



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS DE SEROTIPOS Y
SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE
Haemophilus influenzae
CAUSANTE DE ENFERMEDAD EN
POBLACIÓN MEXICANA (2019-2021)

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ALBER ELÍ LAVANA

CODIRECTORAS

M. en C. ARACELI SOTO NOGUERÓN

Dra. IRMA GABRIELA ECHÁNIZ AVILES

APROBADA POR

Los miembros del jurado revisor del documento de Seminario de Investigación y de la Titulación del Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas

M. en C. VERONICA CHÁVEZ LÓPEZ

Presidente del comité supervisor

M. en B. LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO

Secretario

M. en C. ARACELI SOTO NOGUERÓN

1º vocal

M. en C. MARIA LUISA BARROSO GARCÍA

2º vocal

DRA. DEYANIRA PÉREZ MORALES

3º vocal

REPERTORIO INTITUCIONAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

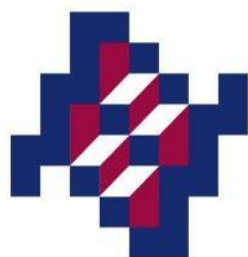
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS



Instituto Nacional
de Salud Pública

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Hi: Haemophilus influenzae

Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b

HiNT: *Haemophilus influenzae* No Tipificable

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

INSP: Instituto Nacional de Salud Pública

GIVEBPVac: Grupo Interinstitucional para la Vigilancia de Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación

PRP: Polirribosil Ribitol Fosfato

IgA: Inmunoglobulina A

Factor X: Hemina

Factor V (NAD): dinucleótido de nicotinamida adenina

DMK: dimetil-menaquinona

LOS: lipooligosacárido

LPS: lipopolisacárido

HbPV: vacuna contra Hib de polisacárido puro

LCR: Líquido cefalorraquídeo

SPS: Polianetol Sulfato de Sodio

Taq: Thermus aquaticus

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en ingles)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

DGE: Dirección General de Epidemiología

ATCC: American Type Culture Collection

BLPAR: β -lactamasa Positivo Ampicilino Resistente

BLNAR: β -lactamasa Negativo Ampicilino Resistente

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	7
2 ANTECEDENTES	9
2.1 Historia de <i>Haemophilus influenzae</i>	9
2.2 Clasificación taxonómica.....	9
2.3 Características macroscópicas	9
2.4 Características microscópicas.....	10
2.5 Factores de virulencia	10
2.5.1 Polisacárido capsular	10
2.5.2 Lipopolisacárido (endotoxina)	11
2.6 Aislamiento e identificación.....	12
2.6.1 Requerimiento de factores X y V.....	12
2.6.2 Satelitismo	12
2.6.3 Serotipos de <i>H. influenzae</i>	12
2.6.4 Reacción serológica capsular	13
2.6.5 Método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	13
2.7 Características clínicas	15
2.8 Prevalencia de infecciones por <i>Hin</i>	16
2.9 Factores de predisposición	16
2.10 Tratamiento.....	17
2.10.1. Susceptibilidad antimicrobiana	17
2.10.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	18
2.10.3. Determinación de β -lactamasa.....	19
2.11 Vacuna contra <i>H. influenzae</i>	19
2.11.1. Desarrollo de la primera vacuna.....	19
2.11.2. Vacuna conjugada.....	20
2.11.3. Impacto de la vacunación.....	20
2.12 Epidemiología actual de <i>H. influenzae</i>	21
2.12.1. En el mundo.....	21
2.12.2. En México.....	22
3 JUSTIFICACIÓN.....	24
4 HIPÓTESIS	25
5 OBJETIVOS	26
5.1 Generales.....	26
5.2 Específicos	26
6 MATERIAL Y METODOS	28
6.1 Tipo de estudio.....	28
6.1 Población de estudio	28
6.2 Obtención de cepas de <i>H. influenzae</i>	28
6.3 Transporte de <i>H. influenzae</i>	28
6.4 Aislamiento e identificación de <i>Haemophilus influenzae</i>	29
6.5 Tipificación de <i>H. influenzae</i> etapa 1 (genes <i>Omp</i> y <i>VK</i>)	30
6.5.1 Tipificación de <i>H. influenzae</i> capsulados por PCR etapa 2 (genes <i>cap a-f</i>).....	32
6.6 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	34

7	RESULTADOS.....	36
7.1	Características clínicas y epidemiológicas de <i>H. influenzae</i>	36
7.2	Tipificación de las cepas de <i>H. influenzae</i>	42
7.3	Susceptibilidad antimicrobiana de <i>H. influenzae</i>	44
8	DISCUSIÓN.....	47
9	CONCLUSIÓN.....	50
10	PERSPECTIVAS.....	51
11	LIMITACIONES.....	52
12	ANEXOS.....	53
	Anexo 1 Aislamiento e Identificación de <i>H. influenzae</i> y preparación de medios de cultiv.....	53
	Anexo 2 Tipificación de <i>H. influenzae</i> por PCR, secuencias de oligos y soluciones.....	56
	Anexo 3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	63

1. INTRODUCCIÓN

Haemophilus influenzae (*Hi*) es una bacteria Gram negativa ampliamente distribuida en el mundo, que aun cuando reside como organismo comensal en la faringe humana, es considerada de gran importancia clínica por ser causante de diversas enfermedades que afectan exclusivamente al hombre, siendo el segundo agente etiológico de mayor frecuencia, por detrás de *Streptococcus pneumoniae* en infecciones bacterianas que afectan principalmente a menores de 5 años según la OMS.¹⁻² Se clasifica en 6 serotipos capsulares denominados con letras a, b, c, d, e y f conforme al arreglo de su composición química capsular; y en no capsulado o no tipificable (NT) por carecer de cápsula.

Las cepas no capsuladas suelen producir enfermedades como otitis media y sinusitis por propagación a partir de la nasofaringe,³ mientras que las cepas capsulares (a-f), al migrar de la nasofaringe hacia el torrente sanguíneo pueden producir sepsis o propagarse a otros sitios del cuerpo dando lugar a meningitis, neumonías, artritis séptica, osteomielitis y pericarditis, que en conjunto son conocidas como enfermedades invasivas por *Hi*.⁴⁻⁵

Una de las principales características de las infecciones por *Hi* es que el 85% de éstas son provocadas particularmente por el serotipo b (Hib), debido a sus principales factores de virulencia que posee, como es la composición de su polisacárido capsular, lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa, que participan como su principal mecanismo de patogenicidad y facilitan a la bacteria la colonización a otros sitios a partir de la nasofaringe; además de tener la particularidad de que las infecciones varían de acuerdo con la edad, donde el 85% de las infecciones ocurren en menores de 5 años y más del 65% en menores de 1 año.⁶ Por lo tanto, el grupo de mayor riesgo de contraer una infección por Hib es el de 6 a 18 meses de edad, lo que le ha atribuido a este serotipo su gran importancia en salud pública.²

Esta característica impulsó al desarrollo de una vacuna efectiva contra Hib, la cual para el 2013 se había introducido en el 95% de los países miembros de la OMS. Sin embargo, en la actualidad en poblaciones no vacunadas, Hib es el principal causante de meningitis bacteriana durante el primer año de vida, causando la muerte hasta del 20% de los enfermos incluso con un tratamiento antimicrobiano rápido y adecuado.⁴

En México a pesar de que se ha reducido hasta un 90% la incidencia de infecciones debido a la inmunización por la vacuna conjugada contra Hib, aún se reportan altas incidencias de neumonías y bronconeumonías cada año, donde *Hi* sigue siendo el segundo agente etiológico de las neumonías bacterianas del país, afectando principalmente a los grupos menores de 5 y mayores de 65 años.⁵

Actualmente, se ha observado la presencia de otros serotipos diferentes al b, así como *Hi* no capsulado como causantes de enfermedad. Por ello identificar y determinar los serotipos de *Hi* sigue siendo de gran importancia en la salud pública a través de su vigilancia epidemiológica para detectar posibles cambios en la frecuencia de incidencia de los serotipos, para proteger y prevenir a las poblaciones más vulnerables ante infecciones por *Hi*.

2 ANTECEDENTES

2.1 Historia de *Haemophilus influenzae*

Fue descubierto en Europa en 1892 por Richard Pfeiffer durante la epidemia de influenza y se le consideró erróneamente como el agente causal de la gripe, hasta entonces se le conoció como el bacilo de Pfeiffer. Fue hasta 1917 que la Sociedad Americana de Bacteriólogos le dio el nombre de *Haemophilus influenzae* (*Hi*) debido a su avidez por la sangre y en 1933 se estableció que la gripe de influenza era causada por un virus y que *Hi* se presentaba como un patógeno secundario.⁶

2.2 Clasificación taxonómica

Dominio: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gammaproteobacteria
Orden: *Pasteurellales*
Familia: *Pasteurellaceae*
Género: *Haemophilus*
Especie: *influenzae*

2.3 Características macroscópicas

En medio de cultivo las colonias que desarrolla *Hi* tienen una forma convexa, circular, granular o transparente, ligeramente opaca, de 0.5-0.8 mm a las 24 h de crecimiento y 1-1.5 mm a las 48 h. Las colonias de las cepas capsuladas se observan de mayor tamaño y de aspecto más mucoide, además de que presenta un olor característico (semejante a indol)⁷ (Figura 1).



Figura 1: Colonias de *H. influenzae* en medio de cultivo gelosa chocolate.

2.4 Características microscópicas

Hi es una bacteria Gram negativa, en forma de pequeños cocos o cocobacilos pleomórficos que miden de 0.2-0.3 por 0.5-0.8 μm , son inmóviles, no esporulados, anaerobios facultativos. Crece a una temperatura de 35-37°C en condiciones aeróbicas o con 5% de CO_2 .⁸ (Figura 2).



Figura 2: *H. influenzae*, microfotografía de la técnica de tinción de Gram vista a 100x.

Hi requiere desde el punto de vista nutricional un medio complejo y factores de crecimiento que se encuentran presentes en los eritrocitos: denominados factor X o factor termoestable del hierro, que suministran protoporfirinas (hemina) y factor V o factor termolábil (NAD o NADP) que es una coenzima cuya función principal es el intercambio de electrones y protones, razón por la que generalmente se utilizan medios enriquecidos para su cultivo y por la que se les denomina bacterias exigentes.¹

2.5 Factores de virulencia

Hi cuenta con tres principales factores antigénicos importantes, el polisacárido capsular, el lipopolisacárido (endotoxina) y las proteínas de membrana externa.

2.5.1 Polisacárido capsular

La capsula es el principal factor de virulencia el cual le brinda a la bacteria defensa frente a anticuerpos, bacteriófagos, células fagocíticas el cual actúa como un "escudo" en contra de las proteínas del complemento, facilitando su adherencia. La composición capsular varía según el serotipo, siendo el polisacárido capsular el antígeno determinante el cual le confiere

especificidad a *Hi* y por lo cual se clasifica en 6 serotipos diferentes denominados a, b, c, d, e y f, dependiendo del tipo de azúcar que presenta el polisacárido capsular en cada uno de ellos: glucosa para el serotipo (a), pentosa formada por un polímero de ribosa, fosfato y ribitol (PRP) lo que le proporciona la mayor virulencia en serotipo (b), galactosa en serotipo (c), hexosa en serotipo (d), hexosamina en serotipo (e) y galactosamina en serotipo (f).^{4,9}

2.5.2 Lipopolisacárido (endotoxina).

El lipopolisacárido (LPS) de *Hi* es análogo al lipooligosacárido (LOS) el cual comparte estructuras lipídicas A similares, con un conjunto de actividades funcionales idéntico al de los LPS. Sin embargo, los "LOS" carecen de unidades de antígeno O.¹⁰

El antígeno O es una molécula altamente variable entre especies, cuando el antígeno O está presente se le denomina lipopolisacárido a la molécula completa (LPS); cuando el antígeno O está ausente se le denomina lipooligosacárido (LOS).

Las interacciones entre *Hi* y las superficies epiteliales de los hospederos ocurren gracias a que los "LOS" son de carácter hidrofóbico y esta característica les permite formar uniones hidrofóbicas con receptores glicoproteicos, proteicos y gangliosídicos de las membranas de las células mucosas del hospedero.

Los "LOS" se liberan en vacuolas de la membrana externa al multiplicarse la bacteria o cuando experimentan lisis, dañan al epitelio ciliado y hacen que las células epiteliales se desprendan, además de que estimulan varias respuestas del sistema inmune innato, como la secreción de citocinas, expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y activación de la capacidad del macrófago, actuando como potentes toxinas (endotoxina).^{11,12,13} También puede ser importante en la patogénesis de la meningitis provocado por Hib, ya que experimentalmente se ha observado la producción de inflamación meníngea después de la inoculación de este componente.¹⁴

2.5.3 Proteínas de membrana externa

Otro mecanismo que facilita a *Hi* la colonización de las mucosas es la presencia de proteasas IgA las cuales le permiten la evasión del sistema de defensa inmunitario a nivel de mucosas permitiéndole extenderse por contigüidad y causar infección local.¹⁵

2.5.4 Otros factores de virulencia

El desarrollo de pilis y fimbrias en *Hi* le brindan la capacidad de adherirse a la superficie de las células epiteliales bucales y orofaríngeas con gran efectividad por sus adhesinas, que le brindan una mayor capacidad de colonización.¹⁶

2.6 Aislamiento e identificación

El medio de elección para su crecimiento y desarrollo es el agar chocolate que libera el factor X, con suplemento adicional del factor V.

Para la identificación y su diferenciación con otras especies de *Haemophilus*, se realizan las siguientes pruebas:

2.6.1 Requerimiento de factores X y V

El requerimiento de los factores se prueba a través de discos de papel impregnados por separado de los factores X y V y un tercero conteniendo los factores XV juntos colocados en medio de soya tripticasa (TSA, Difco®). La prueba es positiva a *Hi* cuando se presenta crecimiento de la bacteria alrededor del disco XV.

2.6.2 Satelitismo

El satelitismo es otra prueba de identificación de *Hi*, que consiste en probar su crecimiento alrededor de colonias de *Staphylococcus aureus* hemolítico debido a que esta especie de bacteria es fuente del factor V. El fenómeno del satelitismo de *Hi* se presenta cuando *S. aureus* suministra el factor V (NAD) que se difunde cuando se crece en el medio de cultivo de agar sangre, a su vez la sangre del medio proporciona el factor X.

Al realizar este cultivo mixto con *S. aureus* e *Hi*, aparecen pequeñas colonias tipo "gotas de rocío" de *Hi* dentro del área donde se libera NAD alrededor de las colonias de *S. aureus*.

2.6.3 Serotipos de *H. influenzae*

Hi posee una cápsula que juega un papel importante en la patogénesis y la inmunogenicidad. Pittman en 1931 clasificó *H. influenzae* de acuerdo con sus antígenos capsulares en 6 grupos o serotipos, denominándolos con las letras a, b, c, d, e y f. Estos antígenos son de naturaleza

polisacárida y son serológicamente específicos; algunos aislamientos no poseen cápsula, por lo que no pueden tipificarse y se les denomina no tipificables (NT). En la actualidad los serotipos con mayor importancia que circulan en el mundo son el serotipo a (Hia) y los no tipificables (HiNT) debido a su creciente frecuencia como causantes de enfermedades invasivas por *Hi*.⁷

2.6.4 Reacción serológica capsular

Los diferentes tipos de *Hi* (a-f) se pueden identificar en el laboratorio por tipificación con sueros conteniendo anticuerpos dirigidos contra el polisacárido capsular específico según su composición química. La serotipificación puede realizarse por aglutinación en lámina, hinchamiento capsular (reacción de Quellung), por coaglutinación, inmunofluorescencia o contra inmunoelectroforesis.

