinación del serotipo capsular

La prueba se realizó por aglutinación en lámina usando los antisueros comerciales Difco. A partir de un cultivo puro, se preparó una suspensión bacteriana equivalente a la escala No.1 de MacFarland en tubos conteniendo solución salina estéril al 0,85%. Posteriormente, se tomaron 50 µL de dicha suspensión y se colocaron en una lámina portaejemplares, en la cual se adicionó 50 µL del antisero a probar. Las láminas se mantuvieron con un movimiento de rotación constante durante 1 minuto, observándose una reacción de aglutinación evidente cuando la cepa correspondía al serotipo del antisero probado. La prueba se consideró negativa cuando existió ausencia de aglutinación (Bisgard, 1999).

Para un uso correcto de los mismos, las cepas se enfrentaron primeramente a un suero polivalente que contenía los anticuerpos capsulares de los seis serotipos descritos; en los casos donde la reacción resultó positiva se probó entonces con cada uno de los antisueros monovalentes específicos de cada serotipo, a, b, c, d, e y f. Cuando no se obtuvo aglutinación frente al suero polivalente, la cepa se clasificó como no capsulada o *H. influenzae* NT (OPS, 1998; Bisgard, 1999).

III.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa para el tipaje capsular

Todas las cepas agrupadas como *H. influenzae* NT por la técnica de aglutinación en lámina, fueron procesadas para conocer si portaban el gen para la expresión de la cápsula serotipo b. La extracción de ADN se realizó directamente a partir de las colonias del microorganismo en

III. Materiales y Métodos

estudio. Se seleccionaron de 8-10 colonias de un cultivo puro en agar chocolate, elaborado con base GC (Oxoid) y se resuspendieron en 500 µL de agua destilada estéril. La suspensión se colocó en baño de agua a 100 °C durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 13,000 x g. Se transfirieron 40 µL del sobrenadante a un nuevo tubo, que fue utilizado como fuente de ADN inmediatamente, o almacenados a -20 °C hasta su determinación posterior (Falla et al, 1994).

La mezcla de la reacción contenía en un volumen de 50 µL: 0.01 % de Gelatina (Oxoid), 10 mM Tris-HCl (pH=8.3) (Merck), 50 mM KCl (Merck), 1.5 mM MgCl₂ (Merck), 100 µM de cada deoxinucleósido trifosfato (Promega), 85 pMol de cada cebador (CIGB, Cuba), 2.5 U de Taq polimerasa (Promega) y 5 µL del ADN muestra extraído previamente (Falla et al, 1994).

La reacción se llevó a cabo por 30 ciclos en un termociclador (Eppendorf), bajo las siguientes condiciones: 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de hibridación a 65 °C y 2 minutos de extensión a 72 °C, seguidos de un ciclo final en el que toda la reacción se incubó durante 10 minutos adicionales a 72 °C (Falla et al, 1994). El producto de amplificación (10 µL) se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, se tiñó con Bromuro de Etilio (0,4-1,0 µg/mL) y se examinó a través de un transiluminador de luz ultravioleta (UV). La corrida electroforética se llevó a cabo a 80 V con solución de Tris Borato EDTA, pH=8 (TBE). El patrón de peso molecular utilizado fue φ174 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden).

Cebadores utilizados:

| Descripción | Secuencia 5'-3' | Tamaño Amplicon (bp) |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Juego 1 (HI1-HI2) | CGT TTG TAT GAT GTT GAT CCA GAC TGT CCA TGT CTT CAA AAT GAT G | 470 |
| Juego 2 (b1-b2) | GCG AAA GTG AAC TCT TAT TCT CTC GCT TAC GCT TCT ATC TCG GTG AA | 610 |

III. Materiales y Métodos

III.4 Determinación de biotipos

La identificación de los diferentes biotipos se realizó en base a tres reacciones bioquímicas: Producción de indol, actividad de la ureasa y descarboxilación de la ornitina.

III.4.1 Producción de indol

Se inocularon tubos que contenían 4 mL de caldo triptofano (Anexo 3) con el microorganismo en estudio y se incubaron a 35-36 °C durante 18 - 24 horas. Pasado este tiempo, se añadieron a cada tubo 5 gotas del reactivo de Kovac (Anexo 3). El desarrollo de un anillo de color rojo en la capa de cloroformo indicó la producción de indol (Kilian, 1979^a; Gratten et al, 1994).

Como cepas controles se emplearon:

Control positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922 (indol positivo)

H. influenzae (LNR IPK) biotipo I (indol positivo)

Control negativo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 49132 (indol negativo)

H. influenzae (LNR IPK) biotipo IV (indol negativo)

III.4.2 Hidrólisis de la urea

Para determinar la hidrólisis enzimática de la urea, se inoculó directamente, una asada del cultivo a investigar sobre la superficie de tubos que contenían agar urea de Christensen (Anexo 4). Se incubó a 35-36 °C durante 18 - 24 horas y si la reacción era positiva, se observó un cambio de color de amarillo (medio sin inocular) a rosa intenso (alcanilización), el cual se inició en la zona de inoculación, extendiéndose poco a poco a todo el medio. Con los microorganismos no degradadores de la urea, el medio conservó el color amarillo original (OPS, 1998; Bisgard, 1999).

Las cepas controles empleadas fueron:

III. Materiales y Métodos

H. influenzae biotipo I (controles positivos del LNR IPK)

H. influenzae biotipo V (controles negativos del LNR IPK)

III.4.3 Descarboxilación de la ornitina

A partir de un cultivo puro de 18 horas de incubación, del microorganismo en estudio, se inocularon 2 tubos con caldo descarboxilasa de Möeller (Anexo 5), uno con el aminoácido a ensayar (ornitina) y otro sin el aminoácido (control). Se adicionaron 0,5 mL de aceite mineral estéril, a ambos tubos, y se incubaron a 35-36 °C durante 18 - 24 horas (OPS, 1998; Bisgard, 1999). La prueba se consideró positiva si después de la incubación, el tubo contenido ornitina, presentó un color azul púrpura (Kilian, 1979^a; Bisgard, 1999).

Las cepas controles fueron:

Control positivo: *H.influenzae* (LNR IPK) biotipo I, ornitina positiva

Control negativo: *H. influenzae* (LNR IPK) biotipo IV, ornitina negativa

III.5 Conservación de los aislamientos

Los aislamientos una vez identificados como *H. influenzae* se conservaron en caldo triptona de soja con glicerol (Merck) al 15% y se mantuvieron a -70 °C, hasta la realización de la susceptibilidad antimicrobiana y las técnicas de caracterización molecular (Votava y Stritecka, 2001).

III.6 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se llevó a cabo en todas las cepas incluidas en el presente estudio (n=1149).

III. Materiales y Métodos

III.6.1 Método de difusión en agar o Kirby-Bauer.

A partir de un cultivo puro de la cepa en estudio, se seleccionaron de 5 a 10 colonias, y se preparó una suspensión en solución salina estéril, con un patrón de turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

A partir de esta suspensión y antes de que pasaran 15 minutos, con un hisopo estéril, se realizó la siembra en placas de Agar Mueller Hinton enriquecido con NAD y hematina (Haemophilus Test Medium o HTM) (Anexo 6) (Jorgensen et al, 1987) en tres direcciones, con el fin de asegurar la uniformidad del inóculo. Las placas del medio HTM empleadas, con un diámetro de 90 mm, contenían 25 mL de medio lo cual correspondía con una altura de 7 mm de agar. Posteriormente, con la ayuda de una pinza estéril, se colocaron los discos de antimicrobianos seleccionados, sobre la superficie del agar, presionándolos ligeramente para asegurar el contacto. Por cada placa de agar HTM se colocaron 5 discos de los antimicrobianos a estudiar.

La incubación se realizó a 35-36 °C en atmósfera con 5% de CO₂ durante 18 - 24 horas. Las lecturas se realizaron midiendo en milímetros los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco (NCCLS, 2000).

III.6.1.2 Control de calidad.

Cepas controles utilizadas: *H.influenzae* ATCC 10211 y *H.influenzae* ATCC 49629

III. Materiales y Métodos

III.6.1.3 Antimicrobianos utilizados (NCCLS, M2-A5, 2002)

Los antimicrobianos utilizados, su procedencia e interpretación de los diámetros de los halos de inhibición (NCCLS, M2-A7, 2000), se describen a continuación:

| Agente antimicrobiano | Carga del disco | Interpretación del diámetro de la zona de inhibición (mm). | | |
|--------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------|----------|
| | | R | I | S |
| Ampicilina* | 10 µg | ≤ 18 | 19-21 | ≥ 22 |
| Amoxicilina/ácido clavulánico* | 20/10 µg | ≤ 19 | - | ≥ 20 |
| Cefotaxima* | 30 µg | - | - | ≥ 26 |
| Cefaclor* | 30 µg | ≤ 16 | 7-19 | ≥ 20 |
| Tetraciclina* | 30 µg | ≤ 25 | 26-28 | ≥ 29 |
| Ciprofloxacina* | 5 µg | - | - | ≥ 21 |
| Cotrimoxazol* | 1.25/23.75 µg | ≤ 10 | 11-15 | ≥ 16 |
| Azitromicina* | 15 µg | ≤ 10 | 11-12 | ≥ 12 |
| Cloranfenicol* | 30 µg | ≤ 25 | 26-28 | ≥ 29 |
| Rifampicina* | 5 µg | ≤ 16 | 17-19 | ≥ 20 |

*Casa Comercial Oxoid o Biolife.

De forma adicional se realizó la determinación de la susceptibilidad a 5 fluoroquinolonas (moxifloxacín, ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, gatifloxacina), en 107 cepas pertenecientes a la etapa prevacunal con diferentes patrones de susceptibilidad antimicrobiana. De acuerdo al número de cepas estudiadas en dicha etapa (n=1097), se seleccionaron todas las cepas pertenecientes a los patrones de resistencia cuyo número no excedía a 10. En el caso de los patrones de resistencia que contenían más de 10 cepas se seleccionó de forma aleatoria, el 10% de las mismas. Del total de cepas sensibles en el período, se seleccionó aleatoriamente el 5%.

III. Materiales y Métodos

Número de cepas y patrones de susceptibilidad para la determinación de la actividad de las fluoroquinolonas frente a 107 cepas de *H. influenzae* b.

| Patrón de Susceptibilidad | Numero de cepas |
|----------------------------------|------------------------|
| SENSIBLES | 31 |
| AMP/SXT | 5 |
| SXT | 4 |
| CL/TET | 8 |
| TET/SXT | 3 |
| AMP/TET | 2 |
| CL/TET/SXT | 3 |
| AMP/SXT/TET | 4 |
| AMP/CL/TET | 3 |
| AMP/SXT/CL | 13 |
| AMP/SXT/CL/TET | 31 |
| Total | 107 |

TET:tetraciclina, SXT: cotrimoxazol, AMP: ampicilina, CL:cloranfenicol.

Los discos de los antimicrobianos utilizados, la procedencia de los mismos y la lectura de los halos de inhibición se describen a continuación (NCCLS, M2-A7, 2000):

III. Materiales y Métodos

| Agente antimicrobiano | Carga del Disco | Interpretación del diámetro de la zona de inhibición (mm) | | |
|-----------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------|---|-----|
| | | R | I | S |
| Moxifloxacín | 5 µg | - | - | ≥18 |
| Ciprofloxacina | 5 µg | - | - | ≥21 |
| Levofloxacina | 5 µg | - | - | ≥17 |
| Ofloxacina | 5 µg | - | - | ≥16 |
| Gatifloxacín | 5 µg | - | - | ≥18 |

III.6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

III.6.2.1 Método de dilución en caldo (NCCLS, M7-A5, 2002).

Todas las cepas incluidas en el presente estudio (n=1149) fueron estudiadas por el método de microdilución en caldo y se utilizaron placas de poliestireno, de 96 pocillos (Costar). El volumen de trabajo fue de 0.1mL por pocillo.

III.6.2.2 Procedimiento.

III.6.2.2a Preparación de la solución madre del antibiótico.

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 diluyentes empleados (Anexo 7):

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

III. Materiales y Métodos

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

III.6.2.2b Preparación de las soluciones seriadas

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

III.6.2.3 Antimicrobianos utilizados y rangos seleccionados (NCCLS, M7-A5, 2002).

| Antimicrobiano | Símbolo | Procedencia | Rango utilizado |
|-------------------------------|----------------|---------------------------------------|------------------------|
| ampicilina | AMP | Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA | 0.06-256 mg/L |
| amoxicilina/ácido clavulónico | A/C | Gautier-Bagó, La Habana, Cuba | 0.25/0.12-8/4 mg/L |
| cefotaxima | CTX | Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA | 0.06-4 mg/L |
| ceftriaxona | CRO | Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA | 0.06-4 mg/L |
| cotrimoxazol | SXT | Empresa Farmacéutica, La Habana, Cuba | 0.25/4.75-8/152 mg/L |
| tetraciclina | TET | Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA | 0.25-64 mg/L |
| cloranfenicol | CL | Merck, Barcelona, España | 0.25-64 mg/L |
| rifampicina | RIF | Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA | 0.25-8 mg/L |

III.6.2.4 Preparación del medio de cultivo

Se empleo el medio de cultivo 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 µg/mL) y NAD (Sigma)(15 µg/mL) (Anexo 6).

III. Materiales y Métodos

III.6.2.5 Recubrimiento de la microplaca

Se colocaron 50 µL de la primera dilución del antimicrobiano en los pozos de la columna 1, en la columna 2, se colocaron 50 µL de la dilución del tubo 2 y así sucesivamente hasta la columna 10 (Ver esquema de la placa de microdilución).

Esquema empleado en las lecturas de la CMI

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

En las columnas 11 y 12 se depositaron 50 µL del caldo HTM (control de esterilidad y control de crecimiento respectivamente).

III.6.2.6 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 (1.5×10^8 UFC/mL).

Se procedió entonces a realizar una dilución 1/100 (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.

III. Materiales y Métodos

III.6.2.7 Inoculación de la microplaca

Se adicionaron 50 µL 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 pues fue el pozo destinado para el control de esterilidad, no obstante se adicionaron 50 µL de caldo HTM. El volumen final de cada pozo de la microplaca fue de 100 µL. La incubación se realizó a 35 °C, en aerobiosis por 16-18 horas y en ambiente húmedo.

III.6.2.8 Lectura

La lectura de la CMI 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 CMI 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.

III.6.2.9 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 β-lactámicos combinados con inhibidores de beta lactamasa.

III.7 Determinación de la actividad β-lactamasa

La prueba se realizó a todas las cepas resistentes a la ampicilina.

III. Materiales y Métodos

III.7.1 Procedimiento

Utilizando láminas portaobjetos, se colocó una gota de la solución de nitrocefínsa (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).

III.8 Determinación de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT)

A todas las cepas resistentes a cloranfenicol se les realizó la determinación de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (OPS, 1998).

III.8.1 Procedimiento

A partir de un cultivo puro de una cepa de *E. coli* ATCC 25922 sensible al cloranfenicol, se preparó una suspensión en caldo tripticasa soya con una turbidez igual al tubo No. 3 de la escala de McFarland. La suspensión fue sembrada en placas de agar tripticasa soya (Oxoid), con hisopo estéril en tres direcciones (técnica de Kirby-Bauer). Luego, se colocaron en cada una de las placas, 4 discos de papel de filtro Watman No.1, estériles de 8.5 mm de diámetro, separados aproximadamente por 2 cm de distancia entre sí y del borde de la placa de Petri.

Sobre uno de los discos se colocó, con ayuda de una pipeta Pasteur estéril, un inóculo del aislamiento de *H. influenzae* en estudio y se extendió de manera que cubriera toda la superficie del disco. En otros dos discos, se siguió el mismo procedimiento pero con cepas de *E. coli* (una productora de CAT y otra no productora). El cuarto disco se dejó como control de esterilidad del

III. Materiales y Métodos

papel de filtro utilizado. Posteriormente sobre cada uno de los 4 discos empleados, se colocó un sensidisco de cloranfenicol de 30 µg. La incubación se realizó a 37 °C en atmósfera aeróbica y se procedió a las lecturas a partir de las 6 horas después de la incubación (OPS, 1998).

III.8.1 Lectura

CAT positiva: No se observó inhibición del crecimiento de *E.coli*, alrededor del disco inoculado con la cepa de *H.influenzae* en estudio, o sea dicho aislamiento produjo la enzima CAT.

CAT negativa: Se observa un halo de inhibición de crecimiento de *E.coli*, alrededor del disco inoculado con la cepa de *H.influenzae* en estudio, o sea dicho aislamiento no produjo la enzima CAT.

III.9 Detección de plásmidos conjugativos de resistencia

Cepas: Se estudió el total de cepas viables recibidas desde octubre de 1997 a octubre de 1999 (n=112) de *H. influenzae* b, procedentes de las diferentes provincias del país y con diferentes patrones de susceptibilidad: AMP/SXT/CL/TET (71 cepas), AMP/CL/TET (2 cepas), AMP/SXT/CL (13 cepas); SXT (3 cepas), CL/TET (1 cepa), SXT/TET (1 cepa), Sensibles (21 cepas).

Patrón de susceptibilidad y número de cepas seleccionadas para la detección de plásmidos:

| Patrón de susceptibilidad | Número de cepas |
|----------------------------------|------------------------|
| SENSIBLES | 21 |
| SXT | 3 |
| CL/TET | 1 |
| SXT/TET | 1 |
| AMP/CL/TET | 2 |
| AMP/SXT/CL | 13 |
| AMP/SXT/CL/TET | 71 |
| Total | 112 |

TET:tetraciclina, SXT: cotrimoxazol, AMP: ampicilina, CL:cloranfenicol; Fuente: LNR/IPK

III. Materiales y Métodos

Se aplicó la técnica de RCP descrita por Leaves et al, (2000). La mezcla de la reacción contenía en un volumen de 50 µL: 0.1 U de Taq polimerasa (Promega) , 0.01 % de Gelatina (Oxoid), 10 mM Tris-HCl (pH=8.3) (Merck), 50 mM KCl (Merck), 1.5 mM MgCl₂ (Merck), 250 µM de cada deoxinucleósido trifosfato (Promega), 1 µM de cada cebador (CIGB, Cuba) y 1 µL del ADN muestra extraído previamente, mediante calentamiento durante 10 minutos de una suspensión bacteriana de la cepa en estudio. Para detectar la presencia de plásmidos tanto integrados como no integrados al cromosoma, se utilizaron los cebadores F₁ en combinación con R₂. Para la detección de los plásmidos no integrados, se utilizaron los cebadores F₂ con R₁ en reacciones independientes para cada cepa. Un tercer juego de cebadores F₂ con Y₁ fue empleado para aquellos plásmidos que sólo se encontraban integrados al cromosoma.

Cebadores empleados para la detección de plásmidos (Leaves et al, 2000).

| Descripción | Secuencia 5'-3' | Tamaño Amplicon (bp) |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Juego 1: | F ₁ : TCA GTA ATG TTT GTA TCA GCC R ₂ : CGT GTA CCT AGA CAA TAC AC | 370 |
| Juego 2 | F ₂ : GTG TAT TGG CTA GGT ACA CG R ₁ : GGG AGCTTC TTC AGT TAA AG | 410 |
| Juego 3 | F ₂ : GTG TAT TGG CTA GGT ACA CG Y ₁ : ACA CCT TTC GGT GCT TAC TT | 240 |

La reacción se llevó a cabo por 25 ciclos en un termociclador (Eppendorf), bajo las siguientes condiciones: 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de hibridación a 60 °C y 2 minutos de extensión a 72 °C, seguidos de un ciclo final en el que toda la reacción se incubó por 10 minutos adicionales a 72 °C . El producto de amplificación (10 µL) se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, se tiñó con bromuro de etidio (0.4-1.0 µg/mL) y se examinó a través de un transiluminador de luz ultravioleta (UV). La corrida electroforética se llevó a cabo a 80 V

III. Materiales y Métodos

con solución de Tris Borato EDTA, pH=8 (TBE). El patrón de peso molecular utilizado fue φ174 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden).

III.10 Electroforesis de ADN en Gel de Campo Pulsado.

Cepas: Se estudió el total de cepas viables recibidas desde octubre de 1997 a octubre de 1999 (n=112) de *H. influenzae* b, procedentes de las diferentes provincias del país y con diferentes patrones de susceptibilidad: AMP/SXT/CL/TET (71 cepas), AMP/CL/TET (2 cepas), AMP/SXT/CL (13 cepas); SXT (3 cepas), CL/TET (1 cepa), SXT/TET (1 cepa), Sensibles (21 cepas).

III.10.1 Procedimiento

El ADN total se preparó y procesó según Cerquetti, et al, (2000). Se utilizó la enzima de restricción *Sma*I, 10 U (MBI, Fermentas) a 30 °C. Los fragmentos de restricción se separaron por ECP en un gel de agarosa al 1 % en tampón TBE al 0,5 % (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0) (Anexo 8) (BioRad Mapper apparatus). El tiempo del pulso inicial de 5 segundos, se incrementó linealmente a 50 segundos. La corrida se efectuó durante 23,3 horas a 6 V/cm a una temperatura de 13 °C. Se aplicaron escaleras λ como marcadores de tamaño molecular, tamaño de 50 a 1.000 kb (ECP Marker I-Boehringer-Mannheim). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta.

III.10.2 Extracción del ADN en bloques de agarosa, (Aparicio et al, 1996)

1).- Las cepas fueron inoculadas agar chocolate (Base GC, Oxoid) y se incubaron a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ durante toda la noche.

2).- Varias colonias se inocularon en tubos Corning de 50 mL, conteniendo 10 mL de caldo cerebro corazón (Oxoid) suplementado con NAD (15 µg/L) y hematina (15 µg/L), e incubados a 37 °C, con agitación durante 2-3 horas.

III. Materiales y Métodos

- 3).- Los caldos se centrifugaron durante 15 minutos a 6000 rpm, el sobrenadante se desechó y el sedimento obtenido, se diluyó en 10 mL de solución de lavado (Anexo 8), se resuspendió y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones.
- 4).- Se preparó la agarosa de bajo punto de fusión al 2 % en solución de lavado y se mantuvo a 55 °C, hasta su utilización.
- 5).- De acuerdo a la cantidad de sedimento obtenido, el mismo se resuspendió en 1-2 mL de solución de lavado (Anexo 8). Posteriormente se realizó una dilución 1/10 para medir la densidad óptica, 3600 µL de solución salina fosfato (PBS), (Anexo 7), y 400 µL de suspensión bacteriana. Se midió la densidad óptica (D.O) a 420 nm y se ajustó la suspensión, a 10^9 UFC /mL con PBS.
- 6).- En un baño de agua a 50 °C, se calentaron ligeramente, 500 µL de la suspensión bacteriana (previamente ajustada a 10^9 UFC/mL, con solución de lavado) (Anexo 8) y se añadieron 500 µL de agarosa. Luego, se mezcló la agarosa con la suspensión bacteriana y se llenaron los moldes (previamente sellados y numerados), evitando las burbujas. Con 1 mL se pudieron hacer de 4-6 bloques por cepa.
- 7).- Se dejó enfriar a 4 °C durante 15 minutos y los bloques se depositaron en frascos bijoux (hasta 4-6 bloques / bijoux) conteniendo 2 mL de solución de proteólisis con proteinasa K (Sigma) (250 µg / mL: 5 µL / mL de una concentración de 50 mg / mL) (Anexo 8). Se incubó a 55 °C durante 3 horas.
- 8).- Se renovó la solución de proteólisis y se incubó nuevamente toda la noche con la proteinasa K(Sigma) (Anexo 8).
- 9).- Se desechó la solución de proteólisis y se realizaron tres lavados con solución Tris-EDTA (1X) (Anexo 7), 10 minutos cada vez, a la temperatura ambiente, y con una agitación suave.

III. Materiales y Métodos

10).- Los bloques obtenidos se almacenaron en solución Tris-EDTA (Anexo 8) a 4 °C, y la solución se cambió una vez al mes.

III. 10. 3 Digestión con enzimas de restricción de los bloques (Aparicio et al, 1996)

1).- La mitad de un bloque se equilibró con 150 µL de la solución (1 X) de la enzima durante media hora a 4 °C.

2).- Posteriormente, se añadió la mezcla de digestión (Anexo 8) y se incubó a 30 °C durante 2 horas.

3).- La reacción se detuvo añadiendo solución Tris-EDTA. Los bloques se almacenaron en frascos bijoux a 4 °C por un período no mayor de 24 horas.

III.10.4 Electroforesis de los bloques en el sistema de campo pulsado CHEF, Bio-Rad

III.10.4.1 Preparación del Gel

El gel de agarosa se preparó disolviendo la agarosa (1,3 g) por calentamiento en 130 mL de solución TBE (Anexo 8). La solución obtenida se dejó enfriar a 50-60 °C y se añadió en una bandeja donde se ubicó el peine para formar los pocillos y posteriormente se depositaron las muestras a investigar. Una vez gelificada la agarosa, se retiró el peine y se añadieron los trozos de bloques en cada uno de los pocillos, los cuales fueron sellados con una pequeña cantidad de agarosa.

III.10.4.2 Preparación del equipo de ECP, CHEF, Bio-Rad

El tanque se llenó con 2L de la solución TBE 0,5 % (Anexo 8) y se dejó enfriar a 13 °C, antes de comenzar la electroforesis.

III. Materiales y Métodos

Condiciones de la electroforesis: Voltaje 6 voltios / cm, pulsos iniciales: 5 segundos, pulsos finales: 50 segundos. Duración de la electroforesis: 23 horas, 18 minutos.

III.10.4.3 Tinción del ADN

El ADN se visualizó en el gel mediante una tinción con bromuro de etidio (0,4-1,0 µg/mL) durante 15 minutos y posteriormente se observó bajo luz UV.

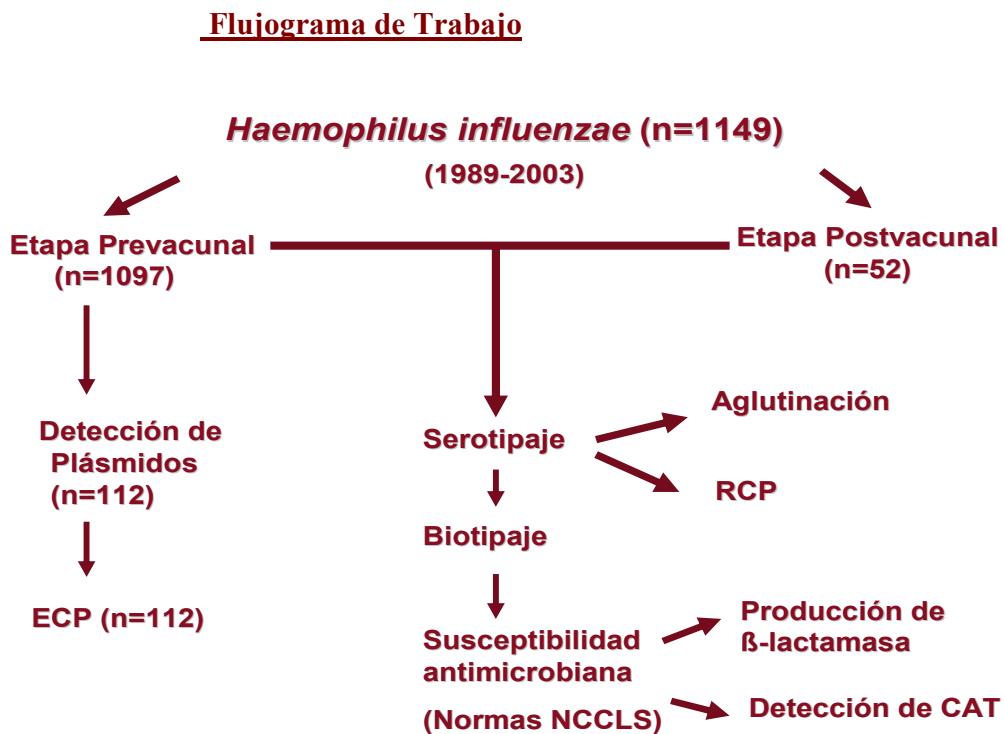
III.10.5 Análisis de los patrones de ECP obtenidos y representación gráfica de las relaciones genéticas

Los patrones de bandas obtenidos (10 a 12 bandas) fueron considerados iguales o diferentes tomando en cuenta los criterios de Tenover et al (1995), quienes plantean que dos aislamientos son idénticos, cuando difieren en no más de una banda; que están relacionados cuando la diferencia es de dos o tres bandas; posiblemente relacionados, cuando difieren entre cuatro a seis bandas; y son diferentes, cuando en siete o más bandas no hay correspondencia. Los patrones de restricción fueron determinados por fragmentos del genoma completo, excepto aquellos que estuvieron presentes en pequeñas cantidades que no se unían con suficiente cantidad de bromuro de etidio para ser visibles o eran tan pequeños (<6Kb) que quedaban al final de la corrida, tales fragmentos representaron una pequeña proporción del genoma y no se tuvieron en cuenta para el análisis.

Los fragmentos de ADN de los patrones se compararon visualmente y se interpretaron por el software MVSP Shareware. Los análisis de similitud y los dendogramas se hicieron mediante la construcción de una base de datos contenido el tamaño aparente de cada fragmento en comparación con los patrones de masa molecular conocidos.

III.11 Metodología general llevada a cabo en el presente trabajo

Toda la metodología llevada a cabo en el presente trabajo se muestra en el siguiente diagrama de flujo



III.12 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 (χ^2) para más de dos categorías, y la prueba de probabilidad exacta de Fisher fue empleada para valorar los valores de resistencia antimicrobiana en los diferentes años analizados.

IV. Resultados y Discusión

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.1 Caracterización de los aislamientos.

En el período de estudio que comprendió este trabajo se pudo recuperar un número considerable de cepas viables que representaron, el 68% del total de los aislamientos enviados por las diferentes provincias, en la etapa prevacunal y el 85% de las cepas recibidas por el LNR/IPK, en el período postvacunal.

IV.1.1 Distribución de los serotipos encontrados

Durante la etapa investigada, la distribución de los serotipos encontrados, reflejó que la gran mayoría (97.6%) perteneció al serotipo b (Tabla 1).

Tabla 1: Distribución de *H. influenzae*, según serotipos y cepas no capsuladas. 1989-2003

| Período | Número de cepas | Serotipos | | | | <i>H. influenzae</i> NT |
|------------------|--------------------|-----------------|---------------------|-----------------|------------------|-------------------------|
| | | a | b | e | f | |
| 1989-1999 | 1097 | 3 | 1064 | 5 | 9 | 16 |
| 2000-2003 | 52 | 0 | 48 | 0 | 1 | 3 |
| Total | 1149 | 3 (0.3%) | 1112 (96.8%) | 5 (0.4%) | 10 (0.8%) | 19 (1.6%) |

Se encuentra bien documentado que el serotipo b es el más frecuente entre las cepas invasivas. Ishiwada et al (2004) detectan en Japón, un 88.7% de aislamientos del serotipo b, en niños menores de 5 años con enfermedades invasivas. Resultados similares obtienen Takemura y Andrade (2001) en Brasil al señalar al serotipo b como responsable del 90% de las MEB en niños pequeños. También Skoczynska et al (2000) señalan que *H. influenzae* resulta la segunda

IV. Resultados y Discusión

causa de MEB en Polonia y el serotipo b se aísla en más del 90% de los casos investigados por ellos.

Los serotipos a, e y f también fueron detectados en este trabajo, entre los aislamientos de la etapa pre y postvacunal, aunque en porcentajes muy bajos (menos del 1%). Los serotipos e y f, han sido los que con mayor frecuencia se señalan 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. Esta situación ha sido señalada por Bruun et al (2004) quienes plantean que el serotipo f resulta el más frecuente en Dinamarca. Campos et al (2004) encuentran un 6.6% de cepas serotipo f y un 3.3% del serotipo e, entre los aislamientos pertenecientes a casos clínicos invasivos en España, mientras que en Estados Unidos, el serotipo f fue detectado en el 17% de las cepas aisladas de MEB (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 están particularmente relacionados con enfermedades respiratorias (Turk, 1984), en nuestro trabajo el serotipo a se detectó en el 0.3% de las cepas estudiadas, valor similar al encontrado por Adderson et al (2001) quienes reportan el hallazgo de 5 casos de enfermedad invasiva por *H. influenzae* serotipo a, en una investigación realizada durante un período de 10 meses.