Dado que la cápsula es el factor de virulencia más importante para *Hi*, es poco común encontrar aislamientos invasores que no se puedan serotipificar. Sin embargo, *Hin* puede no presentar capsula, lo que impide poder tipificarlo denominado entonces como *H. influenzae* no tipificable (HiNT).¹⁷

2.6.5 Método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Actualmente se ha implementado el método de PCR para la tipificación de *Hi*. Dicha técnica de biología molecular para el diagnóstico y para la asignación inequívoca del tipo capsular de *Hi*, se introdujo a nuestro país en el año 1994,¹⁸ al igual que en otros países como Colombia y Uruguay.¹⁹

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que permanece activa ante altas temperaturas, tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN usando primers específicos. Esta técnica consta de tres etapas (Figura 3): la primera es la desnaturalización; en esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases

está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso. La hibridación; en esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (Tm) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60°C. Finalmente, la extensión; etapa donde la *Taq* polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima se activa funcionalmente. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones o producto de PCR (Figura 3).²⁰

Para la identificación de los serotipos de *Hi* por PCR, se utiliza un gen de la proteína de membrana externa *OmpP2* I/III, el cual confirma la identificación de especie *Hi*, un gen *VanKeteI* (VK) el cual detecta la habilidad del aislamiento de *Hi* de expresar cápsula y un tercer gen, *cap* que confirma el serotipo.¹⁷⁻¹⁸ Esta técnica ha sido implementada desde principios del 2000 en diversos estudios y programas de vigilancia epidemiológica, para la detección e identificación de *Hi* en distintos países de Latinoamérica como en Colombia, Argentina, Paraguay, Uruguay, entre otros.^{19,21-23}

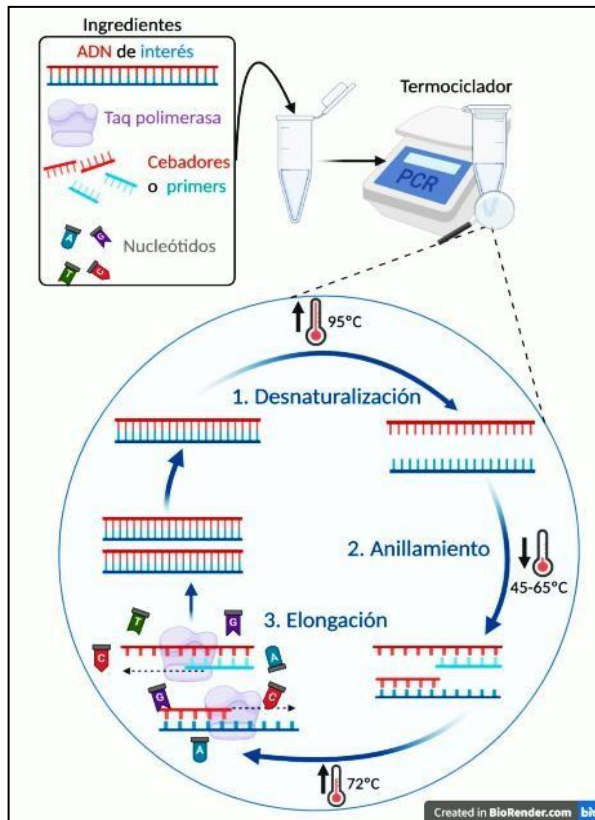


Figura 3. Esquematación del procedimiento y fundamento de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para llevar a cabo la reacción se requiere de una serie de componentes que participan en las distintas etapas y solo se puede realizar mediante un termociclador; equipo especializado para repetir los ciclos de las distintas temperaturas.
Fuente: BioRender.com

2.7 Características clínicas

Hi se trasmite cuando un portador tose o estornuda, a través de partículas expulsadas en el aire y pueden ser inhaladas por otra persona provocándole así una infección, posteriormente coloniza las vías superiores y se propaga a través de las mucosidades y/o de la saliva.¹

Hi causa dos clases de infecciones, invasora y no invasora. Las invasoras son consideradas generalmente infecciones agudas o graves, producidas por cepas capsuladas sobre todo por el serotipo b (Hib), aunque otros serotipos también pueden producirlas. Este tipo de infecciones se origina desde la nasofaringe invadiendo mucosas de vías respiratorias inferiores y se propaga a otras estructuras anatómicas por medio del torrente sanguíneo, provocando infecciones graves como meningitis, neumonías y sepsis. Las infecciones no invasoras o crónicas afectan al tracto respiratorio provocando nasofaringitis, bronquitis, sinusitis, otitis media, epiglotitis, conjuntivitis y pericarditis, entre otras menos graves causadas generalmente por cepas no capsuladas.^{1,17}

2.8 Prevalencia de infecciones por *Hib*

Las infecciones por Hib son un problema global, debido a que éste presenta una distribución cosmopolita. En el año 2000 antes de la era vacunal en países de bajo y medio ingreso, la OMS estimaba que Hib era responsable de por lo menos 8,13 millones de casos de enfermedad grave en niños de 1-59 meses de edad y 371 mil muertes globalmente.¹⁹

Tras la introducción de la vacuna conjugada contra *Hi*, se ha observado un descenso al rededor del 90% de la enfermedades y muertes causadas por Hib. Para el año 2015, se estimó haber ocurrido globalmente 934,000 casos de neumonía por Hib en niños de 1-59 meses de edad y 31,000 casos de meningitis, resultando en 22,000 y 7,000 muertes respectivamente. De esos, 5,000 casos de neumonía por Hib, con letalidad de 2%, y 200 casos de meningitis, con letalidad de 30%, ocurrieron en la Región de las Américas.¹⁹

Sin embargo, la tendencia de enfermedades infecciosas provocadas por los serotipos no b o no capsulares sigue en aumento, por ejemplo, en EE. UU., entre 2009 y 2015, el 71,6 % de los aislamientos invasivos pertenecían a HiNT. En Canadá la cifra fue del 77% entre 2004 y 2013. Del mismo modo, los datos de Europa entre 2007 y 2014 mostraron que el 78% pertenecían a HiNT. En la región de las Américas y el Caribe, 16 países miembros del Sistema Regional de Vacunas (SIREVA), red enfocada a la vigilancia de enfermedades causadas por *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*, informaron en 2015 la presencia de 34 casos de Hia, 152 de Hib, 13 de Hif y 143 casos de HiNT.²⁴

2.9 Factores de predisposición

Una de las principales características de la incidencia de la infección por Hib, es que varía de acuerdo con la edad. El 85% de las infecciones ocurren en menores de 5 años y más de 65% ocurren en menores de 1 año, por lo que el grupo de 6 a 18 meses es el grupo de mayor riesgo de infección por Hib, donde la meningitis es la enfermedad más frecuente.^{19,24} Adicionalmente al riesgo por la edad, existen otros factores que predisponen a las personas a tener infección por Hib, como son los fumadores pasivos o personas expuestas constantemente a humo y las personas inmunosuprimidas.

2.10 Tratamiento

Las enfermedades por Hib se combaten con antibióticos adecuados, tratamiento sintomático y tratamiento complementario de las secuelas.

Generalmente se requiere hospitalización para tratar las enfermedades invasivas por Hib. Una terapia antimicrobiana eficaz con cefalosporina de tercera generación (cefotaxima o ceftriaxona) o cloranfenicol en combinación con ampicilina debe comenzar inmediatamente. El curso de tratamiento suele ser de 10 días.

La neumonía se trata con distintas pautas terapéuticas que dependen de la gravedad clínica de la enfermedad. Pueden ser tratados con amoxicilina oral. Para una neumonía muy grave y para los niños inmunodeprimidos (como los infectados por el VIH), se recomiendan la ampicilina y la gentamicina por vía parenteral. Se puede usar la ceftriaxona como tratamiento de segunda línea cuando falle el tratamiento de primera línea.

La meningitis como enfermedad invasiva por *Hi* debe tratarse actualmente con amoxicilina/clavulánico, cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima), imipenem y ciprofloxacino, utilizados como terapia empírica se puede esperar una alta probabilidad de éxito de la terapia.²⁵

2.10.1. Susceptibilidad antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos betalactámicos es el mecanismo más frecuente de *Hi* debido a la producción plasmídica de una β -lactamasa, la cual le brinda resistencia a ampicilina, amoxicilina y penicilina, comúnmente utilizados en el tratamiento de primera línea de las infecciones causadas por *Hi*. Este microorganismo puede presentar resistencia sólo a la ampicilina o bien asociada a resistencia múltiple a otros fármacos, como el cotrimoxazol, cloranfenicol, tetraciclinas y aminoglucósidos. Por ello el estudio de la resistencia a los antimicrobianos brinda datos de gran importancia clínica y epidemiológica.²⁷⁻²⁸

2.10.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos

Hi presenta 2 mecanismos principales que son la causa de la resistencia a los betalactámicos: la hidrólisis del antibiótico por la producción plasmídica de enzimas β -lactamasas y por alteraciones en la proteína PBP3.²⁹

Las enzimas β -lactamasas son proteínas especializadas con estructura cuaternaria de β -hoja y su mecanismo de acción es hidrolizar irreversiblemente el enlace amida del núcleo betalactámico de los antibióticos de este grupo. Están divididas en clases de acuerdo con su peso molecular, punto isoeléctrico y sitio activo entre otros y actúan como mecanismos de resistencia natural de algunas bacterias.³⁰

En *Hi* son principalmente del tipo TEM-1 y menos frecuente del tipo TEM-2 o RBO-1. Estas enzimas confieren un perfil de sensibilidad similar y son eficazmente inhibidas por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, fenotipo conocido como "betalactamasa positiva ampicilina resistente" (BLPAR). Sin embargo, puede haber variaciones en los niveles de resistencia en función del promotor asociado al gen TEM-1, estos promotores pueden tener diferentes afinidades por la ARN polimerasa, dando lugar a una mayor o menor producción de enzima que podría incluso afectar a amoxicilina-ácido clavulánico y cefalosporinas de segunda generación.^{4,26,29}

Las alteraciones en la proteína fijadora de la penicilina PBP3 (PBP por sus siglas en inglés, penicillin binding proteins) son proteínas fijadoras de β -lactámicos, las cuales se encuentran en la membrana citoplasmática de las bacterias debido a mutaciones en el gen *ftsI* donde ocurre sustituciones de aminoácidos, se le conoce como fenotipo "betalactamasa negativa ampicilina resistente (BLNAR)" y se caracteriza por bajos niveles de resistencia a los betalactámicos y a sus combinaciones con inhibidores de betalactamasas.²⁷

Además de los anteriores se suelen evidenciar mecanismos de resistencia adicionales, como es la hiperpresión de la bomba de expulsión activa AcrAB por mutaciones en el gen regulador de la bomba. Cada vez son más frecuentes las cepas BLPACR (betalactamasa positiva amoxicilina-ácido clavulánico resistente) que producen betalactamasa y poseen alteraciones en la PBP3 y se caracterizan por altos niveles de resistencia a ampicilina y amoxicilina junto a disminución de la sensibilidad a amoxicilina-ácido clavulánico.²⁹

Microdilución en placa

Para la determinación de la susceptibilidad de *Hi* a diferentes antibióticos, se realiza el método de microdilución en placa, siguiendo los lineamientos del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), organización que provee los estándares y lineamientos para procesos en laboratorio. En el caso de *Hi* se recomienda el uso de medio de cultivo en caldo *Haemophilus* Test Medium (HTM) para probar la susceptibilidad. Se realiza una suspensión directa de la colonia equivalente a una densidad de 0.5 en el rango de McFarland, se prueba contra diferentes diluciones del antibiótico con un tiempo de incubación en CO₂ de 20-24 h a 35°C ± 2°C h.¹⁷

2.10.3. Determinación de β-lactamasa

La detección de β-lactamasas se realiza con un método cromogénico, usando discos de nitrocefina. Este compuesto cambia de color muy rápido cuando la amida unida a un anillo β-lactámico es hidrolizada por acción de una β-lactamasa producida en cantidades significativas, por el cual el disco vira de color amarillo a rosa. Con ello se vigila sensibilidad a ampicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, cefalosporinas, carbapenémicos, macrólidos y quinolonas.^{17,27,30}

2.11 Vacuna contra *H. influenzae*

2.11.1. Desarrollo de la primera vacuna

En 1959 fue elaborada la primera vacuna contra *Hi* con células inactivas de la bacteria por calor. Posteriormente se analizó la correlación entre los anticuerpos dirigidos hacia el polisacárido capsular de Hib y la resistencia a la infección que incrementa con la edad del individuo, por lo que se llevó a cabo el desarrollo de la vacuna contra Hib con el polisacárido capsular purificado (PRP). Sin embargo, en 1977 en Finlandia se demostró que esta vacuna era solo eficiente en los niños de mayor edad, pero ineficiente en los menores de 18 meses. Debido a esto en 1985 fue autorizada en Estados Unidos, una nueva vacuna de polisacárido puro (HbPV), la cual, de igual manera no fue efectiva en niños menores de 18 meses y tuvo que ser descontinuada tres años después, por lo que se tuvo que contemplar nuevas estrategias para inducir una inmunidad más eficiente en los niños vulnerables de este grupo de edad.³¹

2.11.2. Vacuna conjugada

A principios de 1990 se recurrió al desarrollo de una vacuna conjugada, es decir, a unir químicamente un polisacárido (antígeno poco efectivo) a una proteína que fungiría como portador (antígeno efectivo) que mejorara en gran medida la inmunogenicidad, particularmente en los primeros 18 meses de edad. Así, surgió la primera vacuna conjugada proteína-polisacárido efectiva contra una bacteria causante de enfermedades en menores de 2 años. También se optaron nuevas estrategias de inmunización con repetidas dosis que provocan respuestas de refuerzo y maduración de la inmunidad específica.³²

2.11.3. Impacto de la vacunación

La introducción de la vacuna conjugada fue exitosa, en los países con buena cobertura vacunal en la población infantil, reduciendo la incidencia hasta en un 95% de los casos.⁴ En el 2019, la OMS reportaba que dicha vacuna se había introducido en los programas de inmunización de 192 estados miembros de esta organización. Se estima que la cobertura mundial con tres dosis de la vacuna contra Hib es de un 72%, aunque hay grandes disparidades entre regiones. Se estima que en la Región de Asia Sudoriental la cobertura es del 89%, mientras que en la Región del Pacífico Occidental es solo del 24%.^{24,33}

En México, antes de 1999, el esquema nacional de vacunación consideraba una inmunización primaria con DPT (difteria-tosferina-tétanos) a los dos, cuatro y seis meses de edad, la cual fue sustituida y complementada por la vacuna pentavalente celular: DPT + HB (hepatitis B) + Hib que se introdujo desde 1999. Su aplicación en tres momentos fue realizada hasta 2008, cuando fue reemplazada por la vacuna pentavalente acelular (DPaT+VIP+Hib) La vacuna no contendría el componente de hepatitis B pero incluiría los virus inactivados de poliomielitis tipos I, II y III, además del toxoide diftérico, el toxoide tetánico, el toxoide pertúsico y una proteína de la bacteria *H. influenzae* tipo b.³⁴ La vacuna pentavalente acelular fue introducida en el Programa Nacional de Vacunación en el año 2007, buscando principalmente mejorar el cumplimiento del esquema de vacunación e impactar en la epidemiología de las enfermedades que previene.³⁵ De esta manera es que la vacuna pentavalente acelular es aplicada a bebés menores de un año y medio en cuatro dosis: a los dos, cuatro, seis y 18 meses; al tiempo que la vacuna contra la hepatitis B es administrada por separado.^{34,35} Actualmente en México, la Cartilla Nacional de Vacunación incluye protección contra la hepatitis B desde 2018 en la vacuna hexavalente, que también protege

además contra otras 5 enfermedades: difteria, tétanos, tos ferina, *Hi* tipo b y poliomielitis. Conforme al Esquema Nacional de Vacunación, todos los niños deben recibir la vacuna hexavalente, de forma gratuita en su centro de salud, a los 2, 4, 6 y 18 meses de edad.³⁶⁻³⁷

2.12 Epidemiología actual de *H. influenzae*

2.12.1. En el mundo

Actualmente Hib es la segunda causa de neumonía adquirida en el mundo según la OMS, se calcula que en 2015 la neumonía mató a unos 920,136 niños menores de 5 años, lo que supone el 15% de todas las defunciones de niños menores de 5 años en todo el mundo.^{2,4}

Cada año se producen por lo menos 3 millones de casos de enfermedades graves y unas 386,000 defunciones; la mayor parte de la morbilidad y la mortalidad debidas a Hib se registran en los países en desarrollo.³²

En las poblaciones no vacunadas contra Hib causa principalmente meningitis bacteriana durante el primer año de vida, incluso con un tratamiento antibiótico rápido y adecuado fallecen del 3 al 20% de los enfermos por meningitis debido a Hib. Cuando los recursos médicos son limitados, las tasas de letalidad de meningitis por Hib pueden ser mucho más elevadas y con frecuencia se observan secuelas neurológicas graves en los supervivientes hasta de un 30-40%.³²

En teoría, debido a que la vacuna es específica solo para el serotipo b, de los 6 serotipos existentes y de los no tipificables, se ha detectado una cierta tendencia al aumento del número de casos de *Hi* de otros serotipos tales como el *a*, *e* y *f*, y las cepas no tipificables (más frecuente en adultos mayores), pudiendo reemplazar el nicho de Hib.¹

En EU, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) en 2017, reportó una incidencia de enfermedades invasoras por *Hi* en menores de 5 años, donde 0.18 casos por 100,000 fueron causadas por Hib, 1.7 casos por 100,000 por *Hi* No b y 1.7 casos por 100,000 por HiNT. Actualmente HiNT, causa la mayoría de las enfermedades invasivas en todos los grupos de edad. Para el mismo año, la incidencia de la enfermedad invasora por HiNT fue de 6.2 casos por 100,000 en adultos mayores de 65 años. También causa del 30% al 52% de los episodios de otitis media aguda y sinusitis en niños, a pesar de que EU reporta una eficiencia del 99% de las vacunas conjugadas contra Hib.³⁷

Es así como, en la actualidad y desde la introducción de las vacunas conjugadas se observa un descenso de cerca de 90% de las enfermedades y muertes por el Hib, al igual que la colonización nasofaríngea por Hib también ha disminuido de manera considerable en las poblaciones con una amplia cobertura de inmunización contra la bacteria, lo cual se debe en parte, a la inmunidad de rebaño que confiere el uso de vacunas conjugadas contra el Hib.¹⁹

2.12.2 En México

Se ha reportado un promedio de 157,814 neumonías y bronconeumonías cada año, afectando principalmente a los grupos menores de 5 y mayores de 65 años, siendo Hib el segundo agente etiológico (1.5-14%) de las neumonías bacterianas.³⁹

A pesar de las estrategias de amplia cobertura en los programas de inmunización del país, la incidencia de infecciones causadas por *Hin* siguen latentes. La Dirección General de Epidemiología (DGE) reportó 35 casos de meningitis provocadas por *Hib* en el periodo 2013-2016 y en el 2018 reportó 34 casos de infecciones por *Hi*.⁵

En nuestro país, la vigilancia pasiva de bacterias causantes de enfermedades respiratorias a nivel de laboratorio se ha llevado a cabo por un grupo de investigadores del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) perteneciente al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), a través de una red de vigilancia donde participan varios países de Latinoamérica, así es como nace el proyecto del Sistema Regional de Vacunas (SIREVA) en 1994. A partir del año 2013, el INSP se independiza de la red SIREVA para formar el Grupo Interinstitucional para la Vigilancia de Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación (GIVEBPVac) con la participación y colaboración de diversos Institutos Nacionales y hospitales del país,

En nuestro país, además del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica, el Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) perteneciente al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), ha llevado a cabo la vigilancia pasiva de bacterias causantes de enfermedades respiratorias entre ellas *H. influenzae* a partir del 2010, a través de una red de vigilancia donde participan varios países de Latinoamérica, así es como nace el proyecto del Sistema Regional de Vacunas (SIREVA) en 1994.