Aunque los serotipos c y d, se han aislado en casos de meningitis y neumonía (Kwak et al, 2000; Sakata, 2002; Villo-Sirerol, et al, 2004), en este trabajo, no se identificaron entre las cepas estudiadas, no obstante el 1.5 % de las cepas fueron NT, y de estas tres correspondieron al período postvacunal. Ha sido demostrado por varios autores el hallazgo de elevados porcentajes de cepas NT, como causa de enfermedades invasivas, después de varios años de introducida la vacunación (Murphy et al, 1993). 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.

IV. Resultados y Discusión

Teniendo en cuenta estos hallazgos, consideramos que resulta de gran importancia continuar la vigilancia de las cepas aisladas en nuestro país. En la actualidad, ya se han comenzado a evaluar las primeras vacunas contra cepas NT de *H. influenzae*, las que hasta la fecha, cuentan con buenos resultados (Yasutomi, 2001; Kyd et al, 2003; Xin-Xing et al, 2003).

IV.1.2. Confirmación de cepas de *H.influenzae* NT, mediante la técnica de RCP

Las cepas que por métodos serológicos resulten no capsuladas, genéticamente pueden corresponder a *H. influenzae* b⁻; las cuales pueden descender espontáneamente de cepas capsuladas serotipo b y regresar a su condición de capsuladas cuando invaden un hospedero (Ishiwada et al, 2004). Al evaluar estas consideraciones decidimos emplear la RCP para comprobar los resultados obtenidos en el serotipaje (Figura 1).

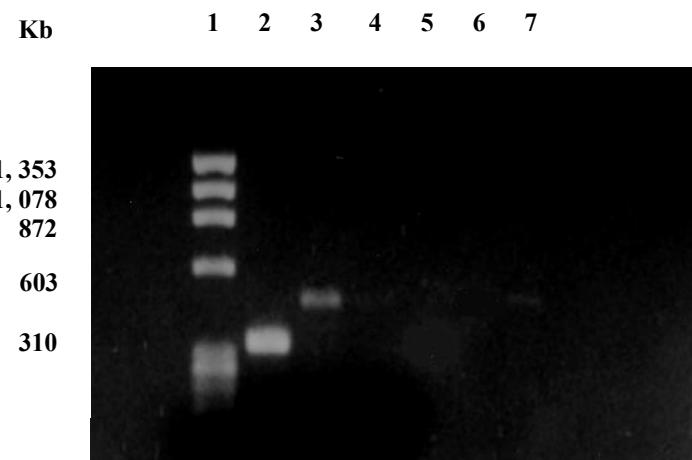


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de la RCP, en cepas de *H.influenzae*. La línea 1 muestra el marcador de peso molecular φ174. Las líneas 2 y 3 corresponden al producto de amplificación de una cepa serotipo b (control positivo) con los cebadores HI1-HI-2 y b1-b2, respectivamente. En las líneas 4 y 5, se observa que no hubo amplificación en las cepas NT con los mismos juegos de cebadores mencionados anteriormente. Las líneas 6 y 7, corresponden al control negativo (agua destilada) para cada juego de cebadores.

IV. Resultados y Discusión

Mediante esta técnica se confirmó que todos los aislamientos agrupados como *H. influenzae* NT, carecían definitivamente de cápsula, o sea, ninguno de ellos mostró productos de amplificación con los cebadores generales para determinar el tipo capsular (HI1-HI-2), ni con los cebadores específicos de tipo b (b1-b2) (Figura 1). Resultados similares han sido obtenidos por otros autores quienes no han detectado cepas con estas características entre los aislamientos correspondientes a casos clínicos invasivos (Smith-Vaughan et al, 1998; Singhi et al, 2002; Luong et al, 2004).

El papel de las cepas b⁻ en la era postvacunal todavía no está bien definido. Su aislamiento en individuos vacunados como causa de enfermedades invasivas, pudiera considerarse como un fracaso de la vacuna.

Las cepas b⁻ podrían constituir una fuente importante de cepas invasivas, por lo que resulta muy útil aplicar un método de tipificación seguro que permita su detección certera (Cerqueti et al, 2000). En la actualidad, el serotipaje mediante la RCP, constituye una técnica utilizada con relativa frecuencia en la caracterización de cepas de *H. influenzae* (Zasada y Paciorek, 2003; Fohlman et al, 2004; Marty et al, 2004; Parent du Chatelet et al, 2005).

La pérdida de la expresión de la cápsula en cepas de *H. influenzae* se ha demostrado "in vivo" y en las condiciones de laboratorio. También es de suma importancia, la identificación de los portadores sanos de *H. influenzae* b⁻ teniendo en cuenta que estas cepas, así como las verdaderamente NT, pueden llegar a ser potencialmente virulentas por transferencia genética natural de ADN, entre las mismas (Marty et al, 2004; Parent du Chatelet et al, 2005).

Contribución del Laboratorio de Referencia al SNVMEB

Teniendo en cuenta los resultados del serotipaje obtenidos por el LNR/IPK, y la evidencia de que el b era el serotipo más frecuente entre los aislamientos de MEB en nuestro país, las autoridades

IV. Resultados y Discusión

del Minsap, decidieron aplicar la vacuna contra *H. influenzae*, a partir de enero de 1999. Al tomar en cuenta dicha decisión se tuvo en cuenta, además, el número de casos de meningitis por *H. influenzae* b notificados anualmente en los menores de 4 años, la mala evolución clínica de los enfermos, las secuelas ocasionadas, y la efectividad lograda en los países donde se habían utilizado las vacunas conjugadas contra *H. influenzae* b (Mulholland et al, 1997; Peltola et al, 1999; 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).

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 una vacuna conjugada (Vaxem-Hib®), 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). El esquema de inmunización y las dosis de refuerzo utilizadas se muestran en el Anexo 9. Se logró una cobertura nacional del 97%.

En la Figura 2, se refleja la reducción obtenida en el número de casos de MEB por *H.influenzae*, así como el impacto de la vacunación en la circulación de cepas, se observa un marcado descenso en el año 1999.

IV. Resultados y Discusión

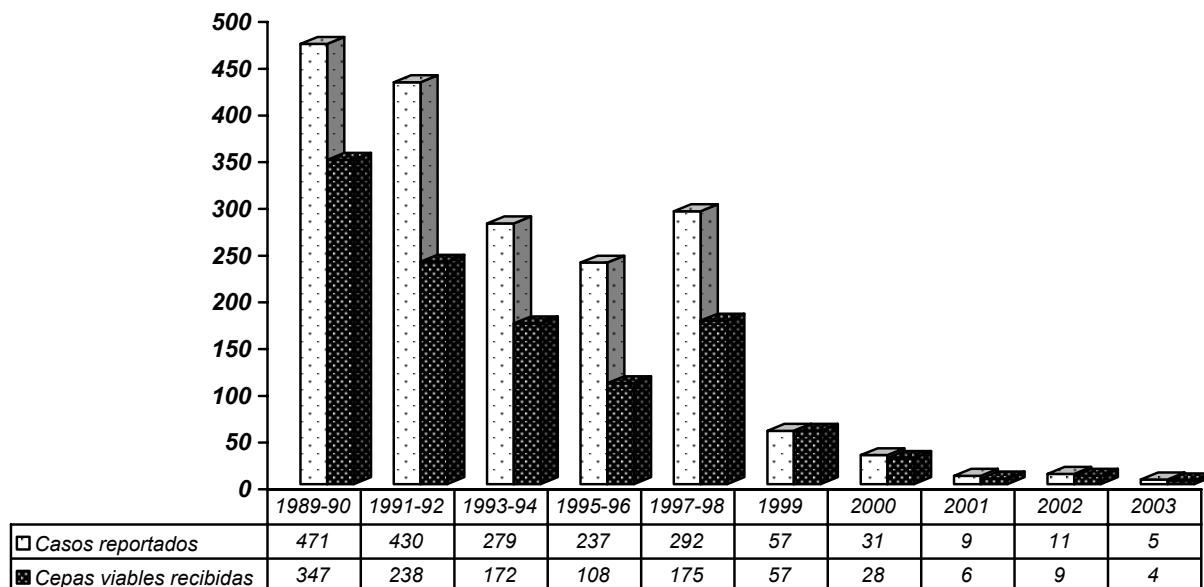


Figura 2. Distribución y número de *H. influenzae*, según los casos reportados en Cuba. 1989-2003
Fuente: LNR/IPK; DNE, MINSAF.

Posterior a la inmunización se apreció una disminución considerable (52.8%) del total de casos de MEB bajo vigilancia, en los menores de dos años, lo que representó, además, un descenso importante de la incidencia general a $1.3 \times 100\,000$ habitantes en el año 1999, y 0.6 por $100\,000$ habitantes en el 2000. Estos excelentes resultados reflejan la elevada eficacia de la vacuna, así como la excelente estrategia de inmunización efectuada en nuestro país (Dickinson et al, 2001).

Resultados similares a los de Cuba han sido señalados por otros autores. En Estados Unidos, antes del comienzo de la inmunización contra *H. influenzae* b, las tasas anuales de meningitis por este agente, en los menores de 4 años, fluctuaban entre 50 y $60 \times 100\,000$ habitantes y luego de la introducción de esta vacunación en 1988, la incidencia de la enfermedad disminuyó a 3.7 casos $\times 100\,000$ habitantes en 1991. En otros países como Gambia, después de iniciada la vacunación en 1993 contra *H. influenzae* b, la incidencia anual de meningitis por este agente

IV. Resultados y Discusión

disminuyó de 200 x 100 000 habitantes en 1990 a 21 x 100 000 habitantes en 1993 (Santosham, 1993; Peltola^b, 2000; CDC, 2001). Otros estudios realizados aportan evidencias de reducciones importantes en la incidencia de la enfermedad por este microorganismo. Datos provenientes de Inglaterra, 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 un 90% (Peltola, 2000^b; CDC, 2001; Kalias et al, 2004).

Expertos en el tema, plantearon que después de la introducción de la inmunización contra *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: posible emergencia de otros tipos capsulares (sobre todo los serotipos f, a y e), incluyendo cepas deficientes en la cápsula b, el traslado de la infección a otros grupos de edades, aumento de casos de enfermedades invasivas por cepas no capsuladas y los posibles fallos vacunales (Barbour et al, 1995; Campos, 1999; Bruun et al, 2004; Wandi et al, 2004).

En la actualidad, se observa atentamente si estos planteamientos teóricos han cumplimentado o no las expectativas planteadas. En el caso de Cuba los casos notificados de MEB por *H. influenzae* han sido escasos después de la introducción masiva de la vacunación y no se ha detectado un incremento de cepas correspondientes a serotipos diferentes al b o de *H. influenzae* NT. Los pacientes afectados por *H. influenzae* b, después de la puesta en marcha del programa de vacunación, han sido niños con esquemas de inmunización incompletos (Pérez, 2003 comunicación personal). Resultados similares han sido señalados en otros países (Barbour et al, 1995; Adegbola et al, 1999).

Por el contrario estudios bien documentados, exponen casos esporádicos debidos al serotipo b en países donde la vacuna se ha aplicado de forma generalizada (Aracil y Campos, 2003). En el Reino Unido, la incidencia al comienzo de la vacunación se calculó en 23.8 por 100 000

IV. Resultados y Discusión

habitantes en 1992, valor que disminuyó a $0,92 \times 100\,000$ habitantes al incorporar la vacuna conjugada en su calendario de inmunizaciones, sin embargo, este valor aumentó a $1.88 \times 100\,000$ habitantes en el 2001 y posteriormente a $2.81 \times 100\,000$ habitantes, a finales del 2002, lo cual provocó una alerta para los microbiólogos y epidemiólogos, sobre todo porque este ascenso fue reportado en niños correctamente inmunizados (Pushparajah et al, 2003; Trotter et al, 2003). Es de destacar que, en el esquema de vacunación aplicado en este país, no se incluyó la dosis de los 15 meses y esta medida pudiera ser una explicación a la problemática presentada (McVernon y Heath, 2003; Pushparajah et al, 2003). No obstante 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 hasta este momento se desconocen sus causas (McVernon et al, 2003; Rijkers et al, 2003). Una explicación a esta situación, pudiera ser la disminución de los títulos protectores contra *H. influenzae* b, transcurrido un tiempo determinado después de implementada la vacunación de rutina.

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 este agente, incluso en los portadores sanos (Bakir M, et al, 2002). Ello hace que se cuestione, si la no reexposición natural a este agente 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; Leino et al, 2002).

Por lo tanto, resulta imprescindible, que al introducir la vacunación en un área determinada se mantenga un seguimiento atento de la vigilancia respecto a la circulación de cepas, así como el estudio de los aislamientos antes, durante y posteriormente a la inmunización. Esta medida puede ayudar a conocer el comportamiento de las cepas y las posibles variaciones entre las mismas.

IV. Resultados y Discusión

IV.1.3 Relación entre los serotipos y biotipos

La relación entre los serotipos y biotipos se muestra en la Tabla 2, de los 8 biotipos descritos en la literatura, se identificaron 5. No se detectaron los biotipos III, VI y VIII.

El 91% de las cepas estudiadas perteneció a los biotipos I ó II. El resto se identificó en una proporción menor al 4%. El 78.5 % de las cepas del serotipo b perteneció al biotipo I y el resto de las cepas capsuladas correspondieron a los biotipos I, II, IV y V.

Tabla 2. Relación entre serotipos y biotipos en 1149 cepas de *Haemophilus influenzae* aisladas de MEB.

| Serotipos | Biotipos | | | | |
|--------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | I | II | IV | V | VII |
| a | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| b | 874 | 150 | 32 | 28 | 28 |
| e | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| f | 5 | 2 | 1 | 2 | 0 |
| HiNT | 1 | 1 | 4 | 9 | 4 |
| Total | 883 (76.8%) | 156 (13.6%) | 37(3.2%) | 41(3.5%) | 32(2.8%) |

HiNT: *H. influenzae* NT.

Generalmente los biotipos I y II se asocian con cepas tipables. Gratten et al (1994), señalaron el biotipo I en el 89.0 % de las cepas del serotipo b aisladas de niños hospitalizados en Australia, con enfermedades respiratorias, mientras que otros serotipos como el a y el c, pertenecieron principalmente a los biotipos II y III. Sharma et al (2002) en un estudio realizado en 120 cepas de *H. influenzae* aisladas de diferentes fuentes, encontraron que el biotipo I resultó el más frecuente entre las cepas tipables.

IV. Resultados y Discusión

En el caso de las cepas *H. influenzae* NT se detectaron los biotipos V, IV, VII y I en este orden de frecuencia y aunque sólo un aislamiento perteneció al biotipo I, el resto, fue similar a los biotipos encontrados entre las cepas capsuladas. Por lo general los aislamientos de *H.influenzae* NT presentan una mayor diversidad de biotipos y la detección del biotipo III y el VIII son frecuentes cuando los aislamientos pertenecen al tracto respiratorio (Leaves y Jordens, 1996).

Fuentes et al (2003) en un estudio realizado en portadores nasofaríngeos de *H. influenzae* en un círculo infantil de Ciudad de la Habana, encontraron que el 75% de las cepas pertenecientes al serotipo b correspondieron a los biotipos I y II, mientras que el biotipo III, fue el más frecuente entre las cepas no tipables. Por otra parte, Leaves y Jordens (1996), al estudiar 103 cepas de *H. influenzae* NT causantes de procesos invasivos en el Reino Unido, señalaron al III, IV y VII como los más frecuentes, 52 %, 42% y 24% respectivamente y describieron, además, la presencia del resto de los biotipos. No obstante, otros autores han identificado al biotipo II con una mayor frecuencia (Sharma et al, 2002; Begum et al, 2003).

Algunos autores que han investigado las cepas de *H. influenzae* b durante largos períodos, han planteado variaciones en los biotipos circulantes (Lucher et al, 2002; Dabernat et al, 2004). No obstante, en nuestro trabajo, el hallazgo de los biotipos I y II fue constante en todos los años de estudio y no detectamos que el resto de los mismos (IV, V y VII), predominaran en un periodo determinado.