En el 2018 GIVEBPVac reportó 29 casos de enfermedad, de los cuales al menos un caso fue ocasionado por los serotipos a y otro por serotipo f. Este último, ha sido reportado como causante de infecciones invasoras en algunos casos de endocarditis.⁴⁰

3. JUSTIFICACIÓN

En México las neumonías y bronconeumonías siguen siendo una de las complicaciones clínicas importantes cada año, afectando principalmente a los grupos menores de 5 y mayores de 65 años, donde Hib sigue siendo el segundo agente etiológico causante de neumonías bacterianas,³² además de la presencia del resto de serotipos no b de *Hi*, causante de importantes manifestaciones clínicas como la meningitis, sepsis, endocarditis, entre otras. Se considera de gran importancia llevar a cabo una vigilancia de la incidencia de Hib y del resto de serotipos no b, así como de *Hi* no tipificable, para monitorear y dar seguimiento a la distribución epidemiológica de Hib, vigilar cambios en la distribución de serotipos en la población, así como relacionar los serotipos que ahora prevalecen con el tipo de enfermedad que ocasionan, su distribución por edades y sobre todo monitorear la susceptibilidad antimicrobiana que presentan, siendo éstos datos de máxima relevancia para determinar el tratamiento adecuado de las enfermedades causadas por este microorganismo.

4. HIPÓTESIS

Las cepas de *H. influenzae* aisladas en el periodo de estudio 2019-2021, serán identificadas en mayor proporción como serotipos no b o no tipificables, capaces de causar enfermedad invasora en la población.

5. OBJETIVOS

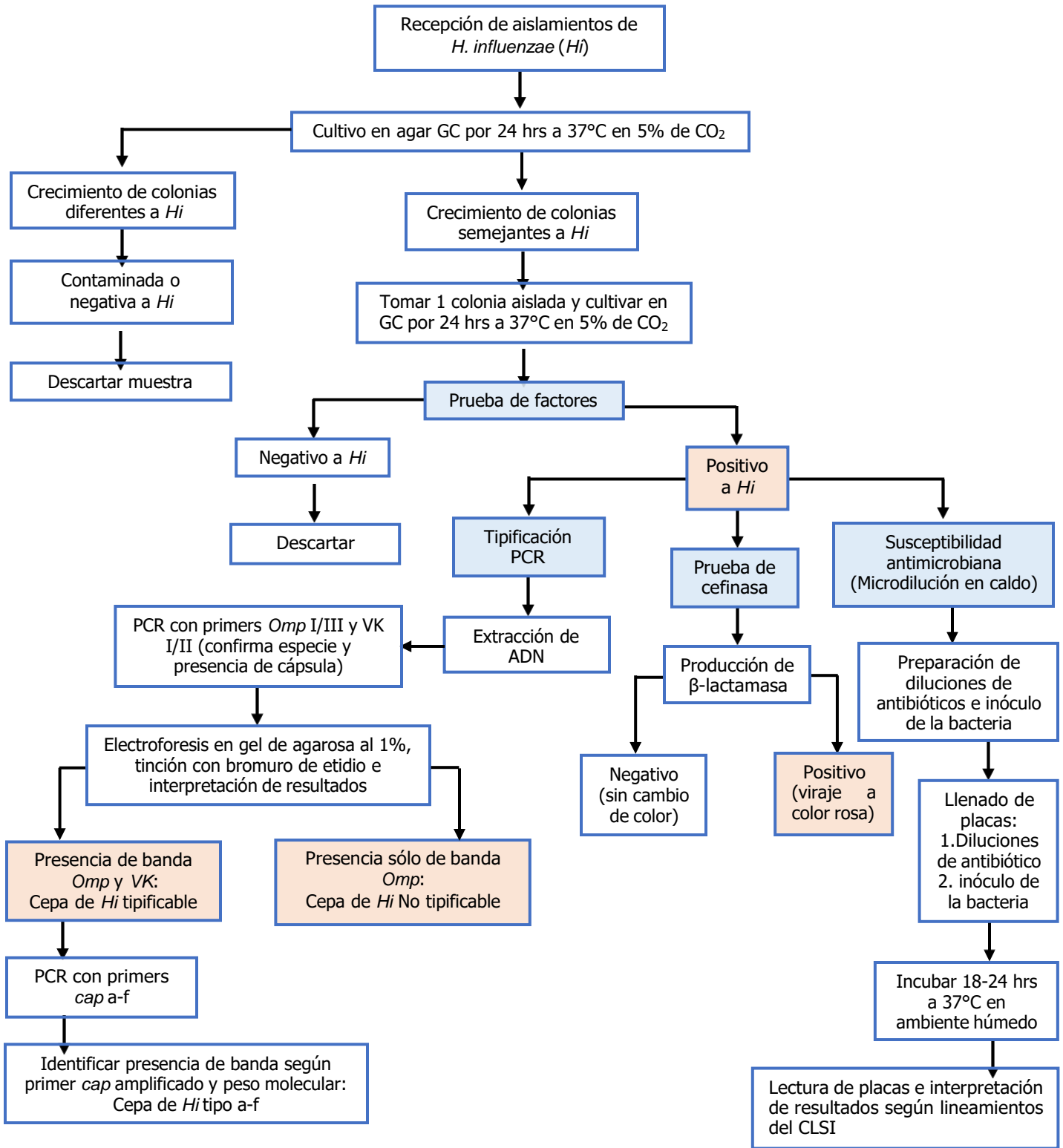
5.1 Generales

Analizar los serotipos de *Haemophilus influenzae* que circulan en población mexicana causantes de enfermedad, así como su susceptibilidad antimicrobiana y su relación con sus características clínicas y epidemiológicas, aisladas durante el periodo 2019-2021.

5.2 Específicos

- Describir las características clínicas y epidemiológicas de las cepas de *H. influenzae* aisladas durante el periodo 2019-2021.
- Identificar los serotipos de *H. influenzae* aislados durante el periodo de estudio.
- Determinar su susceptibilidad antimicrobiana a diferentes antibióticos.

Representación esquemática del procesamiento de las cepas de *Hi* para su identificación, tipificación y susceptibilidad antimicrobiana



6 MATERIAL Y METODOS

6.1 Tipo de estudio

Estudio de tipo descriptivo y observacional, que se realizó como parte de la vigilancia pasiva de los serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Hi* causante de enfermedad, con la colaboración de diversos hospitales de segundo y tercer nivel distribuidos en diferentes estados de la República Mexicana durante los años 2019-2021.

6.1 Población de estudio

En este estudio se incluyeron cepas de *Hi* aisladas a partir de muestras clínicas de pacientes enfermos tanto de niños y adultos atendidos en los hospitales participantes.

6.2 Obtención de cepas de *H. influenzae*

Las cepas de *Hi* se obtuvieron a partir de muestras clínicas como sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural, líquido articular, lavado pulmonar, aspirado bronquial y biopsia pulmonar de pacientes enfermos. Este procedimiento se realizó en cada uno de los hospitales participantes y una vez que identificaron un posible *Hi*, el personal de los hospitales como médicos, químicos o laboratoristas, se encargaron de enviar el aislado a través de un medio de transporte especial al laboratorio de referencia del CISEI del INSP en Cuernavaca, Morelos para su reidentificación.

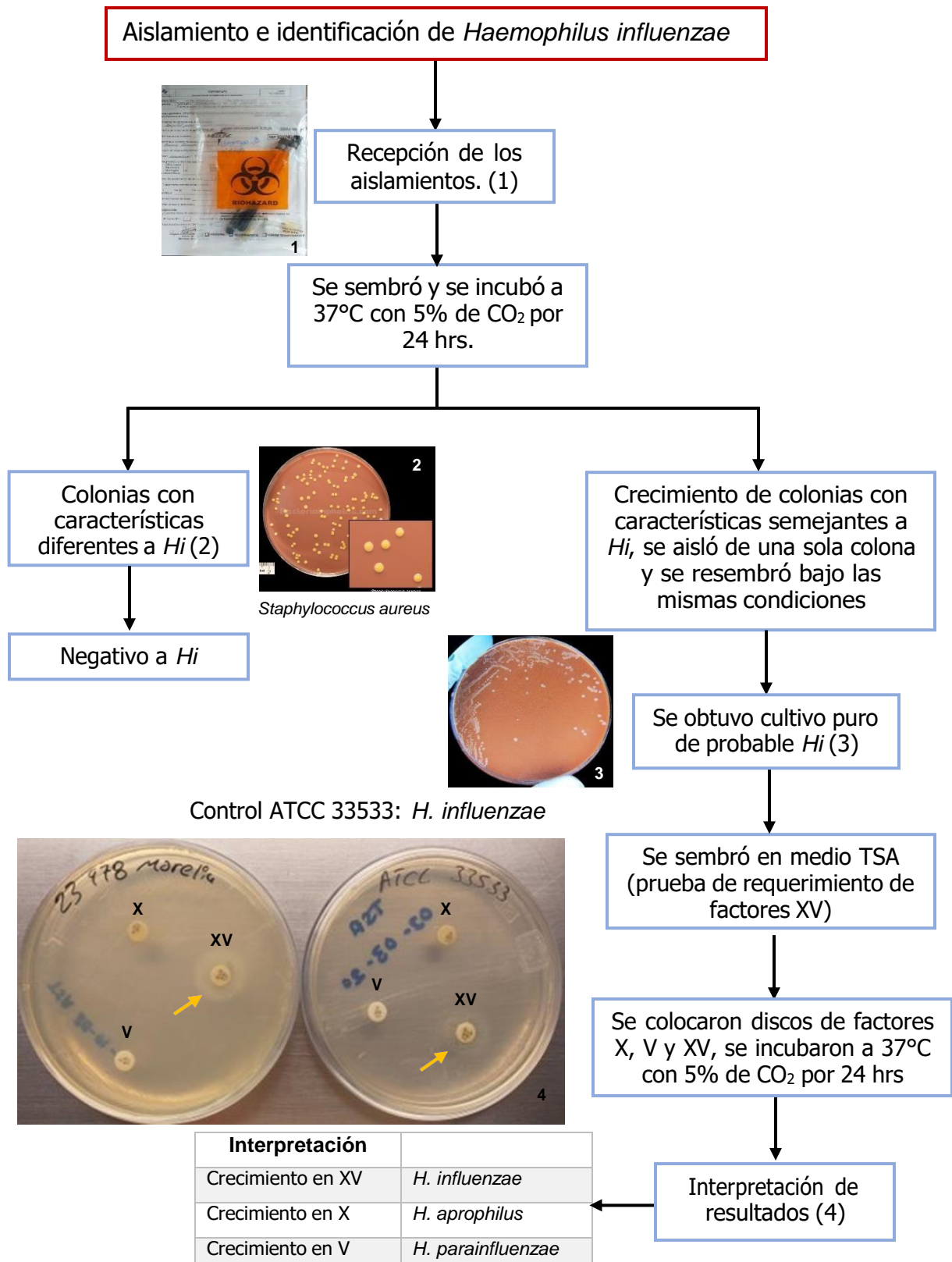
Junto con el aislado, se recibió un formato conteniendo los siguientes datos de la muestra: nombre del hospital de procedencia, número de muestra, fecha de aislamiento, sexo, edad, sitio de aislamiento y diagnóstico.

6.3 Transporte de *H. influenzae*

El medio de transporte utilizado para el envío de aislados de *Hi* al laboratorio de referencia fue el medio AMIES con carbón activado, ideal para el aislamiento de microorganismos fastidiosos.

A continuación, en los siguientes diagramas se esquematizan los diferentes procedimientos que se siguieron como parte de la metodología desarrollada para el aislamiento, identificación, tipificación y susceptibilidad antimicrobiana de *H. influenzae*.

6.4 Aislamiento e identificación de *Haemophilus influenzae*



La información detallada del aislamiento e identificación de *Hi* y de la preparación de los medios de cultivo ocupados en esta metodología, se describe en el anexo 1.

A continuación, se esquematiza el procedimiento que se siguió para llevar a cabo la tipificación de *H. influenzae*, el cual se dividió en dos etapas, en la en la etapa 1 se confirmó la especie de *Hi*, así como su habilidad de expresar la cápsula celular y en la etapa 2 se confirmó el tipo de *Hi* sólo cuando en la etapa 1 se observó presencia de cápsula:

6.5 Tipificación de *H. influenzae* etapa 1 (genes *Omp* y *VK*)

Los serotipos de *Hi* se identificaron por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), detectando la presencia de tres genes, cuyas secuencias se muestran en el anexo 1:

1. Un gen de la proteína de membrana externa *OmpP2* I/III el cual confirma la especie, aislamiento como *Hi*.
2. El gen *VanKetel* (VK) el cual detecta la habilidad de *Hi* de expresar la cápsula.
3. El gen *cap* el cual confirma el serotipo (a-f), [etapa 2].

Este procedimiento se realizó básicamente en cuatro etapas:

- Extracción de ADN
- PCR
- Electroforesis
- Coloración, fotografía y análisis de resultados

Tipificación de *H. influenzae* por PCR
etapa 1 (genes *Omp* y *VK*)

Detecta la presencia de dos genes:

1. Un gen de la proteína de membrana externa *Omp* confirma el aislamiento de *Hi*.
2. El gen *VanKeteI* (*VK*) detecta la presencia de cápsula (Presencia= tipificable. Ausencia= no tipificable)

Extracción del material genético

- Suspensión de *Hi* en agua estéril
- Ebullición por 10 min
- Centrifugar
- Sobrenadante
- Concentración de material genético 100ng/μl



Cepas control utilizadas:

- ATCC 49247: HiNT (banda de 1000pb, correspondiente al gen *Omp*)
- ATCC 10211: *Hi* tipificable (banda de 345pb, correspondiente al gen *VK*)
- ATCC 7901: *H. parainfluenzae* (sin amplificación)
- Muestra "blanco" C (-) (mezcla de los reactivos sin ADN)
- Se incluyó una muestra "blanco" que contenía solamente la mezcla de los reactivos sin ADN como control negativo de la reacción.

Rección de PCR *Omp* y *VK*
 (forward y reverse)

- 94° C 5 min (desnaturalización inicial)
- 94° C 1 min (desnaturalización)
- 55° C 1 min (alineamiento)
- 72° C 1 min (extensión) x 30 ciclos
- 72° C 8 min
- 4° C por tiempo indefinido

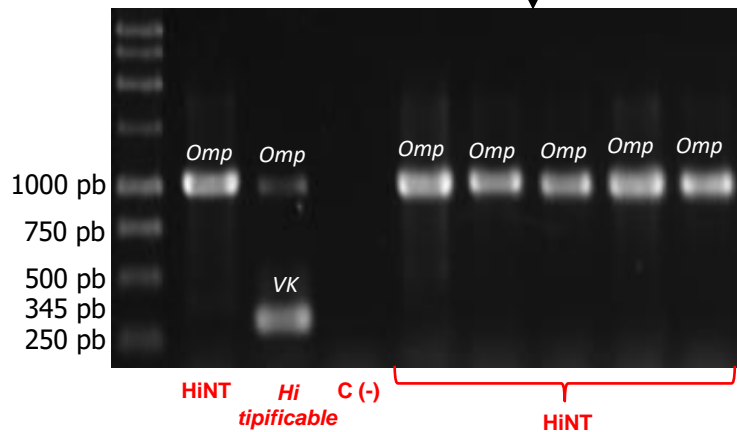
Electroforesis

- Gel de agarosa al 1%
- Buffer TBE 1x
- 100 volts por 1 hr



- Tinción con bromuro de etidio

Análisis de los resultados



La descripción detallada de la metodología para la tipificación de *Hi* por PCR, así como de la preparación de los reactivos y soluciones se describen en el anexo 2.

6.5.1 Tipificación de *H. influenzae* capsulados por PCR etapa 2 (genes *cap* a-f)

Si el producto amplificado correspondía a los pesos moleculares tanto de los genes *Omp* y *VK* probados, eso confirmaba la especie de *Hi* y que se trataba de una cepa tipificable (figura 3a), si no hubo producto amplificado con el gen *VK*, indicaba que la cepa era NT. Para cada cepa tipificable, se procedió a realizar otra PCR utilizando los primers *cap* forward (f) y reverse (r) para cada tipo conocido de *Hi* (a-f), mediante el protocolo del anexo 4.

El procedimiento se realizó básicamente en cuatro etapas:

- Extracción de ADN
- PCR
- Electroforesis
- Coloración, fotografía y análisis de resultados

En el siguiente diagrama se muestran los pasos que siguieron para llevar a cabo la etapa 2 de la tipificación de *Hi*, donde los aislamientos que se identificaron como *Hi* con la expresión de una capsula celular en la etapa 1, se sometieron a este procedimiento para la identificación del tipo capsular que poseen (tipificación a-f):

Tipificación de *H. influenzae* capsulados por PCR
etapa 2 (genes *cap* a-f)

Detecta la presencia del gen *cap*
 1. El gen *cap* confirma el serotipo (a-f)

Extracción del material genético

- Suspensión y reHI en agua
- Esterilización
- Centrifugación
- Sobrenadante
- Concentración de material genético



Reacción de PCR
cap a-f
 (forward y reverse)

- 94° C 5 min (desnaturalización inicial)
- 94° C 1 min (desnaturalización)
- 55° C 1 min (alineamiento)
- 72° C 1 min (extensión) x 30 ciclos
- 72° C 8 min
- 4° C por tiempo indefinido

Electroforesis

- Gel de agarosa al 1%
- Buffer TBE 1x
- 100 volts por 1 hr



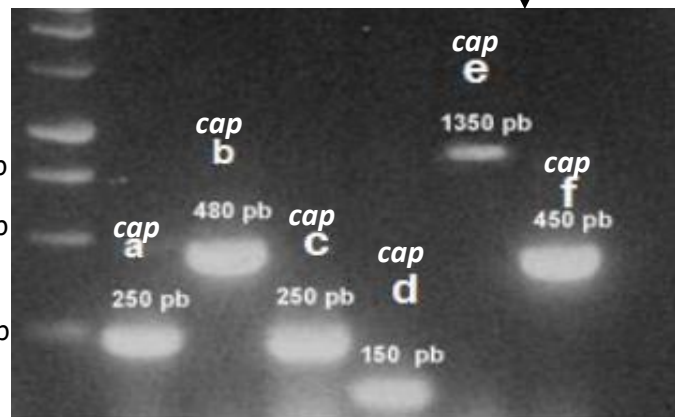
- Tinción con bromuro de etidio.

Análisis de los resultados

Cepas control utilizadas:
 ADN de cada uno de los serotipos conocidos de *Hi*:

- ATCC 9006 (a)
- ATCC 10211 (b)
- ATCC 9007 (c)
- ATCC 9008 (d)
- ATCC 8142 (e)
- ATCC 9833 (f)
- Muestra "blanco" C(-) (mezcla de los reactivos sin ADN)

1000 pb
 500 pb
 250 pb



La descripción detallada de la metodología para la tipificación de *Hi* por PCR, así como de la preparación de los reactivos y soluciones se describen en el anexo 2.

6.5.2 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Producción de β -lactamasa

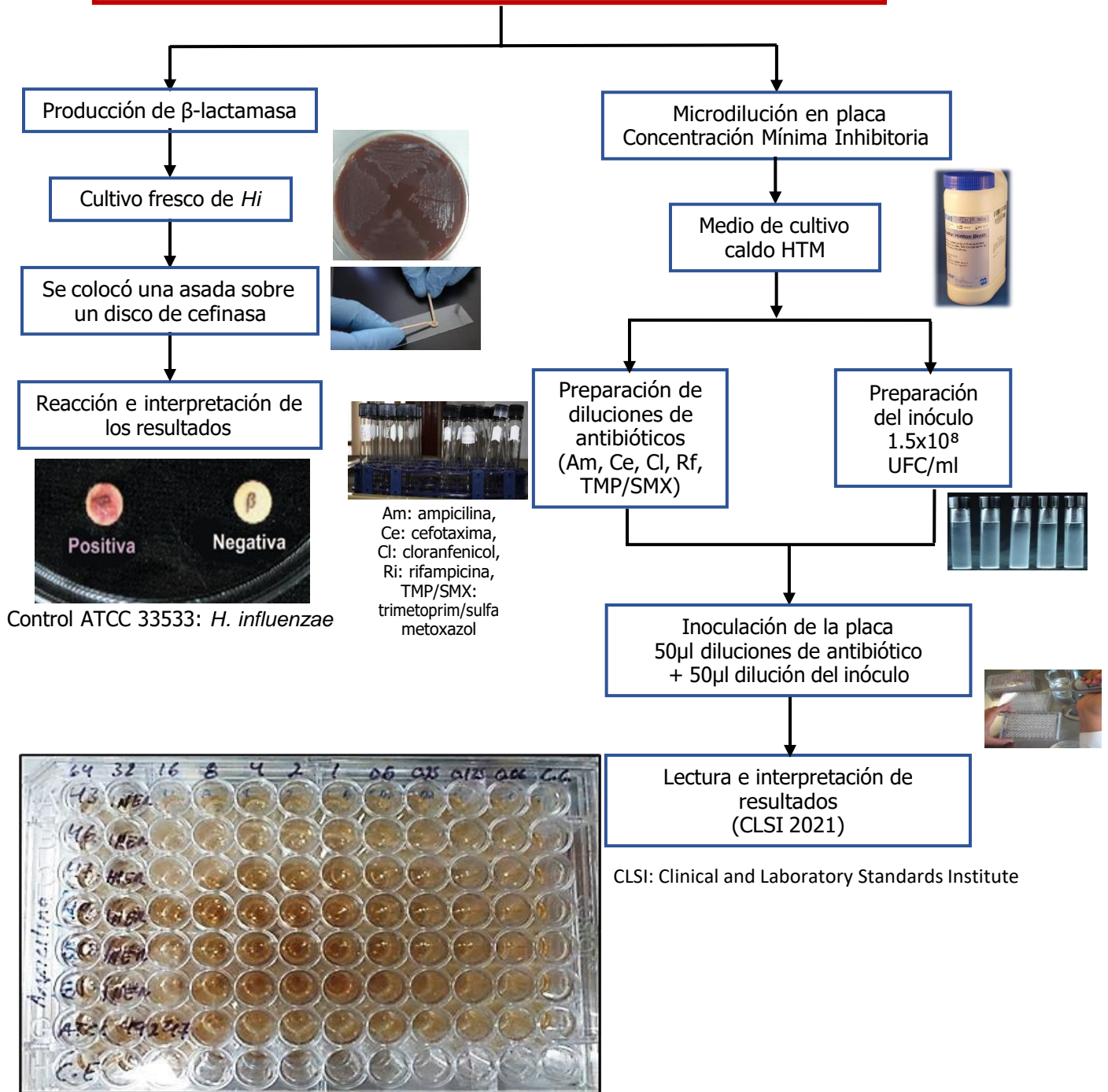
La prueba para demostrar la producción de β -lactamasa se realizó mediante el método de cefinasa, utilizando discos de papel filtro impregnado con el reactivo de cefinasa BBL[®].

Concentración mínima inhibitoria

La microdilución en placa es el método que se utilizó para determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) del antibiótico frente a un *Hi* aislado, de acuerdo con los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁴⁰

En el siguiente diagrama se explican los pasos que se llevaron a cabo para la susceptibilidad antimicrobiana mediante dos metodologías distintas, la primera corresponde a la producción de la enzima β -lactamasa y la segunda a la determinación de la CIM mediante la microdilución en caldo:

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA



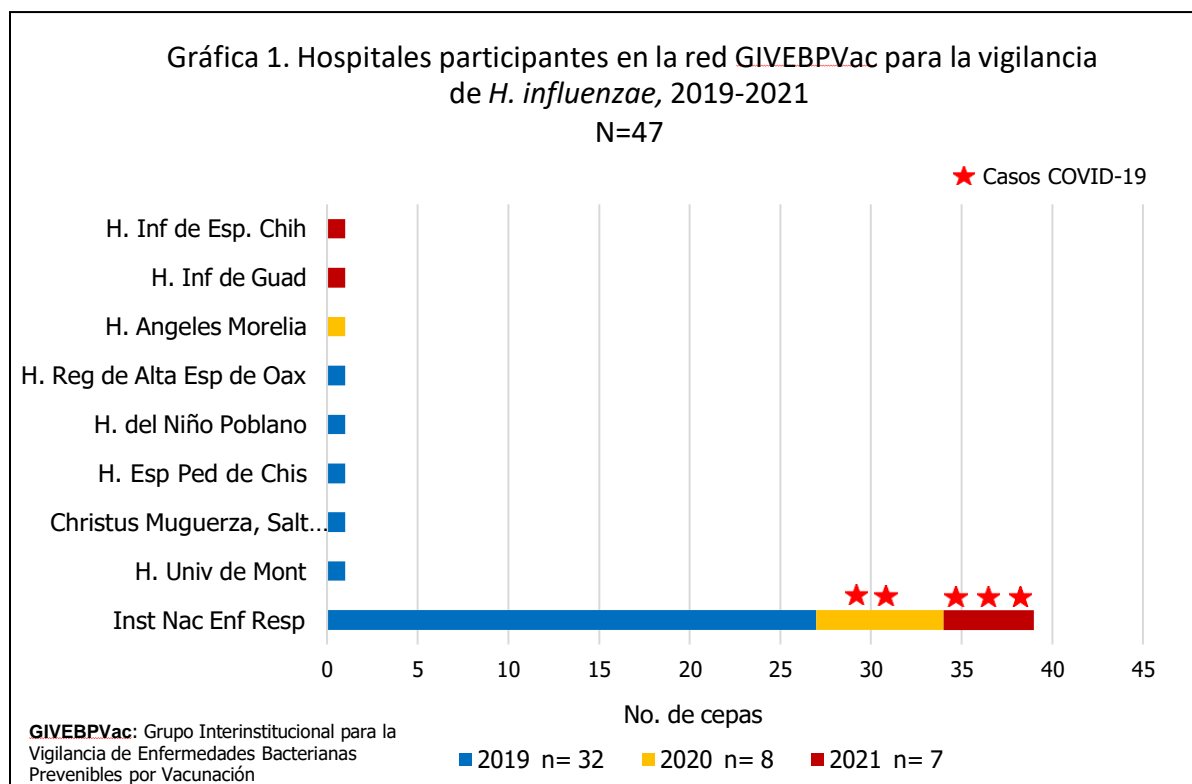
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

La descripción detallada de la preparación de las soluciones, medios de cultivo y procedimiento de la metodología, se muestran en el anexo 3.

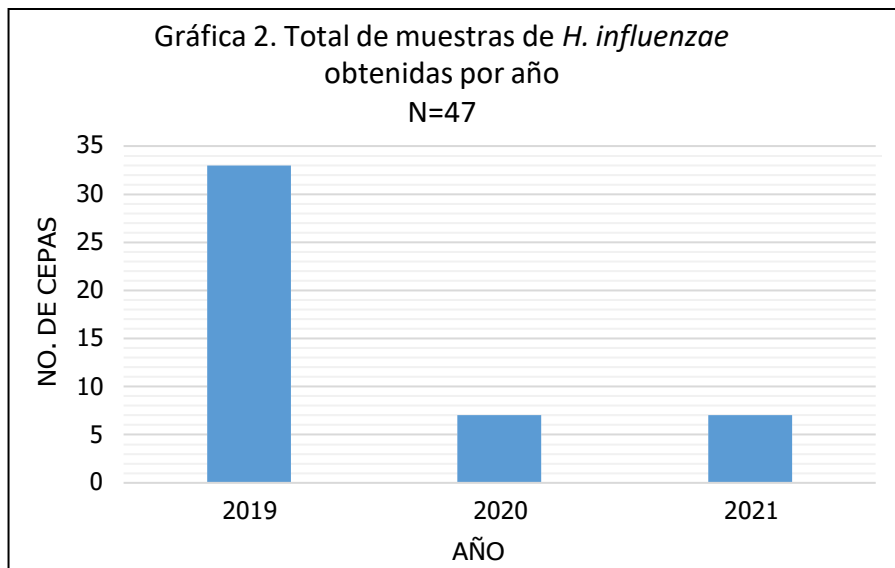
7 RESULTADOS

7.1 Características clínicas y epidemiológicas de *H. influenzae*

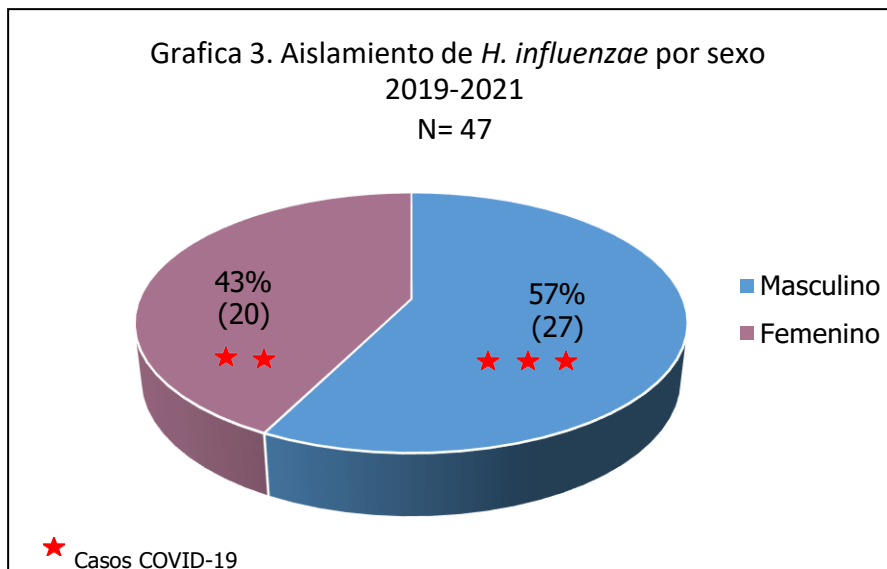
Durante el periodo de estudio (2019-2021) se obtuvieron 47 cepas de *Hin*, provenientes de muestras clínicas obtenidas de los siguientes hospitales: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) con 39 (83%) cepas, Hospital Universitario de Monterrey, Hospital Cristus Muguerza de Saltillo Coahuila, Hospital Ángeles de Morelia Michoacán, Hospital Chiapas nos une "Dr. Jesús Gilberto Gómez Meza", Hospital Infantil de Especialidades de Chihuahua, Chihuahua, Hospital Infantil de Guadalajara Jalisco, Hospital para el Niño Poblano en San Andrés Cholula Puebla y el Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca en San Bartolo Coyotepec Oaxaca, de los cuales se logró obtener sólo una muestra clínica de cada uno, con un total de 8 muestras representando un 17% (Gráfica 1).



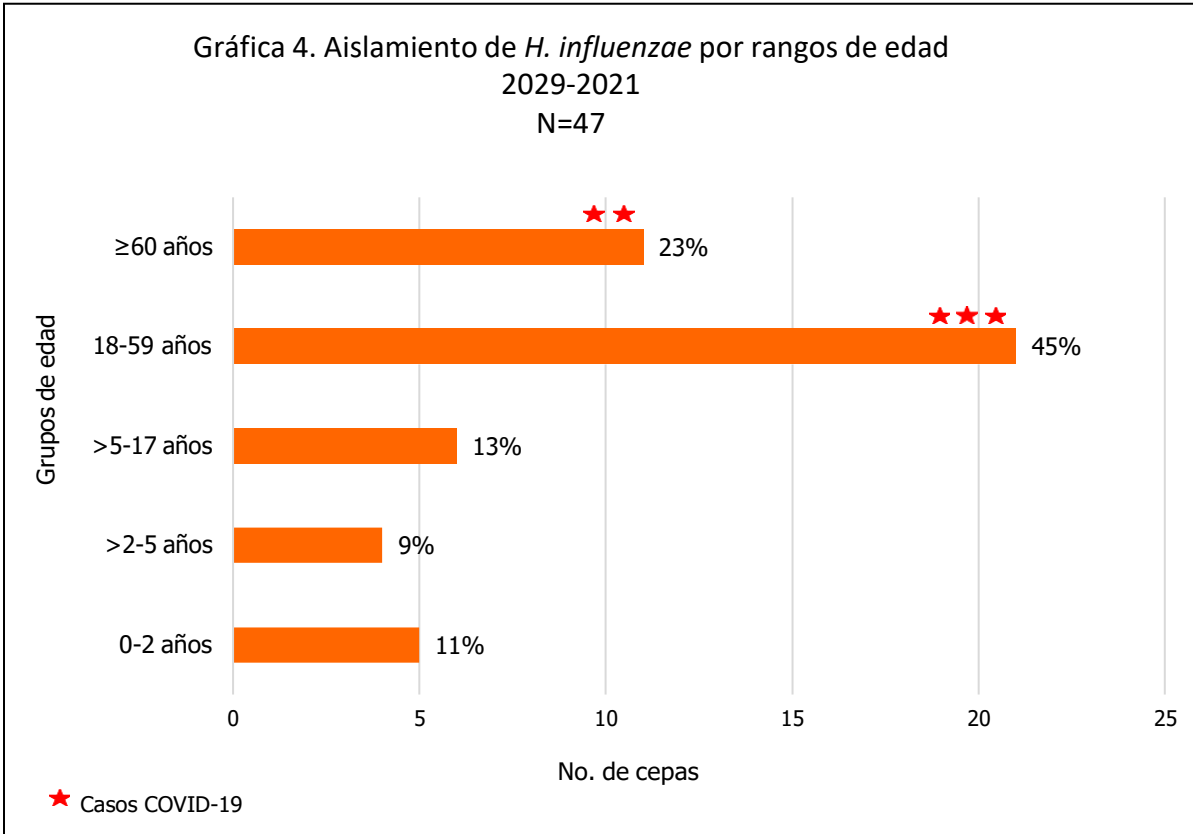
En el año 2019 se recolectaron 33 muestras (70.2%), en el año 2020 y 2021 se obtuvieron 7 (14.9%) muestras para cada año respectivamente (Gráfica 2).