IV.2 Susceptibilidad antimicrobiana

Los resultados del estudio de la susceptibilidad antimicrobiana mediante la CMI, frente a la ampicilina, cloranfenicol, cotrimoxazol, tetraciclina, rifampicina, ceftriaxona, cefotaxima y amoxicilina/ácido clavulánico de los 1149 aislamientos de *H. influenzae*, recuperados de todas las provincias de Cuba, en el período, de estudio aparecen descritos en la Tabla 3. Entre las cepas estudiadas de la etapa prevacunal, 488(44.4%) fueron resistentes a la ampicilina ($CMI \geq 4\mu\text{g/mL}$),

IV. Resultados y Discusión

449 (40.9%) al cloranfenicol (CMI \geq 8 μ g/mL), 530 (48.3%) al SXT (CMI \geq 4/76 μ g/mL) y 333 (30.3%) a la tetraciclina (CMI \geq 8 μ g/mL).

Tabla 3. Distribución de la resistencia encontrada mediante CMI, entre 1149 cepas de *H. influenzae*. 1989-2003.

| Años | Cepas estudiadas * | AMP N(%) | CL N(%) | SXT N(%) | TET N(%) |
|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Etapa prevacunal | | | | | |
| 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) |
| Total | 1097 | 488 (44.4) | 449(40.9) | 530 (48.3) | 333 (30.3) |
| Etapa postvacunal | | | | | |
| 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 |
| Total | 52 | 18(34.6) | 17(32.7) | 20 (38.5) | 9(17.3) |

*De acuerdo al número de cepas viables recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK.
TET, Tetraciclina; SXT, Cotrimoxazol; AMP, Ampicilina; CL, Cloranfenicol

El 100% de las cepas resultaron sensibles a: ceftriaxona, rifampicina, cefotaxima y amoxicilina/ácido clavulánico. Seiscientos diecinueve cepas (53.9%) fueron sensibles a todos los antimicrobianos estudiados.

IV. Resultados y Discusión

Todas las cepas resistentes a la ampicilina fueron productoras de la enzima β -lactamasa y mostraron una CMI $\geq 4 \mu\text{g/mL}$. Teniendo en cuenta el número de reportes sobre este tema en la literatura internacional, podemos considerar que el porcentaje de resistencia a la ampicilina encontrada en este estudio (44.4%) resulta elevado, y sólo comparable al de España, donde Campos et al (2004) notifican el 45.8% de resistencia entre las cepas aisladas de infecciones invasivas en un período de 2 años en una población de 5 millones de habitantes.

La producción de β -lactamasa entre cepas de *H.influenzae* ha mostrado una gran variabilidad geográfica. 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 Portugal (Melo-Cristino, et al, 2001) en una investigación multicéntrica nacional, demostraron que el 12.4% de las cepas aisladas de casos clínicos con neumonía producían β -lactamasa. Tasas de alrededor del 15% fueron detectadas en Francia y Bélgica (Schito et al, 2000). Bussetti et al (2003), señalaron una resistencia a la ampicilina del 15.8% en el noreste de Italia, en niños con procesos respiratorios, y todas las 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 entre las cepas aisladas de pacientes con infecciones respiratorias.

En Latinoamérica, los estudios encaminados a identificar la resistencia en cepas de *H. influenzae* son limitados, 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 β -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.

IV. Resultados y Discusión

En el caso de la resistencia a los otros antimicrobianos ensayados, existen referencias de países europeos donde los porcentajes de cepas no sensibles al cloranfenicol, doxiciclina y cotrimoxazol son inferiores a los encontrados por nosotros. 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%) mientras que en el cotrimoxazol, el porcentaje de cepas resistentes resultó por debajo del 30% (Schito et al, 2000; Morrissey et al, 2005).

Se plantea 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).

En un trabajo publicado por Campos et al (2004), se comprobó que los aislamientos capsulados fueron significativamente más resistentes a la ampicilina, tetraciclina y al cloranfenicol que los no capsulados. Hua et al (2004) en una investigación realizada en una determinada región de China durante un año, comunicaron diferencias estadísticamente significativas, en la resistencia encontrada a la ampicilina y al cotrimoxazol, en las cepas tipables aisladas de niños con infecciones respiratorias, en relación a los aislamientos obtenidos de cepas de *H.influenzae* NT.

En nuestro estudio, las cepas pertenecientes a otros serotipos (diferentes al b) mostraron valores similares a los detectados en los aislamientos correspondientes al serotipo b; no obstante, en las cepas no capsuladas se identificaron valores inferiores: ampicilina (10.5%), cloranfenicol (10.5 %), tetraciclina (15.7 %) y cotrimoxazol (31.5%).

Investigaciones realizadas por otros autores, con cepas aisladas de procesos no invasivos, reportan resultados similares, incluso hay casos donde resulta infrecuente 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

IV. Resultados y Discusión

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, demuestra el hallazgo de sólo un 8.5% de aislamientos resistentes a la ampicilina.

En nuestro país, Fuentes et al (2003) en un estudio 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 el 4% tetraciclina, sin embargo la resistencia al cotrimoxazol resultó más elevada (41.8%).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede catalogar de alarmante la problemática de la resistencia detectada, no sólo por los elevados porcentajes encontrados desde el comienzo del estudio, sino por el incremento 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 tetracilina (22.6-43.8%), aunque se debe destacar que sólo se halló diferencia estadísticamente significativa en el caso de la tetracilina ($p=0.011$; OR:0.36, 95% CI, 0.15-0.87).

Algunos trabajos demuestran un comportamiento similar en cuanto al incremento de la resistencia en el tiempo, Schito et al (2000) comprueban que la producción de β -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 la tetraciclina en cepas procedentes de procesos invasivos y respiratorios en algunos países (Powell et al, 1987; Seaton et al, 2000; Schito et al, 2000; Stratchunski et al, 2001; Jones et al, 2002, 2003).

IV. Resultados y Discusión

En la etapa postvacunal (2000-2003) el comportamiento de la resistencia en las cepas investigadas por nosotros fue diferente. Se observó una disminución de la resistencia, ampicilina (35.5 a 20%), cloranfenicol (32.2 a 20%), cotrimoxazol (41.9% a 20%) y para la tetraciclina (25.8% a 0%). Se demostró una diferencia estadísticamente significativa en el caso de la tetraciclina ($p=0.011$; OR: 0.36, 95% CI, 0.15-0.87).

La variación de la resistencia frente a los diferentes antimicrobianos ha sido estudiada en relación al consumo de los mismos, en una región determinada y se ha visto que existe una relación directamente proporcional (Hasegawa et al, 2003; Fergusson, 2004).

Se ha sugerido que la reducción de la resistencia puede lograrse con una adecuada educación a los pacientes sobre el consumo de los antibióticos y la importancia de no adquirirlos de 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 de la resistencia, es conocer y divulgar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas circulantes y realizar un análisis de cómo se puede disminuir el consumo de determinados antimicrobianos, los cuales deben ser siempre administrados por prescripción médica (Fergusson, 2004; Kawai et al, 2004).

La prevalencia de la susceptibilidad antimicrobiana a los agentes estudiados, el rango utilizado y la CMI para el 50% y el 90% de las cepas (CMI_{50} y CMI_{90}), de acuerdo a la producción de β -lactamasa se observa en la Tabla 4. Del total de cepas resistentes al cloranfenicol, el 90.8% resultaron ser productoras de β -lactamasa, 97% en el caso de la tetraciclina y el 67.7% para el cotrimoxazol.

IV. Resultados y Discusión

Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana en 1149 cepas invasivas de *H. influenzae* de acuerdo a la producción de β-lactamasa (Expresado en mg/L).

| Antimicrobiano | CMI ₅₀ | CMI ₉₀ | Rango | S (%) | No-sensible* (%) |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|------------------|
| Ampicilina | | | | | |
| Total | 1 | 256 | ≤0.06-256 | 55.6 | 44.4 |
| B lact - | 0.5 | 1 | ≤0.06-1 | 100 | 0 |
| B lact + | 64 | 256 | 1-256 | 0 | 100 |
| Cloranfenicol | | | | | |
| Total | 2 | 64 | ≤0.25-64 | 56.6 | 43.4 |
| B lact - | 1 | 2 | ≤0.25-64 | 96.6 | 3.4 |
| B lact + | 32 | 64 | ≤0.25-64 | 9.2 | 90.8 |
| Cotrimoxazol | | | | | |
| Total | 4/76 | >8/152 | ≤0.25/4.75->8/152 | 43.9 | 54.6 |
| B lact - | ≤0.25/4.75 | 0.5/9.5 | ≤0.25/4.75->8/152 | 94 | 6 |
| B lact + | 4/76 | >8/152 | ≤0.25/4.75->8/152 | 3 | 97 |
| Tetraciclina | | | | | |
| Total | 2 | 64 | ≤0.25-64 | 65.5 | 34.5 |
| B lact - | 0.5 | 2 | ≤0.25-64 | 98.6 | 1.4 |
| B lact + | 16 | 64 | ≤0.25-64 | 34.3 | 65.7 |
| Amoxicilina/Ac.clavulonico | | | | | |
| Total | 0.25 | 2 | ≤0.25-2 | 100 | 0 |
| B lact - | 0.25 | 0.5 | ≤0.25-2 | 100 | 0 |
| B lact + | 0.5 | 2 | ≤0.25-2 | 100 | 0 |
| Cefotaxima | | | | | |
| Total | ≤0.06 | ≤0.12 | ≤0.06-0.12 | 100 | 0 |
| B lact - | ≤0.06 | ≤0.12 | ≤0.06-0.12 | 100 | 0 |
| B lact + | ≤0.06 | ≤0.12 | ≤0.06-0.12 | 100 | 0 |
| Ceftriaxona | | | | | |
| Total | ≤0.06 | ≤0.12 | ≤0.06-0.12 | 100 | 0 |
| B lact - | ≤0.06 | ≤0.12 | ≤0.06-0.12 | 100 | 0 |
| B lact + | ≤0.06 | ≤0.12 | ≤0.06-0.12 | 100 | 0 |
| Rifampicina | | | | | |
| Total | 0.5 | 0.5 | ≤0.25-1 | 100 | 0 |
| B lact - | 0.5 | 0.5 | ≤0.25-1 | 100 | 0 |
| B lact + | 0.5 | 0.5 | ≤0.25-1 | 100 | 0 |

IV. Resultados y Discusión

IV.2.1 Actividad de las cefalosporinas y flouroquinolonas frente a las cepas estudiadas

La eficacia que muestran las cefalosporinas de segunda y tercera generación frente a las cepas invasivas de *H. influenzae* ha sido señalada por varios autores. Bell et al (2002), encontraron menos de un 2% de cepas resistentes a estos antimicrobianos en aislamientos pertenecientes a pacientes con neumonía; mientras que Kwak et al (2000), encontraron que el 100% de las cepas fueron sensibles a las diferentes cefalosporinas por ellos estudiadas. En nuestro trabajo no hubo cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación investigadas. Esto constituye un importante aporte al manejo terapéutico de las infecciones graves ocasionadas por *H. influenzae* b, por parte de los pediatras de nuestro país.

Las cefalosporinas de tercera generación son ampliamente utilizadas en Cuba, para el tratamiento de las enfermedades invasivas ocasionadas por *H. influenzae*, y los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren que pueden seguir siendo considerados los antimicrobianos de elección para el tratamiento de estos casos.

Las flouroquinolonas por su parte han sido objeto de un estudio constante entre las cepas de *H. influenzae*, 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 que los consumen frecuentemente, como es el caso de individuos con fibrosis quística (Barriere y Hindler, 1993; Davidson et al, 2002; Hoepelman, 2004).

Las poblaciones de *H. influenzae* son naturalmente muy sensibles a las quinolonas y en la mayoría de los estudios llevados a cabo, la resistencia encontrada es menor al 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).

Jones et al (2002), en un estudio multicéntrico realizado en Europa durante el período del 2000-2001, mostraron un 100% de sensibilidad a las quinolonas, cifras similares a las obtenidas en

IV. Resultados y Discusión

una investigación anteriormente realizada por el propio autor durante la etapa 1997-1998. Blosser-Middleton (2003), estudiaron 840 cepas en cuatro países europeos y demostraron que, aunque en los diferentes países se detectan variaciones en la producción de β -lactamasa, la sensibilidad a las quinolonas fue superior al 99%.

En las 107 cepas estudiadas por nosotros, que incluyeron aislamientos con diferentes patrones de susceptibilidad, no detectamos ninguna resistente o con susceptibilidad disminuida a ninguna de las flouroquinolonas investigadas, resultados a tener en cuenta en el manejo de pacientes donde se aíslan cepas multirresistentes y se justifique el empleo de las mismas.

Bastida et al (2003), en España, notificaron en un caso de neumonía adquirida en la comunidad causada por *H. influenzae*, el fallo al tratamiento oral por levofloxacina y el aislamiento de cepas resistentes a las flouroquinolonas. Además estos autores detectaron que el mecanismo de la resistencia de las cepas aisladas, estuvo determinado por mutaciones en los genes *gyrA*, *parC* y *parE*.

Otros investigadores han identificado mutaciones similares en cepas de *H. influenzae* con susceptibilidad disminuida o resistencia a la ciprofloxacina, garenoxacina, levofloxacina y moxifloxacina (Li et al, 2004; Pérez et al, 2004; Yoshizumi et al, 2004). Este hallazgo resulta de gran actualidad e importancia y representa una emergencia clínica y microbiológica en el manejo de la neumonía y otras infecciones, particularmente en aquellos pacientes que son tratados con estos antimicrobianos, donde pueden aparecer dichas mutaciones por el uso continuado de los mismos.

IV.3 Análisis de la multirresistencia

La multirresistencia (definida en *H. influenzae* como la resistencia a tres o más clases de antimicrobianos) (Campos et al, 1984; Jorgensen et al, 1998), se presentó en 445(40.6%) cepas investigadas (Tabla 5). El patrón de resistencia más frecuente fue: AMP-CL-TET-SXT (313 cepas, 27.24%), seguido por el patrón AMP-CL-SXT (127 cepas, 11.05%). Todos los aislamientos multirresistentes, excepto cuatro, fueron no sensibles al cloranfenicol, mientras que

IV. Resultados y Discusión

445 (98.23%) fueron resistentes a la ampicilina y cotrimoxazol. Todas las cepas no sensibles a la ampicilina, tuvieron 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).

Tabla 5. Patrones de resistencia encontrados en 1149 aislamientos clínicos de *H. influenzae* por el método de microdilución en caldo.

| Patrones Resistencia | 1989-1999 (n= 1097) | 2000-2003 (n=52) | Total (n=1149) |
|--------------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|
| AMP/SXT | 44 | 5 | 49 |
| SXT | 41 | 1 | 42 |
| CL/TET | 8 | 3 | 11 |
| TET/SXT | 3 | 0 | 3 |
| AMP/TET | 2 | 5 | 7 |
| | | | |
| CL /TET /SXT * | 3 | 1 | 4 |
| AMP/SXT/TET * | 4 | 1 | 5 |
| AMP/CL/TET * | 3 | 1 | 4 |
| AMP/SXT/CL * | 125 | 2 | 127 |
| AMP/CL/SXT/TET * | 310 | 3 | 313 |
| | | | |
| Total multirresistencia | 445(40.6%)** | 8 (15.3%)** | 453 (39.6%)** |

TET, Tetraciclina; SXT, Cotrimoxazol; AMP, Ampicilina; CL, Cloranfenicol

* Patrones de Multirresistencia

** Valor y porcentaje de cepas multirresistentes/total de cepas estudiadas.

En la etapa prevacunal, el aislamiento de cepas multirresistentes fue frecuente, 445(40.6%). En el período 2000-2003, sólo 8(15.3%) resultaron multirresistentes, lo cual evidentemente pudo estar influenciado, por la reducción en el número de cepas circulantes. En el año 2003, no se detectaron cepas con resistencia combinada a tres o más antimicrobianos, etapa en que toda la cohorte de niños menores de 4 años ya se encontraba protegida por la vacunación. Existen varios

IV. Resultados y Discusión

trabajos donde se señala el hallazgo de cepas multirresistentes (Campos et al, 1984; Levy et al, 1993; Hua et al, 2004), pero otros autores plantean que el aislamiento de los mismos resulta infrecuente (Amarnath et al, 1992; Bajaca-Lavado et al, 1996; Schito et al, 2000; Critchley et al, 2001; De Andrade et al, 2001).