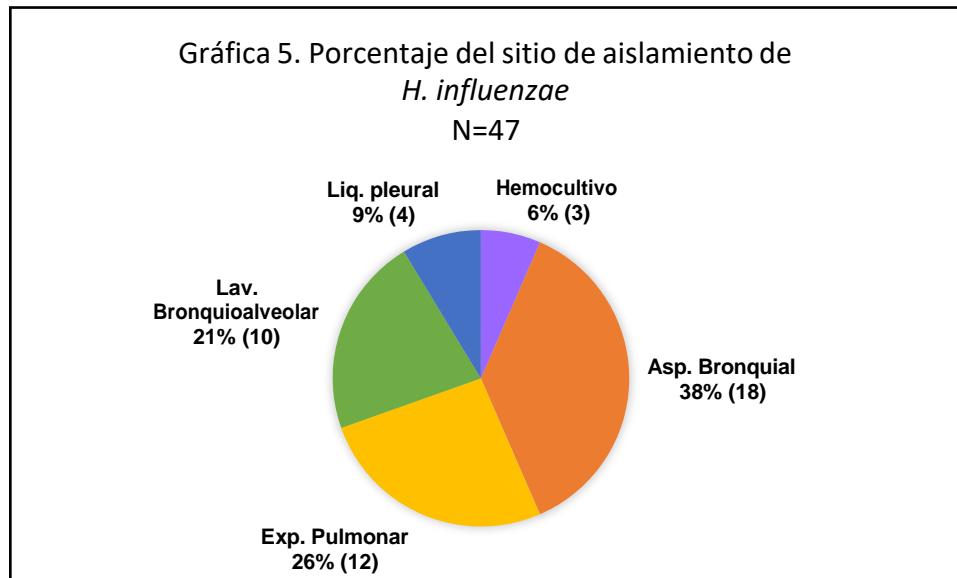
Del total de muestras obtenidas durante el periodo de estudio se observó que el 57% (27) correspondió a pacientes de sexo masculino y 43% (20) al sexo femenino (Gráfica 3).



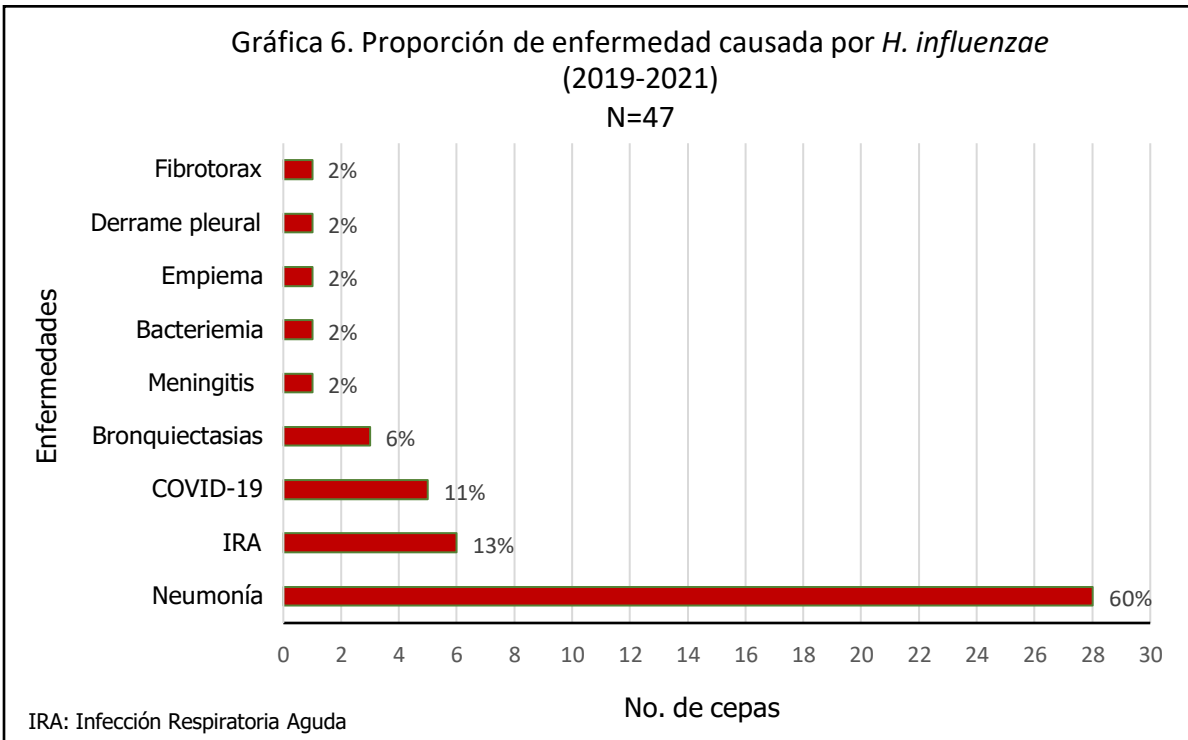
Con respecto a la edad, se obtuvo una mayor frecuencia de enfermedad en adultos entre 18 a 59 años con 21 (44.6%) casos, en los mayores de 60 años se presentaron 11 (23.9%) casos y en los menores de 2 años 5 (10.8%) casos (Gráfica 4).



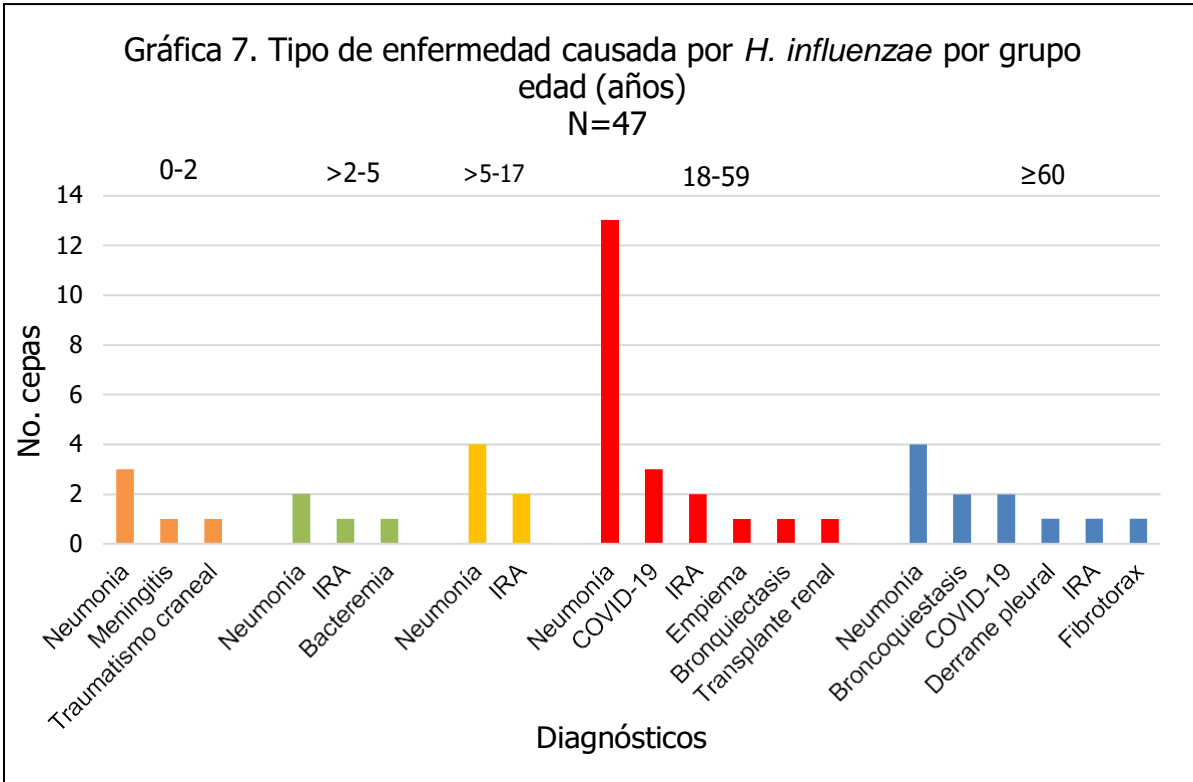
El aislamiento de *Hin* se obtuvo en un 38% (18) a partir de secreción bronquial, 26% (12) de secreciones pulmonares como esputo, moco, flema, etc; de muestras de tejido pulmonar con un 21% (10), y de sitios normalmente estériles como liquido pleural y sangre en un 9% (4) y 6% (3) respectivamente (Gráfica 5).



La figura 6 muestra los diferentes diagnósticos de enfermedad, obteniendo 28 (60%) casos de neumonía, seguido por infección respiratoria aguda con 6 casos (13%) y 5 (11%) casos de COVID-19 principalmente (Gráfica 6).



Al comparar el tipo de diagnóstico con respecto al rango de edad, se observó que la neumonía se presenta en todos los grupos de edad con una incidencia siendo el grupo >18-59 años con mayor número de casos 13 (30%) (Gráfica 7).



7.2 Tipificación de las cepas de *H. influenzae*

De las 47 cepas identificadas inicialmente como *Hi* por requerimiento de los factores X y V, el 100% fueron confirmadas por PCR como *Hi*, obteniendo 45 (95.7%) de las cepas como no tipificables (HiNT) y solo 2 (4.3%) tipificables.

La figura 6 muestra el patrón de bandeado correspondiente al producto de PCR probando los genes *Omp* que confirmaron la especie (*Hi*) con un producto de 1000 pb y *VK* que indica si se trataba de una cepa tipificable o no tipificable al estar presente o ausente respectivamente, con un producto de 345 pb.

Se puede observar que todas las cepas analizadas en este gel correspondieron a HiNT.

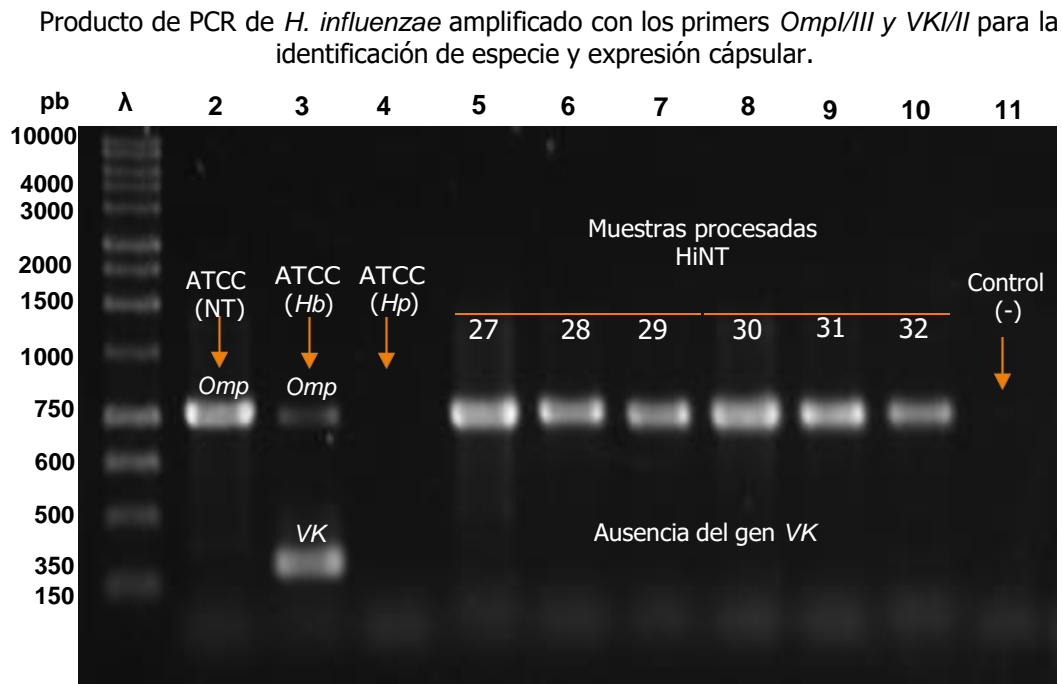


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa; Línea 1. marcador de PM (λ) 1 Kb, línea 2. control ATCC (NT), línea 3. control ATCC tipificable (Hb), línea 4. Control ATCC negativo *H. parainfluenzae* (Hp), líneas 5-10. muestras 27-32 INER No Tipificables y línea 11. Control negativo (c -).

La figura 7 muestra el gel de electroforesis correspondiente a los productos de PCR probando los genes *cap* a-f para la tipificación de las 2 cepas que se identificaron como tipificables, resultando ambas al serotipo *a* (línea 8 y 14).

Producto de PCR de *H. influenzae* capsulado amplificado con los primers *Cap* a-f para la identificación del tipo capsular.

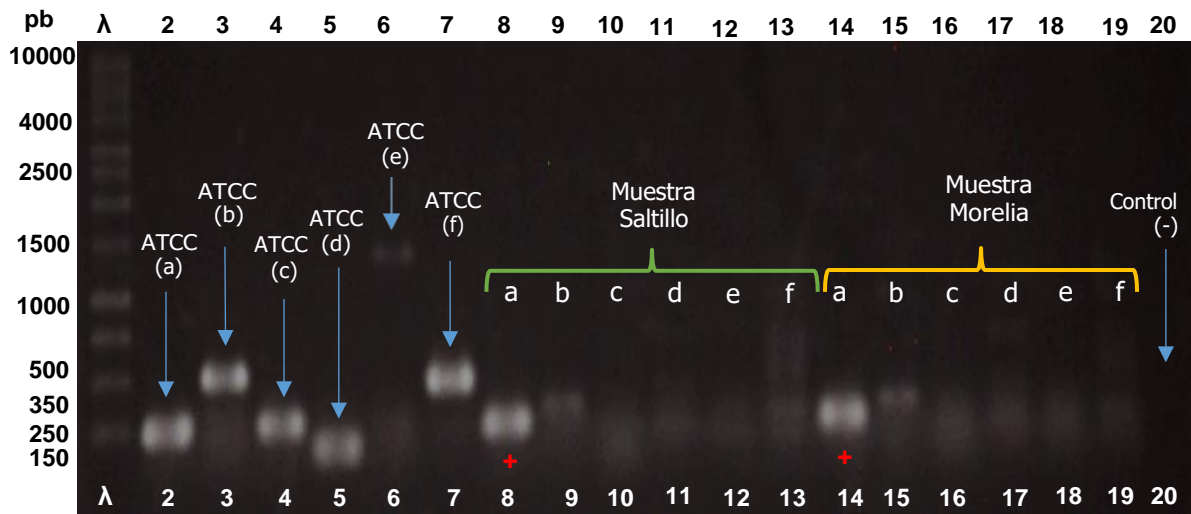


Figura 7. Patrón de bandeo de las cepas de *Hi* tipificables: línea 1. Marcador de PM (λ) 1 Kb; línea 2. ATCC 9006 (a), línea 3. ATCC10211 (b), línea 4. ATCC 9007 (c), línea 5. ATCC 9008 (d), línea 6 ATCC 8142 (e), línea 7. ATCC 9833 (f), líneas 8-13. cepa 1 Saltillo tipo a-f, líneas 14-19. Cepa 5 Morelia tipo a-f, línea 20. Control negativo (c-).

7.3 Susceptibilidad antimicrobiana de *H. influenzae*

La figura 8 muestra la determinación de la producción de β -lactamasa en discos de cefinasa, la gráfica 9 muestra el número de cepas de *Hi* productoras de β -lactamasa, obteniendo un 28% (13) de muestras positivas.

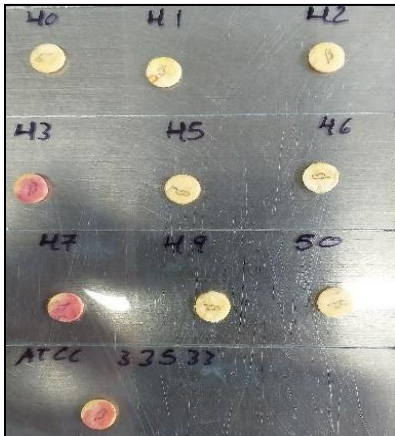
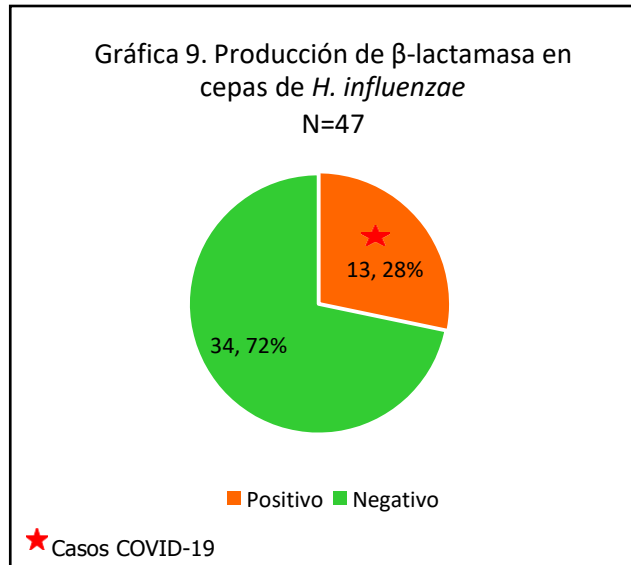
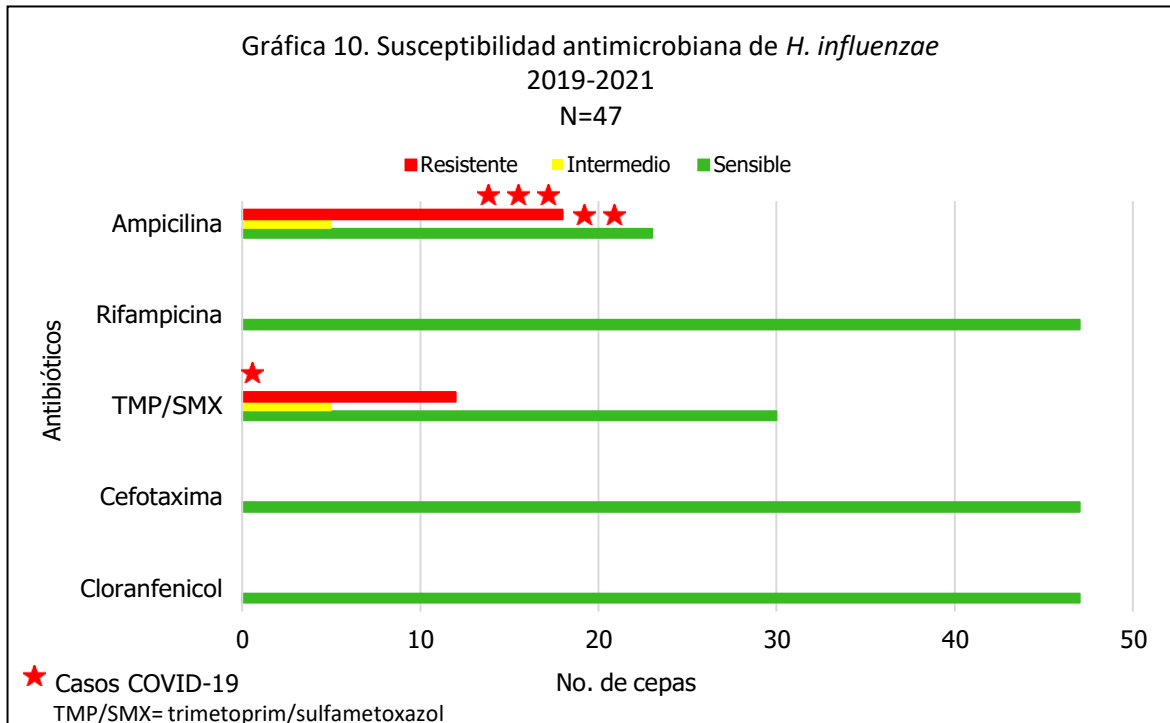


Figura 8: Prueba de β -lactamasa. Reacción positiva, el color del disco de cefinasa vira de incoloro a rosado. Reacción negativa, el disco no vira de color al estar en contacto con la muestra.



Con la prueba de microdilución en placa se obtuvo un 49% (28) de cepas con susceptibilidad disminuida a ampicilina, de las cuales el 46.4% (13) fueron productoras de β -lactamasa principalmente en aquellas cepas cuyo punto de corte fue mayor a 8 $\mu\text{g/ml}$, y un 36.2% (17) a TMP/SMX, el 100% de las cepas fueron sensibles a cefotaxima, cloranfenicol y rifampicina (Gráfica 10).



Las cepas HiNT presentan 53% de susceptibilidad disminuida a la ampicilina, mientras que las pertenecientes al serotipo *a* presentan susceptibilidad a todos los antibióticos probados.

Las tablas 6 y 7 muestran la relación de HiNT y *Hi* tipo *a* con el tipo de enfermedad que ocasionaron y susceptibilidad a ampicilina, producción de β -lactamasa y susceptibilidad a TMP/SMX por grupo de edad, en número de casos.

Tabla 6.

Relación de <i>Hi</i> serotipo NT con tipo de enfermedad, producción de β -lactamasa y susceptibilidad antimicrobiana de acuerdo con el grupo de edad.									
Grupo de edad	Total: HiNT	EI/ENI	Ampicilina			β -lactamasa		TMP/SMX	
			S	I	R	BLNAR	BLPAR	S	SD
<5 años	7	1/6	3	1	3	4	3	5	2
5-18 años	6	0/6	4	1	1	5	1	5	1
18-59 años	21	3/18	9	2	10	15	6	11	10
≥ 60 años	11	1/10	5	2	4	8	3	7	4

Tabla 7.

Relación de <i>Hi</i> serotipo <i>a</i> con tipo de enfermedad, producción de β -lactamasa y susceptibilidad antimicrobiana de acuerdo con el grupo de edad.									
Grupo de edad	Total: Hia	EI/ENI	Ampicilina			β -lactamasa		TMP/SMX	
			S	I	R	BLNAR	BLPAR	S	SD
<5 años	2	2/0	2	0	0	2	0	2	0

8 DISCUSIÓN

Aspectos clínicos

En el presente estudio se puede observar, aun cuando el número de muestras obtenidas en esta vigilancia fue muy bajo sobre todo en los últimos dos años, que *H. influenzae* sigue presente en nuestra población como causante de enfermedad tanto en población pediátrica como en adultos, durante los años 2019-2021.

La mayor frecuencia de aislamiento se obtuvo en adultos mayores de 18 a 50 años, sin embargo, este dato puede presentar algún sesgo ya que el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias fue quien proporciono el mayor número de aislamientos, donde la mayor proporción de sus pacientes son adultos.

Actualmente la OPS considera a *H. influenzae* dentro de las tres bacterias más importantes causantes de neumonía y meningitis bacteriana afectando principalmente a los menores de entre 6 a 12 meses de edad.⁴¹ Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la principal enfermedad ocasionada por este microorganismo fue neumonía sobre todo en pacientes adultos, seguido de infección respiratoria aguda e infección por COVID-19. Cabe mencionar la importancia que tiene la presencia de esta última enfermedad en los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que estos casos de COVID-19 relacionados con el aislamiento de *H. influenzae*, se observan por primera vez en esta vigilancia de la red GIVEBPVac en nuestro país, debido a la pandemia ocasionada en estos últimos dos años por el virus SARS-CoV-2,⁴² esto muestra la asociación que puede existir entre bacterias causantes de enfermedades respiratorias como es *H. influenzae* y el virus SARS-CoV-2, en donde se observa afectando a adultos entre 50 y 60 años principalmente. En un estudio realizado por Zhu y cols. en 2020, reportaron la asociación bacteriana como la más dominante entre pacientes con COVID-19, encontrando a *H. influenzae* en un 40% de los casos estudiados, ocupando el tercer lugar de co-existencia con el virus, después de *S. pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae* de 24 patógenos respiratorios identificados en su estudio.⁴³

Identificación de serotipos

Con respecto a los tipos capsulares identificados, se obtuvo que más del 90% de los aislamientos correspondió a *H. influenzae* no tipificable, seguido por la presencia del serotipo *a* en menor proporción. Se ha considerado que las cepas capsuladas y no capsuladas pueden ser potencialmente patógenas para el humano, pero difieren en su virulencia y mecanismos de patogenicidad, observando que el serotipo *b* (Hib) es más patógeno y más virulento, seguido del serotipo *a* (Hia) que afecta principalmente a niños menores de 2 años⁴¹, esto coincide con lo obtenido en nuestro estudio donde HiNT fue causante principalmente de enfermedad no invasora y solo el 11% como causante de enfermedad invasora, mientras *H. influenzae* serotipo *a* estuvo presente en dos casos correspondientes a niños menores de 5 años ocasionando en ambos enfermedad invasiva. Estos datos también se asemejan a los obtenidos por la Agencia de Salud Pública de Canadá en el 2020, donde informan que en estudios realizados en EE. UU. y Canadá, se encontró con mayor frecuencia HiNT, seguida de Hif y Hia, pero este último más prevalente en niños menores de 5 años y que ha ido en aumento constante desde 2002 al 2017 y lo cual difiere en otros países de Latinoamérica donde la incidencia de Hib sigue presente, seguida de Hia y Hif.¹⁸ En nuestro estudio, la tipificación capsular se determinó mediante la técnica molecular de PCR, técnica que ha sido implementada poco a poco en el laboratorio la cual brinda mayor credibilidad como lo sugieren y lo implementan actualmente cada vez más diversos sistemas de vigilancia, a diferencia del uso de sueros como se sigue realizando en distintos países de Sudamérica y con los cuales se llega a presentar dificultades en su determinación.¹⁸ Esta técnica, nos confirmó primeramente la especie de *Hi* al 100%, determinada inicialmente por la prueba de factores, así como la certeza en el serotipo obtenido.

Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad de *H. influenzae* a los antibióticos probados demostró que 50% de nuestras cepas de HiNT presentaron una susceptibilidad disminuida a ampicilina, y de estas 46% fueron productoras de β -lactamasa, observando la producción de esta enzima sólo en aquellas cepas resistentes a ampicilina, pero con una CIM mayor a 8 $\mu\text{g/ml}$, a lo que se consideran cepas con fenotipo BLPAR que al parecer está asociado con valores altos de CIM para ampicilina. Datos obtenidos en un estudio realizado en Paraguay durante 1999-2017, se observó que solo el 13% de 523 cepas estudiadas fueron BLPAR con susceptibilidad disminuida a ampicilina.⁴⁴ Contrario a esto sucede en un estudio realizado en Tokio Japón donde las cepas de *H. influenzae* resistentes a la ampicilina no productoras de β -lactamasa (BLNAR) aumentaron significativamente y representaron más del 50 % de todos los aislamientos desde 2014, donde se tomó como criterio presentar una CIM $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ a ampicilina (punto de corte AMP $\leq 1 \mu\text{g/ml}$) y β -lactamasa negativa.⁴⁵

Diversos autores sugieren realizar siempre, además del antibiograma convencional implementado en cada laboratorio, la prueba cromogénica de la cefinasa para la caracterización de las cepas productoras de β -lactamasa⁴⁶, siendo esto una característica importante a estudiar. Sin embargo, el número total de incidencias reportadas de resistencia a antibióticos por *Hi* va en aumento tanto por el propio aumento de cepas productoras de β -lactamasa, como en el aumento en la vigilancia de este microorganismo según S. Wen *et. al.*, 2020⁴⁷, donde incluyó a *Hi* en la lista de bacterias de prioridad resistentes a los antibióticos publicados recientemente por la OMS.

Además de la ampicilina, HiNT mostró susceptibilidad disminuida a TMP/SMX en menor proporción y sensibilidad a cefotaxima, rifampicina y cloranfenicol; mientras que *H. influenzae* tipo a mostró sensibilidad a todos los antibióticos probados.

Del total de las cepas estudiadas solo 7 cepas se encontraron produciendo enfermedad invasora y dentro de estas, la neumonía fue de mayor frecuencia, seguida de bacteriemia y meningitis provocadas tanto por HiNT y Hia, lo cual demuestra la disminución o casi desaparición de las enfermedades invasoras por Hib en nuestro estudio, esto difiere de lo que sucede en otras naciones como Uruguay o Argentina que a pesar de tener una mayor cobertura de vacunación contra Hib, las incidencias de enfermedades invasivas por este serotipo siguen en aumento después de la introducción de la vacuna contra Hib en esos países.¹⁸

9 CONCLUSIÓN

La presencia de las incidencias de *Hi* como agente causal de infecciones invasivas y no invasivas, sigue presente y se reafirmó que dichas incidencias fueron provocadas por serotipos no b y no tipificables durante el periodo 2019-2021.

La prevalencia de las infecciones por *Hi* puede variar entre naciones, en nuestra población estudiada, se observa que infecciones por *Hi* sigue presente en todos los rangos de edad, pero las enfermedades invasivas se produjeron en menores de 5 y en los mayores de 60 años, sin embargo, cabe resaltar que en nuestro periodo de estudio 2019-2021 los mayores de 18 a 59 fue la de mayor incidencia, por lo que sugiere que dicha población forma parte de los grupos de mayor riesgo en nuestro país.

La incidencia de Hib en nuestra población si disminuyó y en nuestro estudio fue inexistente la presencia de infecciones por Hib, lo cual se dio desde el inicio de la vacunación en 1999 en nuestro país.

La vigilancia de *Hi* sigue siendo importante en los estudios de investigación dentro de las bacterias causantes de enfermedad, dado al aumento de incidencias en la susceptibilidad disminuida sobre todo a ampicilina, principalmente a los utilizados en la primera línea del tratamiento.

10 . PERSPECTIVAS

Lograr que en los estudios por venir se pueda ampliar la participación de instituciones médicas tanto públicas y del sector privado para tener una mayor representación en el territorio nacional y para aumentar el número de muestras a estudiar que puedan ser representativos, incluso como datos oficiales en nuestro país.

Realizar el seguimiento de este tipo de estudio con técnicas moleculares, de vanguardia y actualizados que brinden mayor confiabilidad en los resultados a obtener.

Difundir los resultados obtenidos de la vigilancia de *Hi* al sector especializado, pero sobre todo a los representantes del sector de salud que puedan llevar a cabo estudios enfocados para tomar las decisiones correctas en la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por *Hi*.

11. LIMITACIONES

Al efectuar el presente estudio, se encontraron distintas limitaciones que pudieron enriquecer más la información recopilada y obtenida, tal fue el caso de la actual pandemia que se vive en el mundo, por lo cual debido a la gravedad de la enfermedad provocada por el coronavirus SARS-CoV-2 las instituciones médicas se vieron en la necesidad de concentrarse y brindar exclusiva prioridad a la atención de esta, provocando distintos cambios en sus actividades de rutina, como se refleja en la baja recepción de muestras por infecciones por *Hi* que eran enviadas a nuestro laboratorio para su estudio. Hospitales regionales o estatales, posiblemente no recopilaban muestras positivas a *Hi* lo cual provocó que solo un hospital representara la mayoría de las muestras estudiadas en el periodo 2019-2021.

La susceptibilidad antimicrobiana es una técnica de relevancia debido a la actual problemática en el aumento de bacteria multiresistentes a antibióticos, sin embargo, en nuestro estudio se limitó a exponer nuestras cepas a tan solo 5 antibióticos presentes a un grupo limitado de antibióticos, pero principalmente en el uso de primera línea para el tratamiento de infecciones por *Hi*, lo cual no podemos describir un aumento en la resistencia o multiresistencia en nuestras cepas estudiadas.

12. ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento e Identificación de *H. influenzae* y preparación de medios de cultivo.

► Aislamiento de *H. influenzae*

Una vez recibidos los aislados de *Hi* en el laboratorio del CISEI, se procedió a realizar nuevamente el aislamiento e identificación de cada uno de ellos, con la finalidad de confirmar la especie de *Hi* a partir del crecimiento de la bacteria en el medio de cultivo agar chocolate, para lo cual se sembró el aislado contenido en el medio AMIES en una placa de agar chocolate suplementado con una solución de polienriquecimiento y se incubó a 37°C en 5% de CO₂ por 18-24 h. Después de este tiempo, se aisló a partir de una sola colonia y se realizó otra resiembra para posteriormente realizar las pruebas de identificación. Cuando hubo presencia de contaminación o de otras colonias diferentes a las de *Hi*, además de colonias macroscópicamente semejantes a *Hi*, se realizó el aislamiento tomando cuidadosamente una sola colonia sospechosa de *Hi*, se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones y después de las 18-24 h si el crecimiento se observó puro, se procedió a realizar las pruebas de identificación.

► Identificación de *H. influenzae*

Determinación de requerimiento de factor X, V y XV

Esta prueba se realizó utilizando discos de papel filtro impregnados con los factores X, V y XV mediante los siguientes pasos:¹⁶

- 1 A partir de un cultivo puro de *Hi* de 18 a 24 horas de incubación, se preparó una suspensión de la bacteria a una escala 0.5 de McFarland (2×10^8 UFC/ml) en 3 ml de caldo cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés).
- 2 La suspensión bacteriana se inoculó con un hisopo sobre una placa de agar soya tripticasa (TSA), estriando de manera muy cerrada y uniforme, y en tres direcciones de lado a lado (siembra masiva).
- 3 Se colocaron los discos de los factores X, V y XV sobre el agar inoculado
- 4 Se incubó la placa a 37°C con 5% de CO₂ durante 24hrs.

- 5 Posteriormente se observó la superficie del medio para verificar el desarrollo visible de colonias alrededor de las tiras o discos (Figura 4).
- 6 Interpretación:

Si solo crece alrededor de los factores XV: *H. influenzae*

Si solo crece alrededor del factor X: *H. arophilus*

Si solo crece alrededor del factor V: *H. parainfluenzae*

Cepas control:

Control positivo: *Hi* ATCC 33533

Control negativo: *H. parainfluenzae* ATCC 7901

► Preparación de medios de cultivo

- Agar Chocolate suplementado con Hemoglobina

Composición del medio de cultivo

- Base de agar GC 18g
- Hemoglobina 5g
- Suplemento XV Difco™ 10ml
- Agua destilada 500ml

Se prepara el agar chocolate y se pone a esterilizar al igual que la hemoglobina en autoclave a 121°C por 15 min, de esta forma se libera el factor X (hemina). Una vez enfriado dichas soluciones, mezclar ambas soluciones y adicionar el suplemento nutritivo XV BD Difco™ reconstituido previamente.

- Agar de soya tríptica

Composición del medio de cultivo

- Base agar de soya tríptica 20g
- Agua destilada 500ml

El uso de este medio en microbiología clínica es limitado, dado que no favorece el crecimiento de una variedad de bacterias exigentes. Sin embargo, dado que el agar de soja tríptico no contiene los factores de crecimientos X y V, puede ser utilizado para la determinación de requisitos de estos factores de crecimiento por los aislados de las especies *Haemophilus* mediante la adición de tiras de factor X, V y XV a las placas inoculadas. Para este medio solo se disuelve la base de agar en el agua destilada y se hierve por 1 min para disolver perfectamente la base. Posteriormente se esteriliza a 121°C por 15 min.