De acuerdo al estudio realizado, comprobamos que los aislamientos estudiados con resistencia documentada a 3 o más antimicrobianos se mantienen con sensibilidad elevada a las quinolonas, a las cefalosporinas de tercera generación, así como a la combinación amoxicilina/ácido clavulánico.

Resultados similares han sido notificados por otros autores, Dabernat et al (2004), en un análisis de las cepas recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Francia, durante un año, encontraron que las cefalosporinas de segunda y tercera generación se mantenían como los antimicrobianos más efectivos frente a cepas con diferentes mecanismos de resistencia. 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.

En cepas de *H. influenzae* la resistencia combinada a la ampicilina y otros antimicrobianos como el cotrimoxazol, cloranfenicol y/o la tetraciclina, puede ser encontrada con relativa frecuencia. Este 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 trasfieren con facilidad de unas cepas a otras (Dagan et al, 2001; Li et al, 2004; Yoshizumi et al, 2004).

IV. Resultados y Discusión

El hecho de la drástica disminución de casos de MEB por *H. influenzae*, así como la reducción evidente en la resistencia encontrada en la etapa postvacunal, hace que podamos inferir que la estrategia de vacunación realizada en Cuba, no sólo contribuyó a la disminución significativa de la enfermedad por este agente, sino también, a la reducción de la circulación de cepas resistentes y multirresistentes en nuestro medio.

IV.4 Determinación de plásmidos conjugativos de resistencia

En un total de 81 cepas se detectaron las secuencias descritas por Leaves et al (2000), pertenecientes a plásmidos conjugativos de resistencia, este hallazgo sugiere la presencia de un plásmido responsable de los altos valores de resistencia en nuestras cepas, el cual puede estar integrado o no al cromosoma (Tabla 6). Se pudo observar que, en todos los aislamientos donde se detectó la presencia de plásmidos, se obtuvo amplificación con los cebadores F₂Y₁ lo cual evidenció la presencia de plásmidos no integrados al cromosoma (Figura 3). En el 16.4% de las cepas también se detectó amplificación con los cebadores correspondientes a los plásmidos integrados (Tabla 6).

Resultados similares a los nuestros fueron observados por Leaves et al (2000), quienes demostraron que la secuencia correspondiente a los plásmidos conjugativos de resistencia detectada, estaba relacionada con la resistencia a la ampicilina y tetraciclina de las cepas y viceversa. Campos et al (2004) en un estudio de cepas invasivas aisladas en España, detectan la presencia de plásmidos conjugativos en el 11.5 % de las mismas, la mayoría de las cuales fueron resistentes a la ampicilina, el cloranfenicol, la tetraciclina y el cotrimoxazol, y presentaron secuencias correspondientes a plásmidos no integrados al cromosoma. En un 7% de las cepas, también se demostró la presencia de plásmidos integrados al cromosoma.

IV. Resultados y Discusión

Tabla 6: Detección de plásmidos en relación al patrón de susceptibilidad de 112 cepas de *H. influenzae* b.

| Patrón de Susceptibilidad | Número de cepas | Detección de plásmidos. |
|----------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Sensibles | 21 | 1 |
| SXT | 3 | 0 |
| CL/TET | 1 | 1 |
| SXT/TET | 1 | 1 |
| AMP/CL/TET | 2 | 2 |
| AMP/SXT/CL | 13 | 10 |
| AMP/SXT/CL/TET | 71 | 66 |
| Total | 112 | 81(72.3%) |

TET, tetraciclina; SXT, cotrimoxazol; AMP, ampicilina; CL, cloranfenicol.

El mecanismo de la multirresistencia en *H. influenzae* puede ser explicado por la presencia de plásmidos conjugativos que codifican para la resistencia a la ampicilina, el cloranfenicol y la tetraciclina, mientras que la del trimetoprim es cromosomal y no ligada necesariamente a otros determinantes de resistencia antimicrobiana (Stuy, 1980; Campos et al, 1984; Levy, 1992). La ocurrencia y frecuencia de plásmidos conjugativos que codifican para la resistencia a los antimicrobianos, así como el uso excesivo de los antimicrobianos en hospitales y la comunidad pudiera influir en la prevalencia local de la resistencia a ciertos antimicrobianos (Machka et al, 1988) y puede ser la explicación para muchas de las diferencias observadas por nosotros en relación a otros estudios.

IV. Resultados y Discusión



Figura 3: Producto de PCR amplificado en gel de agarosa al 1% para la detección de plásmidos integrados y no integrados al cromosoma. Las líneas 3, 9,13 y 15 reflejan la presencia de plásmidos integrados, 4, 10,14 y 16 los no integrados al cromosoma. Las líneas 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11,12, son cepas que no presentaron plásmidos. Las líneas 17 y 18 control negativo con agua destilada estéril. Línea 19 patrón de Peso Molecular.

IV.5 Electroforesis en gel de campo pulsado

En las 112 cepas estudiadas se obtuvieron de 10 a 12 fragmentos de macrorrestricción mediante el empleo de la enzima SmaI. Tales fragmentos fueron resueltos en 19 diferentes tipos de patrones de restricción SmaI. El 75% de las cepas estuvieron agrupadas en 11 principales pulsotipos (A-K) (Figuras 4, 5 y 6).

IV. Resultados y Discusión

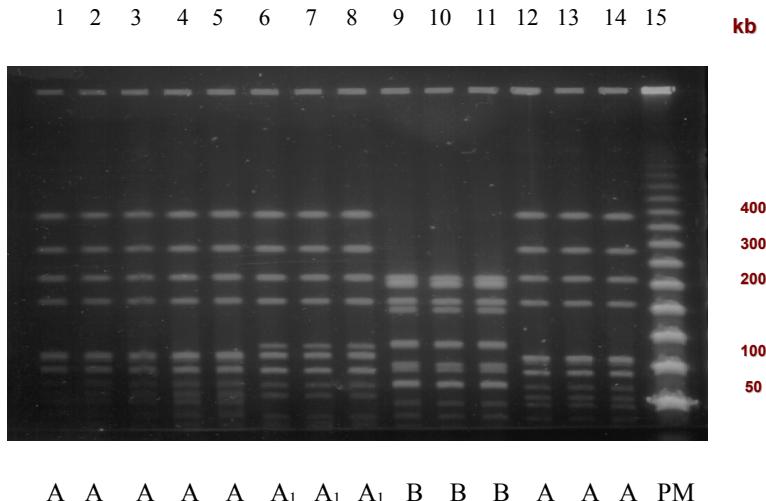


Figura 4: Patrones de electroforesis en gel de agarosa mediante ECP. Líneas 1-5,12-14 Patrón A, líneas 6-8 Patrón A₁. Líneas 9-11 Patrón B. Línea 15 Patrón de Peso Molecular.

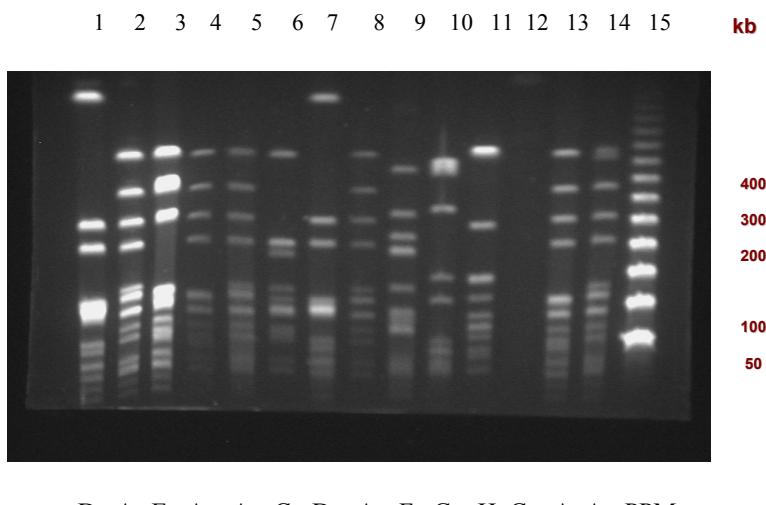


Figura 5: Patrones de electroforesis en gel de agarosa mediante ECP. Líneas 1 y 7 Patrón D, línea 3 Patrón E, línea 6 Patrón C₁, línea 9,10 y 11 Patrones F, G y H respectivamente. Línea 12 Control con agua destilada estéril. Línea 15 Patrón de Peso Molecular.

IV. Resultados y Discusión

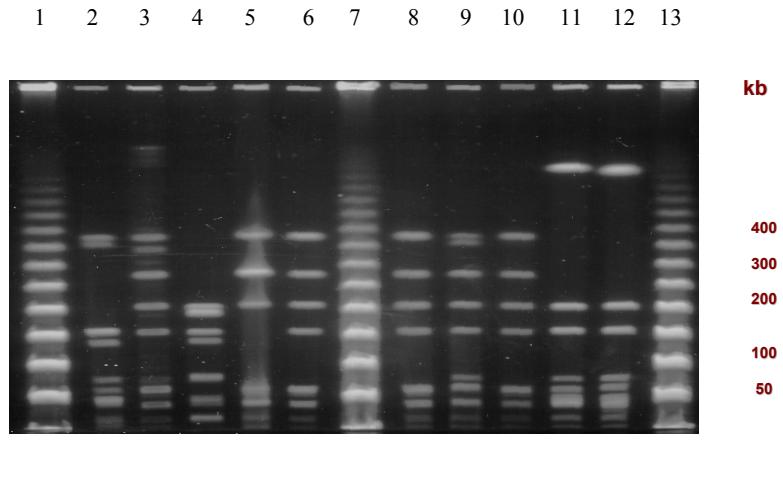


Figura 6: Patrones de electroforesis en gel de agarosa mediante ECP. Líneas 1 Patrón I, línea 5 Patrón J. Línea 1, 7 y 13 Patrón de Peso Molecular.

Numerosos estudios han demostrado que la ECP es la técnica más acertada para el tipaje y diferenciación de cepas de *H. influenzae* relacionadas o no epidemiológicamente (Peerbooms et al, 2002; Bruun et al, 2004; Farjo et al, 2004; Hotomi et al, 2004; Roman et al, 2004), y se recomienda para estudios de endemidad y de fallos vacunales (Mitsuda y col, 1999; Pettigrew et al, 2002).

Aparicio et al (1996), en un análisis de cepas provenientes de aislamientos clínicos de diversas fuentes, demostraron que la ECP fue la técnica que les permitió diferenciar mejor las cepas de *H. influenzae* b con patrones de PME, ribotipo y tipo electroforético idénticos. Ellos obtuvieron 4 patrones claramente relacionados entre sí en el caso de las cepas de *H. influenzae* b, mientras que los perfiles encontrados en las NT, presentaron una gran diversidad. Resultados similares fueron obtenidos por Cerquetti et al (2000), quienes al estudiar cepas capsuladas encontraron una clara relación clonal en comparación con una alta heterogeneidad genética en las no capsuladas.

IV. Resultados y Discusión

Otros trabajos como los realizados por Saito et al, (1999), utilizaron la técnica de ECP para el estudio de 200 cepas de *H. influenzae* aisladas de diferentes muestras en varios hospitales de Japón. Estos autores detectaron una gran diversidad de patrones genéticos en los aislamientos no capsulados, mientras que, en las cepas pertenecientes al serotipo b aisladas de LCR, sangre y exudado nasofaringeo de pacientes con MEB se consideraron genéticamente relacionadas, y de acuerdo a los patrones de ECP encontrados, sugirieron que las cepas detectadas en el LCR fueron diseminadas desde la nasofaringe. Mitsuda et al (1999) en un análisis de 30 aislamientos de niños con meningitis, pudieron establecer una relación clonal de acuerdo a la región geográfica de procedencia, contribuyendo al conocimiento de la transmisión de la enfermedad en una comunidad de Japón.

La relación genética entre los diferentes patrones de ECP obtenidos mediante la utilización de la enzima SmaI, fue fácilmente diferenciada y registrada en el dendograma representado en la Figura 7.

A pesar de que, en las cepas estudiadas en el presente trabajo, no se demostró una relación epidemiológica, se evidenció que el número de fragmentos de restricción diferentes entre la mayoría de los aislamientos fue de 3 a 5. Ello sugirió que las mismas se encontraban genéticamente relacionadas y su estructura clonal pudo ser demostrada mediante la ECP.

Se identificaron 3 “clusters” principales y se observó una elevada homología entre las cepas estudiadas, lo cual se demuestra al encontrar que la mayoría de las mismas tuvieron una distancia genética menor o igual a 20%. El cluster III agrupó el 52.6% del total de cepas estudiadas. Un resultado similar lo obtuvieron Lucher et al (2002), quienes en un estudio realizado en Australia, encontraron que el 47% del total de cepas de *H. influenzae* b aisladas de procesos invasivos durante un período de 6 años, se agrupaban en un solo “cluster”.

IV. Resultados y Discusión

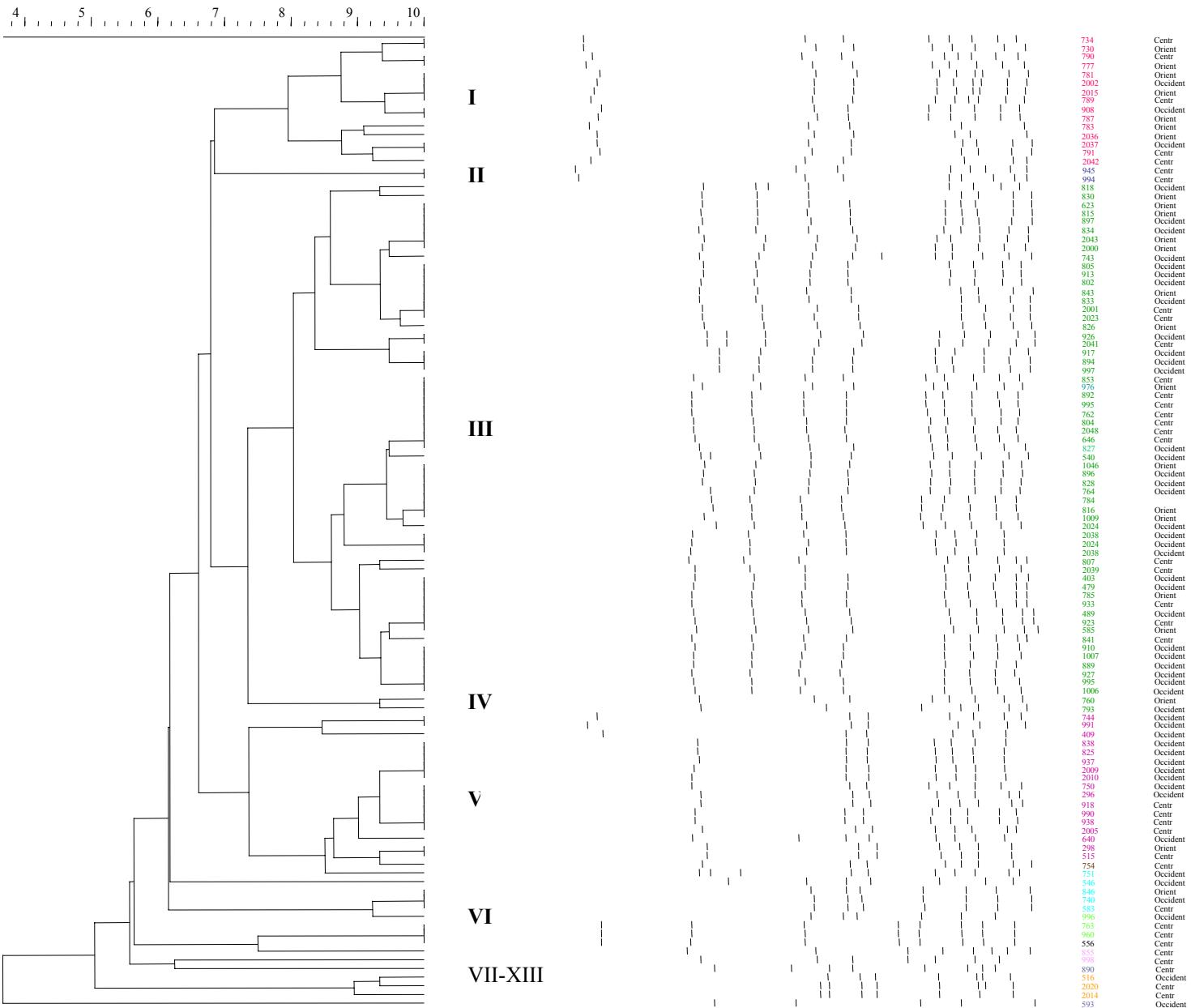


Figura 7: Relación clonal de 112 cepas de *H. influenzae* b analizadas por el software MVSP Shareware. El dendograma ilustra el agrupamiento de los patrones en XIII “clusters”, definidos por coeficientes de similaridad $\geq 80\%$.