- Todd Hewitt Broth (Caldo Todd Hewitt) con Suero de Conejo al 5%

Este medio se utiliza para la conservación de las cepas procesadas durante un largo periodo a -70°C en ultracongelador. La fuente nutritiva del medio de cultivo que estimula el crecimiento microbiano está constituida por la infusión cerebro corazón y la peptona los cuales proveen nitrógeno, vitaminas y aminoácidos. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Por fermentación de la glucosa se generan productos ácidos que son neutralizados por las sales fosfato de sodio y carbonato de sodio, evitándose así la destrucción de las hemolisinas producidas por los microorganismos y permitiendo así su tipificación serológica.

Composición del caldo

- Caldo Todd Hewitt 3.7g
- Agua destilada 100ml
- Suero de conejo 5ml

Preparación

Se suspende 3.7g del caldo en 100ml de agua y se coloca en el agitador hasta disolver por completo. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15min. Se deja enfriar y posteriormente se le añade 5ml de suero de conejo y se mezcla perfectamente. Se distribuyen 1ml del caldo con suero en criotubos de rosca y se conservan en refrigerador a 4°C hasta su uso.

Anexo 2 Tipificación de *H. influenzae* por PCR, secuencias de oligos y soluciones.

► Protocolo para el PCR de tipificación de *H. influenzae* etapa 1

1. Extracción de ADN

Se extrajo el DNA de una suspensión bacteriana de *Hi* por desnaturalización con ebullición durante 10 minutos en agua MiliQ o 5 veces destilada a través del siguiente procedimiento:

- a. Para cada muestra a probar y controles, se rotularon debidamente 2 tubos tipo Eppendorf® de 0.5 ml con su número correspondiente.
- b. Se agregaron 60µl de agua MiliQ estéril a uno de los tubos.
- c. Se tomaron 3 o 4 colonias de un cultivo fresco de *Hi* de 18-24 h de incubación y se disolvieron en los 60µl de agua MilliQ estéril y se agitó hasta obtener una suspensión bacteriana homogénea.
- d. Se colocaron los tubos con la suspensión bacteriana en ebullición por 10 minutos.
- e. Se centrifugaron a 1300 rpm por 10 minutos, inmediatamente después se tomaron 40µl del sobrenadante y se colocaron en el segundo tubo debidamente rotulado.
- f. El sobrenadante obtenido conteniendo el ADN, se utilizó inmediatamente o se mantuvo a -20°C hasta su uso.

2. PCR

El ADN de cada uno de los aislamientos fue probado primeramente para ser amplificado con los primers *Omp I/III* y *VK I/II*, con la finalidad de confirmar la especie *Hi* y conocer si se trataba de una cepa tipificable o NT, mediante el siguiente protocolo de la tabla 1.

AMPLIFICACIÓN DE GENES <i>OMP I / OMP III</i> Y <i>VK I / VK II</i>			
Reactivo	Vol. para 1 reac. (µl)	Vol. Inicial	Vol. Final
H ₂ O	18.3		
MgCl ₂	1.5		
BUFFER DE <i>TAQ.</i>	2.5	10x	1x
<i>OMP I</i>	1	10µM	0.4µM
<i>OMP III</i>	1	10µM	0.4µM
<i>VK I</i>	1	10µM	0.4µM
<i>VK II</i>	1	10µM	0.4µM
DNTP'S	0.5	10mM	0.3mM
<i>TAQ. POLIMERASA</i>	0.2	5u/ul	1u
ADN	1.5 (100-150ng/µl)		

Tabla 1. Volumen de los reactivos requeridos para la PCR utilizando primer *Omp I/III* y *VK I/II*. Volumen total de reacción de 25µl.

Cepas control utilizadas:

ATCC 49247: *HNT* (El producto de PCR de esta cepa solo es una banda de 1000pb, correspondiente al gen *ompP2 I/III*)

ATCC 10211: *Hi* tipificable (El producto de PCR de esta cepa solo es una banda de 345pb, correspondiente al gen *VK*)

ATCC 7901: *H. parainfluenzae* (Con esta cepa no hay producto amplificados para estos genes)

Se incluyó una muestra "blanco" que contenía solamente la mezcla de los reactivos sin ADN como control negativo de la reacción.

Procedimiento:

- En cada corrida de PCR, primeramente, se procedió realizar el cálculo del volumen de cada uno de los reactivos que indica la tabla 1, según el número de muestras a probar y controles.
- Se utilizó 1 tubo tipo Eppendorf® de 1.5 ml para preparar la mezcla de reacción, en donde se colocaron los volúmenes únicamente de H₂O 5 veces destilada estéril, MgCl₂, buffer *Taq*, primers *OmpI/III* y *VK I/II*, dNTP's y enzima *Taq* polimerasa.

- c. Para cada muestra a probar y controles, se rotuló un tubo tipo Eppendorf® para PCR y se colocó 1.5 µl de ADN correspondiente.
- d. Una vez preparada la mezcla de reacción, se tomaron 23.5 µl de ésta y se agregaron a cada tubo conteniendo 1.5 µl de ADN correspondiente para llevarlo a un volumen final de 25 µl de reacción de PCR.
- e. Inmediatamente se colocaron los tubos de PCR en un termociclador para llevar a cabo la amplificación bajo las siguientes condiciones:
 - 94°C 5min (desnaturalización inicial)
 - 94°C 1 min (desnaturalización)
 - 55°C 1 min (alineamiento)
 - 72°C 1 min (extensión) x 30 ciclos
 - 72°C 8 min
 - 4°C por tiempo indefinido
- f. El tiempo total de corrida fue de 2 h aproximadamente, posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR o se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3. Electroforesis

- a. El producto de PCR de cada muestra se corrió en gel de agarosa al 1% utilizando buffer TBE 1X.
- b. Para disolver la agarosa, se calentó en horno de microondas por aproximadamente 4 min por intervalos de 1 min hasta disolver completamente. Teniendo cuidado de que no se derramara al llegar al punto de ebullición.
- c. Inmediatamente después, se dejó enfriar la solución aproximadamente a 50°C para vaciar uniformemente sobre una base para gel previamente preparada con el peine adecuado colocado en un extremo. Se eliminó cualquier burbuja de aire que se formara al momento del vaciado.
- d. Se dejó solidificar la agarosa aproximadamente por 20 min.
- e. Después de este tiempo se retiró cuidadosamente el peine quedando de esta manera formados los pozos a utilizar y se colocó el gel en la cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE 1X para su corrida.
- f. En cada pozo se cargaron 5 µl de producto de PCR mezclado con 2 µl de colorante "loading buffer" (o amortiguador de carga) para cada muestra. El primer pozo en el

gel se dispuso para cargar 2 µl de marcador de peso molecular λ de 1Kb más 2 µl de "loading buffer".

- g. Una vez cargado el gel, se conectó cuidadosamente la cámara de electroforesis a una fuente de poder verificando la polaridad de los electrodos: negativo con negativo y positivo con positivo.
- h. De esta manera se corrió el gel a 100 volts por 1 hora.

4. Tinción, Fotografía y Análisis de resultados

- a. Al término de la electroforesis, el gel se tiñó con solución de bromuro de etidio (10µg/ml) por 30 min.
- b. Posteriormente se lavó con agua estéril para tomar la fotografía.
- c. Se colocó en un transiluminador donde se observó a través de luz UV.
- d. El tamaño de los productos se muestra en la tabla 2.

Primer utilizado	Tamaño (pb)
<i>Cap a</i>	250
<i>Cap b</i>	480
<i>Cap c</i>	250
<i>Cap d</i>	150
<i>Cap e</i>	1350
<i>Cap f</i>	450
<i>OMP</i>	1000
<i>VK</i>	345

Tabla 2. Tamaño en pb de los productos de PCR de cada primer.

► Protocolo para el PCR de tipificación etapa 2 para determinar los serotipos

Procedimiento:

Se probó cada uno de los iniciadores para el gen *cap a-f* por separado de la siguiente manera:

- a. En cada corrida de PCR, primeramente, se procedió a realizar el cálculo del volumen de cada uno de los reactivos que indica la tabla 3, según el número de muestras a probar y controles.
- b. Se utilizó 1 tubo tipo Eppendorf® de 1.5 ml para preparar la mezcla de reacción, en donde se colocaron los volúmenes únicamente de H₂O 5 veces destilada estéril, MgCl₂, buffer *Taq*, primers *Cap 1* (a-f) y *Cap 2* (a-f), dNTP's y enzima *Taq* polimerasa.

- c. Se utilizaron 6 tubos para PCR, uno para cada control ATCC de los tipos a-f y 6 tubos para cada muestra a probar.
- d. Para cada control se colocó 1 μ l del primer *cap a-f* (f y r) más 1.5 μ l de ADN de ATCC en cada tubo correspondiente.
- e. Para cada muestra a probar, se rotularon los 6 tubos con el mismo número de muestra y el tipo a probar (a-f), se colocó en cada uno 1 μ l de primer *cap* (f y r) correspondiente: *Cap a* en el tubo 1, *cap b* en el tubo 2 y así sucesivamente hasta el primer *cap f* en el tubo 6, más 1.5 μ l de ADN de la misma muestra a probar en cada tubo.
- f. Una vez preparada la mezcla de reacción, se tomaron 21.5 μ l y se agregaron a cada uno de los 6 tubos tanto de los controles como de la muestra a probar para llevarlos a un volumen final de 25 μ l de reacción de PCR.
- g. Los tubos de PCR se colocaron en un termociclador para llevar a cabo la amplificación siguiendo las condiciones arriba mencionadas.
- h. A partir de aquí, se siguieron las mismas indicaciones de electroforesis, tinción del gel y fotografía arriba mencionados.
- i. Se analizó el producto amplificado y se determinó el serotipo según al peso molecular correspondiente para cada uno de los primers *cap a-f*.

Amplificación de Genes <i>Cap a-f</i>			
Reactivo	Vol. Para 1 reac. (μ l)	Vol. Inicial	Vol. Final
H2O	18.3		
Buffer de <i>Taq.</i>	2.5	10x	1x
Primer p/cápsula 1	1	10 μ M	0.4 μ M
Primer p/cápsula 2	1	10 μ M	0.4 μ M
dNTP's	0.5	10mM	0.2mM
<i>Taq.</i> Pol.	0.2	5U/ μ l	1u
ADN	1.5 (100-150ng/ μ l)		

Tabla 3. Volúmenes de cada reactivo para la amplificación de los genes *cap* (a-f) para cada muestra a procesar. Volumen total de reacción de 25 μ l.

Cepas control utilizadas:

ADN de cada uno de los serotipos conocidos de *Hi*:

ATCC 9006 (a)

ATCC 10211 (b)

ATCC 9007 (c)

ATCC 9008 (d)

ATCC 8142 (e)

ATCC 9833 (f)

Se incluyó una muestra "blanco" que contuvo solamente la mezcla de reactivos sin ADN como control negativo de la reacción.

► Secuencias de oligos

Tabla: Secuencias de oligos *OmpP2/III* para confirmación de la especie *H. influenzae*

Tipo capsular/gen	Iniciador	Secuencia (5´-3´)
<i>OmpP2</i>	01	ATA ACA ACG AAG GGA CTA ACG
<i>OmpP2</i>	03	ACC TAC ACC CAC TGA TTT TTC

Tabla: Secuencias de oligos *Cap* a-f para identificar cada uno de los serotipos de *H. influenzae* (quitar de esta lista a *VK* y colocarlo aparte, como *Omp*)

Tipo capsular/gen	Iniciador	Secuencia (5´-3´)
<i>Cap a</i>	a1	CTA CTC ATT GCA GCA TTT GC
	a2	GAA TAT GAC CTG ATC TTC TG
<i>Cap b</i>	b1	GCG AAA GTG AAC TCT TAT CTC TC
	b2	GCT TAC GCT TCT ATC TCG GTG AA
<i>Cap c</i>	c1	TCT GTG TAG ATG ATG GTT CA
	c2	CAG AGG CAA GCT ATT AGT GA
<i>Cap d</i>	d1	TGA TGA CCG ATA CAA CCT GT
<i>Cap e</i>	d2	TCC ACT CTT CAA ACCATT CT
	e1	GGT AAC GAA TGT AGT GGT AG
<i>Cap f</i>	e2	GCT TTA CTG TAT AAG TCT AG
	f1	GCT ACT ATC AAG TCC AAA TC
	f2	CGC AAT TAT GGA AGA AAG CT

Tabla: Secuencias de oligos *VanKetel* para confirmación de la especie *H. influenzae*

Tipo capsular/gen	Iniciador	Secuencia (5'-3')
<i>VanKetel</i>	Vk1	CGT TGT ATG ATG TTG ATC CAG AC
	Vk2	TGT CCA TGT CTT CAA AAT GAT G

► Soluciones

Buffer para electroforesis TBE al 10x

El buffer TBE (tris-borato-EDTA) es un buffer optimizado para usar en geles de agarosa o acrilamida y permite separar ácidos nucleicos por peso y su alta afinidad a los compuestos.

Composición del Buffer

- Base tris 108g
- Ac. Bórico 55g
- EDTA pH 8 (0.5M) 40ml
- Agua Mili-Q 1000ml

Buffer TBE al 1x (solución de trabajo)

- TBE al 10x 100ml
- Agua Mili-Q 1000ml

Solución de EDTA con pH 8 a 0.5M

Para tener una solución de EDTA pH8 se disuelve aprox. 20g de NaOH en 500ml de agua Mili-Q, el NaOH se va agregando poco a poco mientras se va disolviendo por agitación y se lee el pH hasta ajustarlo al pH correcto.

Composición de EDTA pH 8 a 0.5M

- EDTA 186.1g
- Agua 1000ml
- NaOH 20g

Anexo 3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

► Producción de β -lactamasa

La prueba para demostrar la producción de β -lactamasa se realizó mediante el método de cefinasa, utilizando discos de papel filtro impregnado con el reactivo de cefinasa BBL[®].

Procedimiento:

- a. Se utilizó un cultivo fresco de *Hi* a probar con colonias aisladas.
- b. Se preparó un portaobjetos limpio por cada muestra donde se colocaron los discos de cefinasa humedecidos con una gota de agua destilada estéril y se designó un disco para probar el control ATCC 33533 positivo y el resto para las muestras
- c. Se colocó con un asa estéril, una colonia bacteriana sobre el disco de papel filtro.
- d. Se esperó unos minutos para observar la reacción.

Interpretación:

No cambia de color: Negativo (no productor de β -lactamasa)

Cambia a color rosado: Positivo (productor de β -lactamasa)

Cepa control: ATTC 33533 *Hi* β -lactamasa positiva.

► Microdilución en caldo por concentración mínima inhibitoria

Procedimiento

1. Preparación de la solución stock y diluciones de los antimicrobianos.
2. Preparación del inóculo de *Hi* e inoculación de las microplacas
3. Lectura e interpretación de los resultados.

Preparación de la solución stock y diluciones del antibiótico.

- a. Se preparó la solución stock de cada uno de los antibióticos a probar, a una concentración inicial de 5,120 µg/ml mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Peso en mg} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{concentración (µg/ml)}}{\text{potencia del antibiótico (µg/ml)}}$$

$$\text{Volumen en ml} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{potencia (µg/ml)}}{\text{Concentración (µg/ml)}}$$

- a. A partir de la solución stock, se prepararon diluciones en un rango de 0.015-16 µg/ml de cada uno de los siguientes antibióticos a probar: cefotaxima (Ce), rifampicina (R), cloranfenicol (Cl) y TMP/SMX; sólo para ampicilina el rango de diluciones fue de 0.06-64 µg/ml, como se indica en la tabla 4.

Preparación de diluciones de agentes antimicrobianos para su uso en la prueba de susceptibilidad por dilución en caldo						
Solución antimicrobiana						
Pasos	Concentración (µg/ml)	Origen	Volumen (ml)	+ CAMHB Volumen (ml)	=	Concentración final (µg/ml) Log ₂
1	5120	Stock	1	9		512 9
2	512	Paso 1	1	1		256 8
3	512	Paso 1	1	3		128 7
4	512	Paso 1	1	7		64 6
5	64	Paso 4	1	1		32 5
6	64	Paso 4	1	3		16 4
7	64	Paso 4	1	7		8 3
8	8	Paso 7	1	1		4 2
9	8	Paso 7	1	3		2 1
10	8	Paso 7	1	7		1 0
11	1	Paso 10	1	1		0.5 -1
12	1	Paso 10	1	3		0.25 -2
13	1	Paso 10	1	7		0.125 -3

Tabla 4: Fuente: CLSI, 2021 (CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 31a ed).⁴⁰
Abreviaciones: CAMHB: Caldo Mueller Hilton ajustado con cationes.

- b. Las diluciones se prepararon en caldo HTM[®] (caldo Mueller-Hinton suplementado con levadura Difco[®], hemina bovina y NAD).
- c. Se utilizaron placas de 96 pozos (Corning)[®] conteniendo 12 columnas (1-12) y 8 filas (A-H).

Se preparó una placa por antibiótico y se colocaron 50 µl de cada una de las diluciones en los pozos correspondientes (columnas 1-11). La última columna (columna 12) se dispuso para el control de crecimiento conteniendo medio HTM sin antibiótico y la última fila (fila H) para el control de esterilidad, quedando de esta manera lista para su inoculación con *Hi*.

Preparación del inóculo de *Hi* e inoculación de las microplacas

- a. A partir de un cultivo puro de 18 h de *Hi* en agar chocolate, se preparó una suspensión del microorganismo en 3 ml de solución salina estéril al 0.9%, la turbidez de esta suspensión se llevó a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml).
- b. Posteriormente, se realizó una dilución 1/100 tomando 100 µl de la suspensión bacteriana a 0.5 de McFarland en 9.9 ml de caldo HTM), quedando a una concentración final de 10^6 UFC/ml.
- c. Se realizó la inoculación de la microplaca.
- d. Por cada placa se probaron 6 aislamientos, más una cepa control de *H. influenzae* ATCC 49247 (filas A-G). La última fila se dispuso para el control de esterilidad conteniendo sólo medio HTM sin antibiótico (fila H).
- e. Por cada muestra, se tomaron 50 µl de la dilución 1/100 de cada muestra y se colocaron en cada uno de los pozos (1-12) de la fila correspondiente de la placa previamente llenada con 50 µl de cada una de las diferentes diluciones del antibiótico a probar en las filas correspondientes.
- f. La concentración final del microorganismo en cada pozo fue de 5×10^4 UFC/ml.
- g. El volumen final en cada pozo de la microplaca fue de 100 µL.
- h. Las placas se incubaron a 35°C, en aerobiosis por 20-24 horas.

Lectura e interpretación de resultados

- a. La lectura de la CIM se realizó determinando la menor concentración del antibiótico que inhibe visiblemente el crecimiento bacteriano.
- b. Se inició el procedimiento leyendo los controles de crecimiento y el control de esterilidad.

- c. Posteriormente, se realizó la lectura de la CIM de la cepa control, la cual debe estar dentro del rango establecido por el CLSI³⁴. Se utilizó la cepa de *H. influenzae* ATCC 49247 como control de calidad.
- d. Una vez teniendo las lecturas de cada muestra por cada antibiótico, se realizó la interpretación de acuerdo con los puntos de corte del CLSI (Tabla 5).

Interpretación de la Susceptibilidad para <i>Haemophilus influenzae</i> . CLSI 2021			
ANTIBIÓTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Ampicilina	≤1	2	≥4
Cefotaxima	≤2	-	-
Cloranfenicol	≤2	4	≥8
Rifampicina	≤1	2	≥4
TMP/SMX	≤0.5/9.5	1/19 – 2/38	≥4/76

Tabla 5. Rangos de puntos de corte de antibióticos para la prueba de susceptibilidad de acuerdo con la interpretación del CLSI, 2021 para *Hi*.

► Medios de cultivo

- HTM (Haemophilus Test Medium) caldo

Se utiliza en el procedimiento de prueba de sensibilidad por medio del método de difusión en disco antimicrobiano para cepas aisladas a partir de muestras clínicas, de especies de *Haemophilus*. Anteriormente consistía en el agar Mueller Hinton suplementado con hemoglobina al 1% y enriquecimiento IsoVitaleX al 1% (agar chocolate Mueller Hinton) era el medio anteriormente recomendado para *Haemophilus influenzae*. Actualmente este medio es agar Mueller Hinton suplementado con factor X (hemina o hematina), factor V (nicotinamida adenina dinucleótido, o NAD) y extracto de levadura para trabajar con éxito cepas de *H. influenzae*.

Preparación

- Medio HTM 10.5 g
- Levadura 2.5 g
- Suplemento IsoVitalex 2 g
- Agua destilada 500 g

Suspender 21.5 g de agar HTM en 500 ml de agua destilada y llevar a ebullición hasta su disolución. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 min. Enfriar el medio esterilizado y agregar el suplemento y disolver perfectamente.

REFERENCIAS

1. Campos, J. (2013). Género Haemophilus: INTERÉS CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO. *Seimec*, 1(1), 1–3.
2. OMS. (2019). *Neumonía*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>
3. González D, et.al. (2007). Enfermedad invasiva por Haemophilus influenza no tipificable, 216–7.
4. OMS. (2013). Parte Epidemiológico Semanal (Weekly epidemiological record / Relevé épidémiologique hebdomadaire). 39, 413–428.
5. Dirección General de Epidemiología. (2018). Manual de Precedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Prevenibles por Vacunación. *Secretaría de Salud*, 87-92.
6. Organización Panamericana de la Salud. (2004). Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae. 4, 177.
7. Gómez de León-Cruces, P., & Cabrera-Contreras, R. (1992). Vacunas contra Haemophilus influenzae B: presente, pasado, futuro. *Salud Publica de Mexico*, 34(3), 274–286.
8. Sakurada, A. (2013). Retrato microbiológico: Haemophilus influenzae. *Revista Chilena de Infectología*, 30(6), 661–662.
9. Gómez de León, P., Cabrera-Contreras, R., & Cravioto, A. (1991). Haemophilus influenzae b: una revisión sobre los determinantes de patogenicidad y de la respuesta inmune a la infección. In *Salud Publica de Mexico*, 33, 504–512.
10. Preston, A., Mandrell, R. E., Gibson, B. W., & Apicella, M. A. (1996). *The Lipooligosaccharides of Pathogenic Gram-Negative Bacteria*. Critical Reviews in Microbiology; Taylor & Francis.
11. van Alphen, L., Klein, M., den Broek, L., Riemens, T., Eijk, P., & Kamerling, J. P. (1990). Biochemical Characterization and Worldwide Distribution of Serologically Distinct Lipopolysaccharides of Haemophilus influenzae Type b. *The Journal of Infectious Diseases*, 162(3), 659–663.
12. Harvey, H. A., Swords, W. E., & Apicella, M. A. (2001). The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic neisseria and haemophilus. *Journal of Autoimmunity*, 16(3), 257–262.
13. Campos, N. R. (s/f). *EL LIPOPOLISACARIDO BACTERIANO: UNA POTENTE ENDOTOXINA CON MULTIPLES ACTIVIDADES BIOLÓGICAS*. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, 71-84.
14. Syrogiannopoulos, G. A., Hansen, E. J., Erwin, A. L., Munford, R. S., Rutledge, J., Reisch, J. S., &

- McCracken, G. H. J. (1988). Haemophilus influenzae type b lipooligosaccharide induces meningeal inflammation. *The Journal of Infectious Diseases*, 157(2), 237–244.
15. Vermeë, Q., Cohen, R., Hays, C., Varon, E., Bonacorsi, S., Bechet, S., Thollot, F., Corrad, F., Poyart, C., Levy, C., & Raymond, J. (2019). Biofilm production by Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae isolated from the nasopharynx of children with acute otitis media. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1–10.
 16. Cárdenas, M., Gándara, J., & Pérez, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*, 94, 35–43.
 17. Duarte, C; Rodriguez, M; Sanabria, O; Realpe, M. (2012). Instituto Nacional de Salud Colombia Procedimientos para el diagnóstico de Neumonías y Meningitis Bacterianas y la caracterización de cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* , SIREVA II. *Grupo Microbiología, Instituto Nacional de Salud Bogotá – Colombia, Organización Panamericana De la Salud*, 113.
 18. Falla, T. J., Crook, D. W. M., Brophy, L. N., Maskell, D., Kroll, J. S., & Moxon, E. R. (1994). PCR for capsular typing of Haemophilus influenzae. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(10), 2382–2386.
 19. Cox, A. D., Kuo Lee, R., Ulanova, M., Bruce, M. G., & Tsang, R. S. W. (2021). Proceedings of a workshop to discuss the epidemiology of invasive Haemophilus influenzae disease with emphasis on serotype a and b in the Americas, 2019. *Vaccine*, 39(4), 627–632.
 20. Oficina Regional para las Américas de la Organización Mundial de la Salud. (2019). *Haemophilus influenzae - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*.
 21. Rodríguez, M. K., Agudelo, C. I., & Duarte, C. (2015). Aislamientos invasivos de Haemophilus influenzae en menores de 5 años: Distribución de los serotipos y de la sensibilidad antimicrobiana, SIREVA II, Colombia 2002-2013. *Infectio*, 19(2), 67–74.
 22. Efron, A. M., Moscoloni, M. A., Reijtmán, V. R., & Regueira, M. (2013). Vigilancia de serotipos en infecciones invasivas por Haemophilus influenzae en la Argentina en la era de la vacuna conjugada contra el serotipo b durante el período 2005-2010. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(4), 240–247.
 23. Efron, A. M., Moscoloni, M. A., Reijtmán, V. R., & Regueira, M. (2013). Vigilancia de serotipos en infecciones invasivas por Haemophilus influenzae en la Argentina en la era de la vacuna conjugada contra el serotipo b durante el período 2005-2010. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(4), 240–247.
 24. OPS/OMS. (2019). *Inmunización OPS*. 2019. <https://www.paho.org/es/temas/inmunizacion>
 25. Ibar-Bariain, M., Rodríguez-Gascón, A., Isla, A., Solinís, M. Á., & Canut-Blasco, A. (2021). Evaluation of the adequacy of the antimicrobial therapy of invasive Haemophilus influenzae infections: A pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 39(2), 65–71.

26. ALIANZA POR LA VACUNACION. (2019). *Haemophilus influenzae: vacuna*. <https://vacunacion.org/haemophilus-influenzae-tipo-B-vacuna.html>
27. Yamada, S., Seyama, S., Wajima, T., Yuzawa, Y., Saito, M., Tanaka, E., & Noguchi, N. (2020). β -Lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* is acquiring multidrug resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 13(424).
28. Hernández, A. E. L. (2006). *Haemophilus influenzae Susceptibilidad a los Antimicrobianos y Comportamiento Frente a la Vacuna en Cuba*. INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ."
29. Calvo, Jorge; Cantón, Rafael; Fernández, Felipe; Mirelis, Beatriz; Navarro F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos, SEIMC. [Internet].;54. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
30. Abarca, G., & Herrera, M. L. (2001). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio . In *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36, (77–104). scielo.
31. Patricia Gómez de León Cruces, & Roberto Cabrera Contreras. (1992). *Vacunas contra Haemophilus influenzae B: Presente, Pasado, Futuro*. 34, 274–286.
32. OMS. (2006). *Documento de posición de la OMS sobre las vacunas conjugadas contra Haemophilus influenzae tipo b*. 15(May), 58. <https://doi.org/10.16258/j.cnki.1674-5906.2006.01.022>.
33. OMS. (2020). *Cobertura vacunal*. Ginebra. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>.
34. Reyna Figueroa, J., Vidal Vázquez, P., & López-Collada, V. R. (2013). Epidemiología de las enfermedades prevenibles con la vacuna pentavalente acelular en México. *Vacunas*, 14(2), 62–68.
35. LatinComm. (2015). Historia y avances de la vacunación en México. *LatinComm, Latest Review*, 1–8.
36. Loera, G., & Fajardo, J. (2021). Día mundial contra la Hepatitis, México.
37. Medscape. (2019). Se incorpora la vacuna hexavalente al Sector Salud en México. https://espanol.medscape.com/verarticulo/5903663_print
38. NCIRD. (2020). *Haemophilus influenzae | Hib | Clinicial Features | CDC*. <https://www.cdc.gov/hi-disease/clinicians.html>.
39. DE, D. D. I. H. I. (2011). *Neumonía Adquirida En La Comunidad (Nac) Departamento De*

40. Instituto Nacional de Salud Pública. (2018). *GIVEBPVac, 2018 (Grupo Interinstitucional para la Vigilancia de Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunación)*.
41. Weinstein, M. (2021). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In *Journal of Services Marketing* (Vol. 8, Issue 3).
42. OPS. Vigilancia de las neumonías y meningitis bacterianas en menores de 5 años. Guía práctica. Segunda edición. Washington, D.C.: OPS; 2020
43. Nuevo coronavirus 2019 (2019). Retrieved January 24, 2022, from <https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019>
44. Zhu, X., Ge, Y., Wu, T., Zhao, K., Chen, Y., Wu, B., Zhu, F., Zhu, B., & Cui, L. (2020). Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. *Virus Research*, 285.
45. León, M. E., Et.al. (2021). Estudio epidemiológico de Haemophilus influenzae causante de enfermedad invasiva y no invasiva en Paraguay (1999-2017). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 39(2), 59–64.
46. Yamada, S., Seyama, S., Wajima, T., Yuzawa, Y., Saito, M., Tanaka, E., & Noguchi, N. (2020). β -Lactamase-non-producing ampicillin-resistant Haemophilus influenzae is acquiring multidrug resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 13(4), 497–501.
47. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández -Cuenca -f y Mirelis B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clín*; 29(7): 524-534.
48. Wen, S., Feng, D., Chen, D., Yang, L., & Xu, Z. (2020). Molecular epidemiology and evolution of Haemophilus influenzae. *Infection, Genetics and Evolution*, 80(September 2019).

Cuernavaca, Morelos a 24 de agosto de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **ALBER ELÍ LAVANA**, con el título del trabajo: **ANÁLISIS DE SEROTIPOS Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Haemophilus influenzae* CAUSANTE DE ENFERMEDAD EN LA POBLACIÓN MEXICANA (2019-2021)**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: M. EN C. VERÓNICA CHÁVEZ LÓPEZ

SECRETARIO: M. EN C. MARÍA LUISA BARROSO GARCÍA

VOCAL: M. EN C. ARACELI SOTO NOGUERÓN

SUPLENTE: DRA. DEYANIRA PÉREZ MORALES

SUPLENTE: DRA. IRMA GABRIELA ECHÁNIZ AVILES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DEYANIRA PÉREZ MORALES | Fecha:2022-08-24 20:05:53 | Firmante

roayTivUs3LHQa2htSnrWZKmU4gAUNmoPqNmZsqO1mvUxt9Z42L5Eg0OwLSSiP1YRzvM3BFsIrCTrihU1X0QD34wHmJW17Xvswp6R92rxMM79dvc6MAxMWhRkCtMa+h3j/a
oTY3pN+wo5iUU6agCkGW9lo1uOclNzliqw4SpLxrtmRIVDSIWm7HOcRdBg9eIVzC2E/XWbt48Ss6+yZDHmXhwb0pJ2CLKc0LBKIKlsm3rV8ygnloqAmRd8LoUBMdlR50IW0
Pe16VpRfKE6wTA954b+chkTF3VKfRRug9BdDlxDXisxCDbmKHHin9AiDgNrfErsL0yFKVgjp1Ummg==

ARACELI SOTO NOGUERÓN | Fecha:2022-08-25 10:47:28 | Firmante

qwbqRkGj5XNteZJF6sMvDDINvUhtBa95egbKWP/KbLFYKsRpQ42ed+Te2+I9H0MApyswEX0MSBHYabVMXDaWssirqrz419vmsqH8KV65uR6awlK0j9ghdz9fXv/BrvfWn/u9IKhJ
bFFApLF1b2wrScrpW8nwt94ZaAsm/0lwpu18c6FMFXQwN1465eKA5dxZA9EJ4e+02g0j5X8W46cLmLSLxcsBR62w48b4OqI6rlo2E9HnliE4u+X9xk4I7giiQQhbBJXDGLW6zKzjB
uSFmoUWsCHR2CYFionDmEWFskWUU0uzZbWTMM8FW4NTCb52zFXBdy8CHX0ckEUfc3Q==

IRMA GABRIELA ECHÁNIZ AVILES | Fecha:2022-08-28 20:18:56 | Firmante

gTBcqk1/b+TKUQN0EOYEKVA2ml6Am5D0sJCHJPoEQdbIKAgFdcw/L0ZyhbvrvedYUM2qN/kR1ze7ZbgkIgLJ/B57D8dYjXOxeurWZHzgduNFCVvKfdgPcUbj6n+YKJVLi/xnqS
ngyWqDaQuGYPotIC/E9ZbrqAgiAkyNlbyv3zJ6Wl4QKt8dov3iolaEpkV8m3khsW9Kxv40SnYp8O+G1IW0PFPav8ZGtsBNksMx9dFZvLs4D4OXWmDr3gFW01S/0MG2fW4OdAaP
mifQ54+XufZp1E7Kb2NeOcRiwjNEOB98ELzkk1XbGLmxti+Q86jIqgne2X0NwL4zLI/YOqkQ==

VERONICA CHAVEZ LOPEZ | Fecha:2022-08-29 11:45:28 | Firmante

uLgawhJd0/qoCFYvrgRDWwci/A/1pVyyv1LNoi1Ly1IH+BQSeFuunPDNB/X9X6/8DA9A0Zd19zHynXsSi8GG64CHZGssdWWovvVbHon1hPUzp7M0JWnooKplqSW3m+fwtyXnIRp
wfsC2hc0x9nmsh842hg7AgX0slYfy81vhYlGTHOpWMCqM1WI8G2GaY+qYC6m+LbZ/95UHDBwLv1lgXO1tzQzxxz/WBDpYoFclQK9O+YLogjw6MqaV6UN1FCnmltzCfht5J+XxD
vyJxqbmgsU0MaH5tRQ/zQAZIBxf3WQWJ6O7I9/RHlwZeq4ojyfgqMo26YBCjUyPZqwY9g==

MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2022-08-30 16:11:06 | Firmante

A7EKZBzmF7dNTPriLxM+cd6M1vy42Cld8IcSgeR5L0r/LngnpNha/Y+AWPeG326uEYjSz9aaxsm6pDWplQMjP6CCGTBIARnkBli5E2xN7mHKBs0X/nyzUOpypgzQyflO/iDL7Zya
G+HsxcI+Pm80MvfSbmgUmf+FgCU+4JnKYdXDUXbXX7IF75iJkbtFI0PEJ/Q+YMX6CdkZu4s+NmRCxFqYPLzN7zoIovCcw4SIP/qeFfO8kE+TqUgvo13kEAji3OXm7xpGnVnhQj
NJZF6g1L9WeBPXHwWocFIIZ7fo9EIU2hzhI27Zyg1loeSjQ7E88poP5RN3dzxcBVN0WA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



D0CNgywkh

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/o9iUqVyxSPk6HgTQwVbZCImOZUAcPufd>