IV. Resultados y Discusión

La clonalidad de las cepas de *H. influenzae* serotipo b ha sido documentada en la literatura (Musser et al, 1990; Mitsuda et al, 1999; Saito et al, 1999, 2000). Ezequiel et al (1999), señalaron que entre 187 cepas australianas de *H. influenzae* b, estas se encontraban agrupadas en 7 “clusters” con una distancia genética menor o igual al 20%. Campos et al (2004), plantearon una relación genética menor o igual al 18 % en cepas del serotipo b aisladas de procesos invasivos en la Comunidad de Madrid en la etapa postvacunal, así como una diversidad menor de clones a la detectada en el presente trabajo. Una explicación a ello pudiera ser que el período transcurrido desde el comienzo de la vacunación en España, hasta el análisis realizado por los autores fue mayor al de nuestro país. Ello unido al hecho de que nosotros estudiamos cepas de la etapa prevacunal, hace que se pueda sustentar la hipótesis que después de la vacunación la relación clonal, escasa de por sí entre las cepas de *H. influenzae* b, tienda a disminuir con el tiempo

La relación entre los biotipos, patrones de ECP, y patrones de susceptibilidad, así como la región geográfica correspondiente a las 91 con diferentes patrones de resistencia y las 21 sensibles a todos los antimicrobianos estudiados, se observa en la Tabla 7.

Tabla No. 7: Relación clonal de las cepas, biotipos, patrones de susceptibilidad y la región geográfica de 112 cepas de *H. influenzae* b. Octubre1997- Octubre 1999.

| | Cluster | No.Cepa | Biotipo | Patrón de Susceptibilidad | Región geográfica |
|-----|---------|---------|---------|---------------------------|-------------------|
| 1. | I | 734 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 2. | I | 2015 | I | Sensible | Oriente |
| 3. | I | 790 | II | AMP/SXT/CL | Centro |
| 4. | I | 2037 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 5. | I | 2002 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 6. | I | 2036 | II | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 7. | I | 730 | II | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 8. | I | 789 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 9. | I | 908 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 10. | I | 787 | II | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 11. | I | 783 | IV | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 12. | I | 2042 | I | AMP/SXT/CL | Oriente |

IV. Resultados y Discusión

| | | | | | |
|-----|-----|------|----|----------------|-----------|
| 13. | I | 777 | V | SXT | Occidente |
| 14. | I | 791 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 15. | I | 781 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 16. | II | 945 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 17. | II | 994 | V | AMP/SXT/CL | Centro |
| 18. | III | 818 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 19. | III | 830 | IV | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 20. | III | 623 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 21. | III | 815 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 22. | III | 897 | I | AMP/SXT/CL | Occidente |
| 23. | III | 834 | I | AMP/SXT/CL | Occidente |
| 24. | III | 2043 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 25. | III | 2000 | II | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 26. | III | 743 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 27. | III | 805 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 28. | III | 913 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 29. | III | 802 | II | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 30. | III | 843 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 31. | III | 833 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 32. | III | 2001 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 33. | III | 2023 | V | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 34. | III | 826 | I | SXT | Oriente |
| 35. | III | 926 | I | AMP/SXT/CL | Occidente |
| 36. | III | 2041 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 37. | III | 917 | IV | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 38. | III | 894 | I | AMP/SXT/CL | Occidente |
| 39. | III | 997 | I | Sensible | Occidente |
| 40. | III | 850 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 41. | III | 800 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 42. | III | 853 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 43. | III | 976 | II | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 44. | III | 892 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 45. | III | 895 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 46. | III | 762 | I | Sensible | Centro |
| 47. | III | 804 | I | Sensible | Centro |
| 48. | III | 2048 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 49. | III | 646 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 50. | III | 827 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 51. | III | 590 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 52. | III | 1046 | II | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |

IV. Resultados y Discusión

| | | | | | |
|-----|-----|------|----|----------------|-----------|
| 53. | III | 896 | I | AMP/SXT/CL | Occidente |
| 54. | III | 828 | II | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 55. | III | 764 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 56. | III | 784 | IV | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 57. | III | 816 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 58. | III | 1009 | I | Sensible | Occidente |
| 59. | III | 2024 | II | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 60. | III | 2038 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 61. | III | 807 | I | Sensible | Centro |
| 62. | III | 2039 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 63. | III | 403 | II | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 64. | III | 479 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 65. | III | 785 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 66. | III | 933 | II | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 67. | III | 489 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 68. | III | 923 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 69. | III | 585 | II | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 70. | III | 841 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 71. | III | 910 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 72. | III | 1007 | I | AMP/SXT/CL | Occidente |
| 73. | III | 889 | V | AMP/CL/TET | Occidente |
| 74. | III | 927 | I | AMP/SXT/CL | Occidente |
| 75. | III | 995 | I | SXT | Occidente |
| 76. | III | 1006 | I | SXT/TET | Occidente |
| 77. | IV | 760 | I | AMP/SXT/CL/TET | Oriente |
| 78. | IV | 793 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 79. | V | 744 | II | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 80. | V | 991 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 81. | V | 409 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 82. | V | 838 | II | Sensible | Occidente |
| 83. | V | 825 | I | Sensible | Occidente |
| 84. | V | 937 | I | Sensible | Occidente |
| 85. | V | 2009 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 86. | V | 2010 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 87. | V | 750 | II | CL/TET | Occidente |
| 88. | V | 296 | II | Sensible | Occidente |
| 89. | V | 918 | I | Sensible | Centro |
| 90. | V | 990 | I | Sensible | Centro |
| 91. | V | 938 | I | Sensible | Centro |
| 92. | V | 640 | II | AMP/SXT/CL/TET | Centro |

IV. Resultados y Discusión

| | | | | | |
|------|------|------|----|----------------|-----------|
| 93. | V | 298 | I | Sensible | Occidente |
| 94. | V | 515 | II | Sensible | Oriente |
| 95. | V | 2012 | I | Sensible | Centro |
| 96. | VI | 754 | II | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 97. | VII | 751 | II | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 98. | VII | 546 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 99. | VII | 846 | I | AMP/SXT/CL | Oriente |
| 100. | VII | 740 | V | AMP/CL/TET | Occidente |
| 101. | VIII | 583 | I | Sensible | Centro |
| 102. | VIII | 996 | II | Sensible | Occidente |
| 103. | VIII | 762 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 104. | IX | 960 | I | Sensible | Centro |
| 105. | X | 556 | I | AMP/SXT/CL | Centro |
| 106. | X | 855 | II | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 107. | XI | 994 | I | AMP/SXT/CL | Centro |
| 108. | XII | 890 | I | AMP/SXT/CL/TET | Centro |
| 109. | XII | 516 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |
| 110. | XII | 2020 | II | Sensible | Centro |
| 111. | XIII | 2014 | IV | Sensible | Centro |
| 112. | XIII | 593 | I | AMP/SXT/CL/TET | Occidente |

TET, Tetraciclina; SXT, Cotrimoxazol; AMP, Ampicilina; CL, Cloranfenicol

De acuerdo a los resultados obtenidos por nosotros no se observó relación entre los biotipos o la región geográfica, y los “clusters” detectados. Resultados similares obtuvieron Lucher et al (2002), al describir que el 95% de las cepas de *H. influenzae* b estudiadas por ECP fueron del biotipo I ó IV independientemente del “cluster” al cual pertenecieron. Otros autores han señalado resultados diferentes a los nuestros, Mitsuda et al (1999) notificaron que en 30 cepas de *H. influenzae* b aisladas en Japón, todas del biotipo II se agruparon en un “cluster”, mientras que las correspondientes al biotipo I y aisladas de una región determinada, formaron parte de otro gran “cluster”, donde además se agruparon cepas de otras regiones, aunque el 74% de las mismas tuvo una distancia genética menor o igual del 20%.

Las cepas multirresistentes se encontraron mayoritariamente (78.7%) en los clusters I y III, independientemente de la región geográfica a la cual pertenecieron o al biotipo detectado (Tabla 8), y las mismas representaron el 75% del total de cepas estudiadas por ECP.

IV. Resultados y Discusión

El presente trabajo permitió demostrar que, mediante la utilización de la ECP, se pudo conocer la relación clonal de las cepas en la etapa prevacunal. Estudios futuros podrán definir si la circulación de los clones en Cuba, disminuye después de varios años de introducida la vacunación, así como si estos clones se encuentran o no relacionados con la multirresistencia, tal como lo reflejan nuestros resultados.

V. Conclusiones

V. CONCLUSIONES

1. Las cepas correspondientes a la etapa postvacunal mostraron características similares a las aisladas en Cuba antes del comienzo de la inmunización generalizada contra *H.influenzae* b. El serotipo b fue el más frecuente en todo el período estudiado, y los biotipos con mayores porcentajes, fueron el I y el II.
2. Se sugiere que el alto valor de la multirresistencia observado en las cepas de la etapa prevacunal, estuvo vinculada con el hallazgo de plásmidos conjugativos de resistencia.
3. A pesar de la elevada multirresistencia encontrada, no se detectaron mecanismos de resistencia emergentes.
4. La vacunación llevada a cabo en Cuba contribuyó a disminuir la circulación de cepas de *H.influenzae* b. La multirresistencia en la etapa post-vacunal fue infrecuente.
5. Se evidenció la clonalidad de las cepas pertenecientes al serotipo b, aisladas en la etapa prevacunal.
6. La circulación de los “clusters” I y III, se asoció con el alto número de cepas multirresistentes.

VI. Recomendaciones

VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar la vigilancia de las cepas de *H. influenzae* aisladas de procesos invasivos en Cuba.
2. Monitorear la posible variación de la distribución clonal de las cepas de *H. influenzae* y de la susceptibilidad antimicrobiana.
3. Estudiar los genes de resistencia a la ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y al cotrimoxazol en las cepas multirresistentes de *H. influenzae* y posibles mutaciones genéticas.

VII.1 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiyeh 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; 177:1758-1761.
- 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; 95:187-189.
- 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; 156: 57-62.
- Anon JB, Jacobs MR, Poole MD, Ambrose PG, Benninger MS. Sinus and Allergy Health Partnership. J Antimicrob Chemother. 2004; 53(2):399-402.
- Aparicio P, Román F, Campos J. Caracterización epidemiológica de *Haemophilus influenzae* mediante marcadores moleculares. Enferm Infect Microbiol Clin 1996;14:227-232
- Aracil B, Campos J. Reciente incremento de los fallos vacunales por *Haemophilus influenzae* serotipo b. Enferm Infect 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):266-27.
- 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; 38:615-625.
- 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.

VII. Referencias Bibliográfica

- Barenkamp SJ, Munson RS, Granoff DM. Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer-membrane protein profiles. J Infect Dis 1981; 143(5):668-676.
- Barriere SL, Hindler J. Ciprofloxacin resistant *Haemophilus influenzae* in a patient with chronic lung disease. Ann Pharmacother 1993; 27:309-310
- Bastida T, Pérez VM, Campos J, Cortés LM, Román F, Tubau F, et al. Levofloxacin treatment failure in *Haemophilus influenzae* pneumonia. Emerg Infect Dis 2003; 9(11):749-753.
- 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):1308-1312.
- 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 o BMS284756. Int J Antimicrob Agents 2002; 19(2):125-132.
- 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; 52:427-433.
- Biedenbach, D, Jones RN. Fluorquinolona-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): 5546-5550.
- Bones EGE, Granoff DM, Squires JE, Barenkamp SJ. Development of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in a household contact treated with rifampin. Pediatrics 1982; 70:141-2.
- 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.

VII. Referencias Bibliográfica

- Brook I, Gober AE. Antimicrobial resistance in the nasopharyngeal flora of children with acute maxillary sinusitis and maxillary sinusitis recurring after amoxicillin therapy. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(2):399-402.
- 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):131-134.
- Bruun B, Gahrn-Hansen B, Westh H, Kilian M. Clonal relationship of recent invasive *Haemophilus influenzae* serotype f isolates from Denmark and the United States. *J Med Microbiol* 2004; 53(11):1161-5.
- 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 and 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.
- Chi DH, Hendley JO, French P, Arango P, Hayden FG, Winther B. Nasopharyngeal reservoir of bacterial otitis media and sinusitis pathogens in adults during wellness and viral respiratory illness. *Am J Rhinol*. 2003; 17(4):209-14.

VII. Referencias Bibliográfica

- 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 genes from *Haemophilus influenzae* biotype IV strains. *Infect Immun* 2001; 69(11):7010-19.
- Cochi SL, Ward JL. *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, Kaczmarski 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, Karowsky JA, Yamakita J, Barth Al. 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-lactam antibiotics. *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, Leberman A, Porat N. Antibiotic treatment in acute otitis media promotes superinfection with resistant

VII. Referencias Bibliográfica

- 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): 816-822.
 - 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):403-411.
 - 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-Garabajosa 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. eMedicine J 2001; 2(8)1-23
 - Dickinson FO, Perez 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.
 - 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. Cuba
 - Dominguez A, Bou R, Sachez 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
 - Dunais B, Pradier C, Carsenti H, Sabah M, Mancini G, Fontas E. Influence of child care on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Pediatr Infect Dis J 2003 Jul; 22(7):589-92.
 - 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.
 - Ezekiel MP, Collignon PC, Gilbert GL. Pulsed-field gel electrophoresis used to investigate genetic diversity of *Haemophilus influenzae* type b isolates in Australia

VII. Referencias Bibliográfica

- shows differences between aboriginal and non-aboriginal isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 1524-31.
- 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.
 - Finn A. Bacterial polysaccharide-protein conjugates vaccines. *Br Med Bull* 2004; 70:1-14.
 - Flesher AR, Insel RA. Characterization of lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1978; 138:719-730.
 - 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 buccal cells. *J Infect Dis* 1992; 165:464-70.
 - Fothergill LD, Wright J. Influenza meningitis. The relation of age incidence to the bacterial power of blood against causal organism. *J Immunol* 1933; 24:273-84.
 - Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to cefditoren, and provisional interpretative criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 37(4):265-69.
 - 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.
 - 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, 2nd edition, 2004.

VII. Referencias Bibliográfica

- Gazi H, Kurutepe S, Surucuoglu S, Teker A, Ozbakloglu B. Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens in the oropharynx of healthy school children in Turkey. Indian J Med Res 2004; 120(5):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.
- Gessner BD, Sutanto A, Linehan M, Djelantik IG, Fletches T. Incidences of vaccine preventable *Haemophilus influenzae* type b pneumonia and meningitis in Indonesian children: hamlet-randomised vaccine-probe trial. Lancet 2005; 365:43-52.
- 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, Wrigth 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, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Magai K, Jacobs MR. Diversity of ampicillin resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microb Drug Resist 2003; 9(1):39-46.
- Heath PT, Booy R, Azzopardi H, Slack MP, Bowen-Morris J, Griffiths H et al. Antibody concentration and clinical protection after Hib conjugation 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.

VII. Referencias Bibliográfica

- 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.
- Hjaltested 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
- Hotomi M, Yamanaka N, Billal DS, Sakai A, Yamauchi K, Suzumoto M, et al. Genotyping of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolated from paired middle ear fluid and nasopharyng by pulsed-field gel electrophoresis. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 2004; 66(5):223-40.
- 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 multicentre 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.
- Ito M, Furukawa M. High-dose cefditren therapy for children with acute otitis media that had *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx. Jpn J Antibiot 2001; 54(Suppl B):37-8.
- Jones ME, Karowsky JA, Blosser-Middleton R, Critchley IA, Thornsberry C, Sahm 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, Karowsky JA, Thomsberry C, Sahm 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.

VII. Referencias Bibliográfica

- 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 HJ, Doern GV, Thornsberry C, Preston DA, Redding SJ. Susceptibility of multiply resistant *Haemophilus influenzae* to newer antimicrobial agents. Diagn Microbiol Infect Dis 1988; 9:27-32
- 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 β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34(7):1354-9.
- Kalies H, Verstraeten T, Grote V, Meyer N, Siedler A. Four and one half year follow up of the effectiveness of diphtheria tetanus toxoids acellular pertussis/*Haemophilus influenzae* type b and diphtheria tetanus toxoids acellular pertussis inactivated poliovirus/*Haemophilus influenzae* type b combination vaccines in Germany. Pediatr Infect Dis J 2004; 23(10):944-50.
- Karlowsky 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.
- Khan W, Ross S, Rodriguez W, Contrioli G and Saz A R. *Haemophilus influenzae* type b resistant to ampicillin. JAMA 1974; 229:98.
- 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, Sorense J, Frederiksen W. Biochemical characteristics of 130 recent isolates from *Haemophilus influenzae* meningitis. J. Clin. Microbiol. 1979^a; 9:409-12.
- Kilian M, Mestercky J, Shrohenloher RE. Pathogenic species of the genus *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A protease. Infect Immun 1979^b; 26:143-49.
- Kilian M. *Haemophilus*. In: Braude Al (Ed). Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2nd ed, pp 328-333. Philadelphia, WB Saunders, 1986.
- 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.

VII. Referencias Bibliográfica

- 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 fimbrial-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.
- Lagerstrom F, Bader M, Foldevi M, Fredlund H, Nordin-Olsson I, Holmberg H. Microbiological etiology in clinically diagnosed community-acquired pneumonia in primary care in Orebro, Sweden. Clin Microbiol Infect. 2003; 9(7):645-52.
- Leaves N and Jordens J. Analysis of the prevaccine population of noncapsulate *Haemophilus influenzae* and identification of a putative epidemic clone. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:410-14
- 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.
- Leino T, Auranen K, Makela PH, Kayhty H, Ramsay M, Slack M, et al. *Haemophilus influenzae* type b and cross-reactive antigens in natural Hib infection dynamics; modeling in two populations. Epidemiol Infect 2002; 129(1):73-83
- Levy SB. Active efflux mechanism for antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:695-703.
- Levy, J., Verhaegen, G., De Mol, P., Couturier, M., Dekegel, D., Butzler, J.P. Molecular characterization of resistance plasmids in epidemiologically unrelated

VII. Referencias Bibliográfica

- 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):4460-4462.
 - 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):650-657.
 - Lucher LA, Reeves M, Hennessy T, Levine OS, Popovic T, Rosentein N. Reemergence in southwestern Alaska, of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease due to strains indistinguishable from those isolated from vaccinated children. J Infect Dis 2002; 186:958-65.
 - Luong DC, Ishiwada N, Takeda N, Kohno Y. Serotypes of *Haemophilus influenzae* strains isolated from pediatric patients with respiratory tract infections. Tohoku J Exp Med 2004; 204(4):245-54.
 - Machka K, Bravny I, Dabernat H, Dorrnbusch 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.
 - Marco F, Garcia 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.
 - Marty A, Greiner O, Day PJ, Gunziger S, Muhlemann K, Nadal D. Detection of *Haemophilus influenzae* type b by real time PCR. J Clin Microbiol 2004; 42(8):3813-15.
 - Mathies AW. Penicillin's in the treatment of bacterial meningitis. Journal of the Royal College of Physicians of London 1972; 6:139-46.
 - Matsumoto A, Hosoya M, Katayose M, Murai H, Kawasaki Y, Sato K, et al. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *H.influenzae* isolated from nasopharynx in children. Kansenshogaku Zasshi. 2004; 78(6):482-9.
 - 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

VII. Referencias Bibliográfica

- 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-inforcement 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.
- Mendelman PM, Smith AL. *Haemophilus influenzae*. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Texbook 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, Santosh M. Toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b carriage and disease among high-risk American Indian children. Am Public Health 2000; 90:1550-4.
- Mitsuda T, Kuroki H, Ishikawa N, Imagawa T, Ito S, Miyamae T, et al. Molecular epidemiological study of *Haemophilus influenzae* serotype b strains obtained from children with meningitis in Japan. J Clin Microbiol 1999; 37(8):2548-52.
- Miyazaki S, Fujikawa T, Matsumoto T, Tateda K, Yamaguchi K. Efficacy of azithromycin, clarithromycin and β-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, Wilson R. The role of *Haemophilus influenzae* in the pathogenesis of pneumonia. Rev Infect Dis 1991; 13(Suppl 6):518-27.
- 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 RS, Grass S. Purification, cloning and sequence of outer membrane protein P1 of *Haemophilus influenzae* type b. Infect Immun 1988; 56: 2235-42.
- Munson R. *Haemophilus influenzae*: Surface antigens and aspects of virulence. Can J Vet Res 1990; 54(Suppl):563-7.

VII. Referencias Bibliográfica

- 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.
- Murphy TF. Respiratory infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. Curr Opin Infect Dis. 2003; 16(2):129-34.
- Musser JM, Kroll S, Granoff DM. Global genetic structure and molecular epidemiology of *H. influenzae*. Rev Infect Dis 1990; 12:75-111.
- 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. 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.
- Nielsen HU, Konradsen HB, Lous J, Frimodt-Moller N. Nasopharyngeal pathogens in children with acute otitis media in a low-antibiotic use country. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2004; 68(9):1149-55.
- 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.
- 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 after introduction of conjugate vaccine: comparison of routine reporting with active surveillance system. BMJ 2000; 321:731-3.
- Omikunle A, Takahashi S, Ogilvie CL, Wang Y, Rodriguez CA, St Geme III JW, Adderson EE. J Clin Microbiol 2002; 40(4):1264-70.
- 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.

VII. Referencias Bibliográfica

- 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.
- Parent du Chatelet I, Traore Y, Gessner BD, Antignac A, Nacco NJ. Bacterial meningitis in Burkina Faso: surveillance using field polymerase chain reaction testing. Clin Infect Dis 2005; 40(1):17-25.
- Peerbooms PG, Engelen MN, Stokman DA, Van Benthem BH, Van Weert MC. Nasopharyngeal carriage of potential bacterial pathogens related to day care attendance, with special reference to the molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 2002; 40(8):2832-6.
- Peltola H, Kayhty H, Virtanen M, Makela PH. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic 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 vaccinations strategies in Scandinavia. J Infect Dis 1999; 179:223-9.
- Peltola H. Burden of meningitis and other severe bacterial infections of children in Africa: Implications for prevention. Clin Infect Dis 2000^a; 11(32):12-16.
- Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st Century: Global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev 2000^b; 13(2):302-17
- 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, AR. Comunicación personal. 2003
- 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.
- Perez VM, Román F, Aracil B, Cantón R, Campos J. Laboratory detection of *Haemophilus influenzae* with decreased susceptibility to nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin due to *gyrA* and *parC* mutations. J Clin Microbiol 2004; 42(3):1185-91.
- 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

VII. Referencias Bibliográfica

- 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; 13:357-386.
 - 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 Inmunol 1983; 72:481-6.
 - Pittman M. Variation and type specify 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.
 - Prats G, Dominguez A, Salleras L. *Haemophilus influenzae*. Epidemiología de la enfermedad invasiva. Med Clin (Barc) 1996; 107:422-8.
 - Preston NW. Why the rise in *Haemophilus influenzae* type b infections? Lancet 2003; 26(362):330-1.
 - 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.
 - 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, cefotaxime, cloranfenicol e cotrimoxazol isolados de laboratorios na cidade de São 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. Tetacycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution. FEMS Microbiol Rev 1996(19):1-24.
 - Roberts MC. Mechanism of antibiotic resistance in oral bacteria. APUA Newsletter 1997;15(2):1-6

VII. Referencias Bibliográfica

- 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. *Haemophilus 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.
- Roman F, Canton R, Peréz VM, Baquero F, Campos J. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. J Clin Microbiol 2004; 42(4):1450-9.
- Russell FM, Carapetis JR, Mansoor O, Darcy A, Fakakovi T, Metal A, et al. High incidence of *Haemophilus influenzae* type b infection in children in Pacific Island countries. Clin Infect Dis 2003; 37(12):1593-9.
- Saito M, Umeda A and Yoshida S. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by Pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microb 1999(37):2142-7.
- Saito M, Okada K, Takemori K, Yoshida SI. Clonal spread o fan invasive strains of *Haemophilus influenzae* type b among nursery contacts accompanied by a high carriage rate of non-disease-associated strains. J Med Microbiol 2000; 49(9):845-7.
- 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 vaccinees unvaccinated children in Canada, 2001-2003. CMAJ 2005; 172(1):53-6.
- Schito GC, Debbia A, Marchese. The envolving threat of antibiotic resistance in Europe: new data from the Alexander Project. J Antimicrob Chemother 2000(46):3-9.
- Seaton RA, Steinke DT, Phyllis 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.
- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN and Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics as systematic. Appl Environ Microbiol 1986; 51:873-84.

VII. Referencias Bibliográfica

- 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, Gomez 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 Infect 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.
- Skoczynska A, Kriz P, Konradsen HB, Hryniwicz 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, Stetsiuk OU, Kandalov MM, Egorova OA, et al. Antimicrobial susceptibility of nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae* from healthy children in day-care centers: results of multicentre study in Russia. Int J Antimicrob Agents 2001; 18(4):327-51.
- Stuy, JH. Chromosomally integrated conjugative plasmids are common in antibiotic-resistant *Haemophilus influenzae* J Bacteriol 1980; 142:925-30.
- Sulikowska A, Grzesiowski P, Sadowy E, Fiett J, Hryniwicz W. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from the nasopharyngeal of asymptomatic children and molecular analysis of

VII. Referencias Bibliográfica

- S. pneumoniae* and *H. influenzae* strain replacement in the nasopharyng. J Clin Microbiol. 2004; 42(9):3942-9.
- 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.
 - 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 Pediatric 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.
 - Thomas WJ, Mc Reynolds JW, Mock CR, Bailey DW. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* meningitis. Lancet 1974, i: 313-5.
 - 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.
 - Tomeh M, Starr SE, McGowan JE, Terry PM, Nahmias AJ. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b infection. J Am Med Association 1974; 22:295-7.
 - 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.
 - Tsien 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 typhi* 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.

VII. Referencias Bibliográfica

- 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.
- Van Alphen I, Riemens T, Poolman J, Zanen HC. Characteristics of major membrane proteins of *Haemophilus influenzae*: pathogenic and epidemiological implications. J Bacteriol 1983^a; 155:878-85.
- Van Alphen L, Riemens T, Zanen HC. Antibody response against outer membrane components of *Haemophilus influenzae* type b strains in patients with meningitis. FEMS Microbiology letters 1983^b; 18:189-95.
- 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.
- 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 Pediatric 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.
- Wandi F, Kiagi G, Duke T. Long term outcome for children with bacterial meningitis in Papua New Guinea. J Trop Pediatric 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
- Wilfred CM. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b infections. Pediatrics 1990; 8S: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.

VII. Referencias Bibliográfica

- 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*. *Cancer 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.
- Zhanell 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.

VII.2 Bibliografía del autor relacionada con la tesis

- Tamargo I, Valdivia A, Pérez M. Diagnóstico rápido de *Haemophilus influenzae* tipo b y *Streptococcus pneumoniae* en Infecciones del Tracto Respiratorio Bajo. A Soc Venez Bioanal Esp 1994; 3(3):65-9.
- Tamargo I, Valdivia J, Toraño G, Pérez M, Rodríguez O. Caracterización de cepas de *Haemophilus influenzae* circulantes en Cuba. A Soc Venez Bioanal Esp 1994; 3(3):52-6.

VII. Referencias Bibliográfica

- Tamargo I, Valdivia J, Pérez M, Rodríguez O. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Haemophilus influenzae* circulantes en Cuba. A Soc Venez Bioanal Esp 1994; 3(3): 58-64.
- Tamargo I, Toraño G, Pérez M, Valdivia J. Diagnóstico rápido de *Haemophilus influenzae* tipo b y *Streptococcus pneumoniae* en Infecciones del Tracto Respiratorio Bajo. A Soc Venez Bioanal Esp 1994; 3(3):23-9.
- Tamargo I, Valdivia J, Pérez M, Toraño G. Rodriguez O. Biotipos y serotipos de *Haemophilus influenzae*. A Soc Venez Bioanal Esp 1994;3(3):32-5.
- Tamargo I, Pérez M, Valdivia J, Toraño G. Suplemento de crecimiento para “gérmenes fastidiosos”. Rev Cub Med Trop 1995; 47(3):189-94.
- Tamargo I, Pérez, Toraño G. Biotipos, serotipos mas frecuentes de *Haemophilus influenzae* en Cuba. Rev Latinoam Microb 1999; 34:65-69.
- Tamargo I, Valdivia J, Pérez, Toraño G. *H.influenzae* circulantes en Cuba. Caracterización de cepas aisladas de meningitis. Rev Cub Med Trop 1999; 51(3):204-5.
- Tamargo I, Toraño G, Rodriguez O. Characterization of *Haemophilus influenzae* obtained from invasive disease in Cuban children under five years of age. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(4):477-8.
- Tamargo I, Toraño G, Pérez M, Fuentes K, Llop A. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* circulantes en Cuba. Rev Latinoam Microb. 2000; 42:603-605.
- 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.
- Tamargo I, Fuentes GK, Toraño PG. Portadores nasofaringeos de *H.influenzae* en niños sanos que asisten a círculos infantiles. Rev Enferm Infec. 2003; 14:67-70.
- Valdivia A, Tamargo I, Pérez M. Resistencia a drogas antimicrobianas en cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b en pacientes con Síndromes Neuroinfecciosos. Rev Cub Med Trop 1993; 44(3): 65-70.
- Pérez M, Tamargo I. Estudio en la comunidad sobre la etiología de las Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas. Rev Ecuat Hig Med Trop 1994; 42:12-18.
- Valdivia J, Tamargo I, Toraño G, Rodríguez O. Resistencia a drogas antimicrobianas de cepas de *H. influenzae* b aisladas de pacientes con SIN. Rev Cub Med Trop 1995; 45: 173-6.
- Llop A, Tamargo I, Llanes R, Ramírez M, Toraño G. Resistencia a los antimicrobianos y vigilancia microbiológica en Cuba Rev Panam Infect 1999; 3(1):123-7.
- Quiñones D, Tamargo I, Fuentes G, Toraño G, Hernández I. Influencia del sitio de procedencia de muestras en la detección de portadores de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* en niños sanos. Rev Enf Infec Mex 1999; 3:92-95.

VII. Referencias Bibliográfica

- Llop A, Tamargo I Llanes R, Ramírez M, Toraño G. Resistencia antimicrobiana en las Américas. Magnitud del problema y su contención. Rev Panam Infect OPS/HCT/163/2000.
- Toraño G, Tamargo I, Falcón R, Fuentes K, Pérez M, Sánchez L. Evaluación de reactivos cubanos para el diagnóstico rápido de *Haemophilus influenzae* tipo b. Rev Cub Farm 2001; 2:112-15.
- Fuentes G, Tamargo I, Toraño Peraza G. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Haemophilus influenzae* no tipables aisladas de niños sanos. Rev Cub Med Trop 2004; 56(2):139-42.
- Llanes R, Pérez M, Tamargo I. Resistencia de *Haemophilus influenzae* a la Ampicilina. Rev Ecuat Hig Med Trop 1994; 42: 123-9.
- Dickinson F, Pérez A, Galindo M, Tamargo I. Vacunación contra *H. influenzae* tipo b en Cuba: experiencia e impacto. Rev Lat Microb 2000; 44(4): 23-9.
- Pérez RA, Dickinson F, Tamargo I. Resultados y experiencias de la vigilancia nacional de meningitis bacteriana en Cuba. Biotec Ap 2003; 20(2): 1-5.
- Falcon R, Toraño G, Martínez B y Tamargo I. Novedoso esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos anti-LPS de *H. influenzae* b. Rev Cub Med Trop 2001; 53(1):66-8.
- Toraño G, Hernández I, Toledo R, Baly G, Tamargo I, Carmenate A. Naturally acquired immunity to *Haemophilus influenzae* type b in healthy Cuban children. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(7):687-9.

VII.3 Bibliografía del autor no relacionada con la tesis.

- Tamargo I, Valdivia J, Pérez M. Utilización de una técnica de aglutinación de látex para la identificación de cultivos de *Staphylococcus aureus*. Rev Cub Ped 1990; 62(3):45-51.
- Tamargo I, Valdivia J, Pérez M. Identificación de cepas de Estreptococos beta hemolíticos de los grupos A, B, C y G por coaglutinación. Rev Cub Med Trop 1992; 44(2):23-6.
- Tamargo I Valdivia J, Pérez M. Identificación de *Streptococcus* por pruebas presuntivas y fisiológicas. Rev. Cub. Hig. Epid. 1992; 40(2):78-82.
- Batle MC, Toraño G, Tamargo I, Falcón R. Purificación de IgG de conejo anti-neumococo (serotipos) por intercambio iónico en una columna mono Q Hr 5/5 (FPLC). Rev Cenic 1993; 21(1); 5-11.
- Tamargo I, Pérez M, Rodríguez O, Toraño G. Diagnóstico rápido de *Haemophilus influenzae* tipo b y *Streptococcus pneumoniae* en Infecciones del Tracto Respiratorio Bajo. A Soc Venez Bioan Esp 1994; 3(3); 22-25.
- Pérez M, Batle M, Tamargo I. Agentes bacterianos más frecuentes en pacientes inmunodeprimidos con IRA. A Soc Venez Bioan Esp 1994; 3(3): 112-5.

VII. Referencias Bibliográfica

- Pérez M, Batle MC, Tamargo I. Estudio en la comunidad sobre la etiología de las Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas. Rev Ecuat Hig Med Trop 1994; 42:199-201.
- Batle MC, Falcon R, Tamargo I. Purificación de IgG de *Streptococcus pyogenes* por FPLC. Av Bioteecn Mod. 1994; 2: 65-72.
- Toraño G, Vilaseca J, Tamargo I. Obtención de la Hemolisina Principal (Neumolisina) de *S. pneumoniae* Rev Cub Med Trop 1999; 42:203-205.
- Falcon R, Toraño G, Tamargo I. Producción y purificación parcial de la Hemolisina Principal (Neumolisina) de *Streptococcus pneumoniae* Rev Cub Med Trop 1999; 51(3):160-5.
- Falcon R, Toraño G, Tamargo I. Purificación de la Neumolisina utilizando tecnología de FPLC. Rev Cub Quím 1998; 8 (4):32-6.
- González M, Barreiro B, Verdera J, Tamargo I. Neumonía por *Streptococcus* del grupo F. Presentación de un Caso clínico. Rev Lat Microb 1999; 44(4):123-4.
- Toraño G, Quiñones D, Hernández I, Hernández T, Tamargo I, Borroto S. Portadores nasofaríngeos de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina entre niños cubanos que asisten a círculos infantiles. Enferm Infect Microbiol 2001; 19(8):43-7.
- Toraño G, Hernández V, Tamargo I. Portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina entre niños cubanos que asisten a círculos infantiles. Enf Inf Microb Clin 2001; 19:367-70.
- Razón R, Tamargo I. Brote epidémico de neumonía por *Legionella pneumophila* en niños cubanos. Rev Cub Ped 2002; 74(3): 112-7.
- Battle MC, Pérez M, Romero J, Berguera J, Urguelles C, Tamargo I et al. Resistencia "in vitro" de diferentes drogas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con Fibrosis Quística. Rev Lat Microb 2003; 44 (4) :553-56.

Presentación en eventos científicos:

- Seminario Latinoamericano de Infectología. 1992 .Cuba.
- IV Congreso de Microbiología y Parasitología, I Congreso Cubano de Medicina Tropical. 1993. Cuba.
- XIX Congreso Brasileño de Microbiología. 1997. Brasil
- IV Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. 1993. Ecuador
- XXII Jornadas Científica de la SVBE. 1994. Venezuela
- II Seminario Latinoamericano de Infectología. 1994. Cuba
- XII Jornadas Venezolanas de Microbiología José A Serrano. 1994. Venezuela

VII. Referencias Bibliográfica

- Evento de Biotecnología Habana/94. 1994. Cuba.
- XII Seminario Científico del CNIC. 1995. Cuba.
- Evento de Biotecnología/95. CIGB. 1995. Cuba.
- VII Congreso Argentino de Microbiología. 1995. Argentina.
- 1er. Congreso Nacional de Infectología y Congreso de Epidemiología. 1996. Cuba.
- 1st. World Congress of pediatric infectious diseases. 1996. Mexico.
- V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso Cubano de Medicina Tropical. 1996. Cuba.
- I Seminario Internacional de Infectología Pediátrica. 1999. Cuba.
- Cuba. I Taller Nacional de Sepsis. 1999. Cuba
- II Taller de Colecciones de cultivos microbianos. 1999. Cuba.
- Taller de Resistencia Antimicrobiana. 2000. Cuba
- Evento de Biotecnología/97. CIGB. 1997. Cuba
- IX Congreso Nacional de Profesionales de Laboratorio Clínico. 1998. República Dominicana.
- Biotecnología Habana/99. 1999. CIGB. Cuba.
- I Jornada Internacional de Infectología Pediátrica. 1999. Cuba.
- Infecciosas 2K, 2do. Congreso Internacional de la Enfermedad Meningocóccica en la República Dominicana 2000. República Dominicana
- XV Congreso Latinoamericano de Microbiología y XXXI Congreso Nacional de Microbiología. 2000. México.
- Evento Biotecnología/2003. 2003. Cuba.
- I Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicinal Tropical. 2003. Guatemala.
- Congreso Internacional de Biotecnología-Habana. 2003. Cuba
- Congreso Latinoamericano de Microbiología. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. 2002. Cuba.

VII. Referencias Bibliográfica

- XXI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica. 2002. México.
- XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. 2002. Cuba
- XXI Congreso Brasilero de Microbiología. 2001. Brasil.
- V Jornada de Infectología Pediátrica. 2001. Cuba.
- IX Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica. 2001. El Salvador.
- IX Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica. XVII Congreso Nacional de Pediatría. 2001. Cuba.
- X Congreso de la SLIPE. XXIV Congreso Uruguayo de Pediatría. 2003. Uruguay
- VI Congreso Centroamericano de Parasitología y Medicina Tropical. 2003. Guatemala.
- Guatemala V Jornada Internacional de Infectología Pediátrica. 2004. Cuba.
- 11 TH ICID. Cancún. 2004. México

VIII. Anexos

Anexo 1.- Características diferenciales de las especies de *Haemophilus*.

| Organismo | Requier e factor X | Requier e factor V | Hemólisi s sangre de caballo | Fermentación de: | | | | Catalasa | Aumento de crecimiento en presencia de CO ₂ |
|----------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|------------------|----------|----------|---------|----------------|--------------------------------------------------------|
| | | | | Gluco sa | Sucro sa | Lacto sa | Mano sa | | |
| <i>H.influenzae</i> | + | + | - | + | - | - | - | + | + |
| <i>H.haemolyticus</i> | + | + | + | + | - | - | - | + | - |
| <i>H.ducreyi</i> | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>H.parainfluenzae</i> | - | + | - | + | + | - | + | D ^c | D |
| <i>H.parahaemolytic us</i> | - | + | + | + | + | - | - | + | - |
| <i>H.segnis</i> | - | + | - | W ^d | W | - | - | D | - |
| <i>H.paraphrophilus</i> | - | + | - | + | + | + | + | - | + |
| <i>H.aphrophilus</i> | + | - | - | + | + | + | + | - | + |

Anexo 2.

Preparación del caldo base y de cada carbohidrato para la prueba de fermentación de carbohidratos.

| Carbohidrato | Base | Glucosa | Lactosa | Manosa | Sacarosa | Xilosa |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|
| Caldo Base | 200 mL | 200 mL |
| Hematina 0.05% | 4.4 mL | 4.4 mL |
| NAD 1% | 0.24 mL | 0.24 mL |
| H ₂ O estéril | 20 mL | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| Glucosa | ---- | 20 mL | ---- | ---- | ---- | ---- |
| Lactosa | ---- | ---- | 20 mL | ---- | ---- | ---- |
| Manosa | ---- | ---- | ---- | 20 mL | ---- | ---- |
| Sacarosa | ---- | ---- | ---- | ---- | 20 mL | ---- |
| Xilosa | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 20 mL |

Anexo 3.

Producción de Indol.

Fundamento:

El indol es un bencilpirrol, producto de la degradación del triptófano; las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y deaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoniaco. El indol puede ser detectado cuando se combina con ciertos aldehídos, como el p-dimetilaminobenzaldehído, contenido en el reactivo de Kovac, y forma un complejo de color rojo. Se utiliza como substrato un medio rico en triptófano.

Medios y reactivos.

Caldo triptófano (1%)

| | |
|-------------------------------------------|--------|
| Peptona o digerido pancreático de caseína | 2g |
| Cloruro de Sodio | 0.5g |
| Agua Destilada | 1000mL |

Reactivo de Kovac

| | |
|--------------------------------------|--------|
| p-dimetilaminobenzaldehído | 10 g |
| Alcohol amílico | 150 mL |
| Ácido clorhídrico concentrado | 50 mL |
| (Se conserva en frasco ámbar a 4 °C) | |

Anexo 4.

Hidrólisis de la Urea

Fundamento:

La urea es una diamina del ácido carbónico que puede ser hidrolizada por la enzima ureasa existente en algunos grupos bacterianos, con liberación de amoníaco y dióxido de carbono.

El amoníaco en solución pasa a formar carbonato de amonio, produciéndose una alcalinización del medio y por lo tanto un cambio de color debido al indicador de rojo de fenol. El caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen, son los dos medios más comúnmente utilizados en los laboratorios clínicos para la determinación de la actividad de la ureasa.

Medio de cultivo utilizado.

Agar urea de Christensen.

| | |
|----------------------------|-----------|
| Peptona | 1.0g |
| Cloruro de Sodio | 5.0 g |
| Fosfato monopotásico | 2.0 g |
| Urea | 20.0 g |
| Rojo de Fenol | 0.012 g |
| Agar | 15.0 g |
| Agua destilada | 1000.0 mL |

Nota: Los organismos que hidrolizan la urea rápidamente pueden producir reacciones positivas en 1 o en 2 horas, las especies menos activas pueden requerir 3 o más días. En las especies que requieren una fuente de peptona para crecer, se utiliza como preferencia el medio sólido de Christensen, en lugar del de Stuart.

Anexo 5.

Descarboxilación de la Ornitina.

Fundamento:

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas substrato, que actúan sobre el grupo carboxilo de los aminoácidos con producción de dióxido de carbono como producto secundario.

Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la lisina, ornitina y arginina son los que habitualmente se usan en la identificación de enterobacterias y otras especies gramnegativas. Las aminas específicas que producen son, cadaverina a partir de lisina, putrescina cuando el sustrato es ornitina y citrulina en el caso de la arginina.

Para determinar la capacidad de descarboxilación de un aislamiento, el medio base más frecuentemente utilizado es el caldo base de Moeller. El aminoácido por ensayar se añade al medio base antes de inocular el organismo en estudio. Se debe emplear paralelamente un control que consiste en un medio base, sin el aminoácido. Ambos tubos se incuban anaeróbicamente con una capa de aceite mineral sobre el caldo.

Durante las etapas iniciales de incubación ambos medios viran a amarillo debido a la fermentación de la glucosa del medio. Si el aminoácido es descarboxilado se forman aminas alcalinas, hay aumento del pH y el medio retorna a su color púrpura original.

Caldo base descarboxilasa de Moeller.

| | |
|------------------------------|-----------|
| Peptona | 5.0g |
| Extracto de carne | 5.0g |
| Púrpura de bromocresol | 0.010 g |
| Rojo de cresol | 0.005 g |
| Glucosa | 0.5 g |
| Piridoxal | 0.005 g |
| Agua destilada | 1000.0 mL |
| Ajustar pH a 6.5 | |

Adicione 1 g de ornitina por cada 100 mL de caldo base de Moeller. Doble esta cantidad si se emplea la forma D-L ya que sólo es activa la forma L.

Anexo 6.

Agar HTM (Haemophilus Test Medium)

Descripción:

Este medio es una modificación del agar Mueller Hinton, que se utiliza para pruebas de susceptibilidad de Haemophilus.

Composición química.

| | |
|------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Agar Mueller Hinton (BBL) | (46 g en 1000 mL de H ₂ O destilada) |
| Hematina bovina | 30 mL |
| Extracto de levadura (Difco) | 5 g |
| NAD (Sigma) | 3 mL |

Preparación

Disolver la base del agar Mueller Hinton en 1000 mL de agua destilada.

Calentar hasta ebullición.

Adicionar 30 mL de la solución madre de hematina.

Esterilizar en autoclave a 121 °C, por 15 minutos.

Enfriar en baño de agua a 50 °C.

Adicionar 3 mL de la solución de NAD.

Preparación de la solución madre de Hematina bovina.

Hematina bovina 50 mg

N_aOH 0.01N 100 mL

Disolver la Hematina bovina en el N_aOH 0.01N.

Calentar suavemente hasta lograr la completa dilución de la hematina.

Preparación de la solución madre de NAD.

NAD 50 mg

Aqua destilada 10 mL

Disolver el NAD en agua destilada.

Esterilizar por filtración (Millipore 0.22 µm).

VIII. Anexos

Control de calidad

El medio una vez elaborado debe ser incubado a 37 °C por 24-48 horas.

Control de crecimiento

A las 24 horas de incubación se debe observar un buen crecimiento de la cepas *Haemophilus influenzae* ATCC 10211.

Nota: El caldo HTM se elabora de forma idéntica al agar HTM excepto que en vez de utilizar base de agar, se emplea caldo Mueller Hinton.

VIII. Anexos

Anexo 7. Solventes y diluyentes para la preparación de las soluciones de antimicrobianos.
NCCLS, M7-A5, 2002.

| Agente antimicrobiano | Solvente | Diluyente |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Amoxicilina/Acido Clavulánico | Solución fosfato pH 6.0, 0.1 mol/L | Solución fosfato pH 6.0, 0.1 mol/L |
| Ampicilina | Solución fosfato pH 8.0, 0.1 mol/L | Solución fosfato pH 6.0, 0.1 mol/L |
| Cloranfenicol y Eritromicina | Etanol 95% | Agua destilada |
| Cefalosporinas | Solución fosfato pH 6.0, 0.1 mol/L | Agua destilada |
| Sulfonamidas | Agua destilada y NaOH 2.5 mol/L | Agua destilada |
| Trimetoprim | 0.05 mol/L acido clorhidrico | Agua destilada |
| Rifampicina | Metanol | Agua destilada |

VIII. Anexos

Anexo 8. Reactivos para la preparación de los bloques conteniendo el ADN de *H. influenzae*.

1)- Solución de lavado:

A) Recomendado

Tris-Cl H 10 mM
EDTA 10 mM
EGTA 10 mM
Cl Na 1 M pH=7,5

B) Alternativa:

Tris-Cl H 0,1 M
EDTA 0,1 M
Cl Na 0,15 M pH=7,5

2).- Solución de proteólisis:

A) Recomendado

EDTA 0,25 M
EGTA 20 mM
Lauril sarcosil 1 % (p / v) pH 9

B) Alternativa:

EDTA 0,5 M
Lauril sarcosil 1 % (p / v) pH= 9,5

3).- Proteinasa K.

Se disuelve en agua destilada a una concentración de 50 mg / mL y se guarda en alícuotas de 200 µl.

4).- Solución Tris-EDTA:

Tris-Cl H 10 mM
EDTA 1mM pH 8

Se debe preparar a una concentración 10 X.

5).- Solución de la enzima Sma I:

Tris-Cl H 20 mM, pH=7,4
Cl₂ Mg 5 mM
Cl K 50 mM

6).- Solución TBE:

Tris-borato 0,1 %, pH=8,3

EDTA 2 mM

7).- Solución salina fosfato (PBS):

Fosfato dihidrogenado de sodio 7.0g

Fosfato hidrogenado disódico 7.0g

Agua destilada 1000 mL

pH=7.2

8).- Mezcla de digestión:

10-15 unidades de la enzima en 150 µl de solución 1 X de la enzima.

Enzima 2 µl

BSA 0,5 µl

Solución de la enzima 10 X 10 µl

H₂O 137,5 µl

VIII. Anexos

Anexo 9. Esquema de vacunación con Vaxem® 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: Dickinson et al, 2001.