

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Microbiología**



**IMPORTANCIA CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA DE  
HAEMOPHILUS INFLUENZIAE EN LA ÉPOCA  
POSTERIOR A LA VACUNACIÓN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María Belén Aracil García**

Bajo la dirección del doctor:  
José Campos Marqués

**Madrid, 2006**

- **ISBN: 978-84-669-2943-1**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**"Importancia clínica y epidemiología de *Haemophilus influenzae*  
en la época posterior a la vacunación"**

**Memoria presentada por M<sup>a</sup> Belén Aracil García para  
optar al grado de Doctor en la Facultad de Medicina  
Madrid, Diciembre de 2005**



Ministerio de Sanidad y Consumo

El Dr. José Campos Marqués, Doctor en Medicina, Investigador del Consejo superior de Investigaciones Científicas, Jefe del Laboratorio de Antibióticos del Centro Nacional de Microbiología

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral, titulada “**Importancia clínica y epidemiología de *Haemophilus influenzae* en la época posterior a la vacunación**”, realizada por **D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Belén Aracil García** para optar al grado de Doctor en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid ha sido elaborada bajo mi dirección y cumple los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa frente al tribunal correspondiente.

Madrid, Diciembre de 2005

D. José Campos Marques.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que tanto me han ayudado en la elaboración de este trabajo y que lo han hecho posible:

Al Dr. José Campos, mi Director de tesis, por su confianza en la viabilidad del proyecto y por elegirme para su desarrollo. Por su paciencia, su flexibilidad, su constante ayuda, y su continua dedicación.

A la Dra. Margarita Hernando, del Departamento de Epidemiología de la CAM, por ayudarnos en la recogida y el análisis de unos datos tan valiosos para el estudio.

A mis compañeros del Laboratorio de Antibióticos, del CNM, por su inestimable ayuda y apoyo en todo momento. A los que están: María Pérez, Jesús Oteo, Federico Román, Enrique Moguel, Carmen Navarro, Silvia García, Carmen García, Silvia Miguelañez y Verónica Bautista y a los que estuvieron: Susana Cruchaga, Begoña Bailo y Gemma de la Peña.

A mis compañeros del Servicio de Bacteriología, del CNM, por su siempre desinteresada colaboración y por todo lo que me han enseñado.

A mis compañeros del Servicio de Microbiología del Hospital de Móstoles de los que tanto he aprendido como Microbióloga y como persona.

A todas aquellas personas, familia, amigos y colegas, que me han ayudado personal o profesionalmente a finalizar lo que sólo era un proyecto.

A mis padres por enseñarme casi todo. En especial a mi madre, por estar siempre disponible, por ser incansable, por su apoyo incondicional y su entusiasmo.

A David y Miguel por ser niños excepcionales que me permiten compaginar tan fácilmente mi actividad profesional con ellos.

Y especialmente a David siempre a mi lado, incondicional. Por comprender, ayudar, animar, consolar, y sobre todo por hacerme feliz.

La realización de esta tesis fue posible gracias a:

La subvención del Instituto de Salud Carlos III del Proyecto intramural (MPY 1195/02):

“Estudio de los fallos vacunales de la vacuna de *Haemophilus influenzae* serogrupo b e importancia de *H. influenzae* serogrupos e y f en España”.

La subvención de la CAM del proyecto (Expediente:08.2/007.1/2001):

“ *Haemophilus influenzae* serotipos e y f: epidemiología molecular y mecanismos de resistencia a antibióticos en la Comunidad de Madrid”.

La concesión de una beca predoctoral del Instituto de Salud Carlos III (Expediente 01/0037).

*A la memoria de mi padre*

## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

- ADN	Ácido desoxirribonucleico
- CAM	Comunidad Autónoma de Madrid
- CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
- CMI <sub>50</sub>	Concentración Mínima Inhibitoria capaz de inhibir al 50% de la población bacteriana
- CMI <sub>90</sub>	Concentración Mínima Inhibitoria capaz de inhibir al 90% de la población bacteriana
- CNM	Centro Nacional de Microbiología
- Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> serotipo b
- Hie	<i>Haemophilus influenzae</i> serotipo e
- Hif	<i>Haemophilus influenzae</i> serotipo f
- Kpb	kilobases (mil pares de bases)
- LNRH	Laboratorio Nacional de Referencia de <i>Haemophilus</i>
- ml	mililitro
- min	minuto
- NCCLS	“National Committee for Clinical Laboratory Standards”
-Pág	Página
- pb	pares de bases
- PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PFGE	“Pulsed Field Gel Electrophoresis”, Electroforesis en Campo Pulsante
- PHLS	“Public Health Laboratory Service”, Londres, Inglaterra
- pm	peso molecular
- rpm	revoluciones por minuto
- seg	segundo
- SNC	Sistema Nervioso Central
- ufc	unidades formadoras de colonias
- µg	microgramo

Nota: se utiliza también la nomenclatura inorgánica binaria oficial para la descripción de algunos reactivos químicos.



	<b>Pág.</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	17
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Infecciones por <i>Haemophilus influenzae</i> .....	21
1.1.1 Estructura antigénica: cápsula, proteínas de membrana externa, lipopolisacárido, proteasas y fimbria (pili).....	22
1.1.2 Respuesta inmune .....	24
1.1.3 Patogenia .....	25
1.1.4 Cuadro clínico: meningitis, neumonía, epiglotitis, artritis séptica, celulitis, osteomielitis, pericarditis, infección neonatal y del tracto genital femenino y fiebre purpúrica brasileña.....	26
1.1.5 Diagnóstico de laboratorio.....	31
1.1.6 Tratamiento antibiótico.....	33
1.1.7 Epidemiología y profilaxis .....	34
1.2 La enfermedad invasiva por <i>H. influenzae</i> después de la vacunación generalizada con la vacuna conjugada de <i>H. influenzae</i> serotipo b .....	38
1.2.1 Fallos vacunales .....	39
1.2.2 El papel de otros serotipos capsulados .....	44
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	
2.1 Justificación .....	49
2.2 Objetivos .....	51
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> (Organizado por objetivos)	

## ÍNDICE

---

3.1 Conocer la incidencia de <i>H. influenzae</i> causante de enfermedad invasiva tras la administración de la vacuna conjugada de Hib en la CAM .....	55
3.1.1 Pacientes.....	55
3.1.2 Microorganismo.....	56
3.1.3 Tratamiento general de los datos y cálculos estadísticos .....	64
3.2 Estudiar las características de Hib causante de fallos vacunales tras la administración de la vacuna conjugada por Hib en 2 colecciones de cepas: española (CNM) y de Reino Unido (PHLS) .....	64
3.2.1 Pacientes .....	64
3.2.2 Microorganismo .....	66
3.2.3 Tratamiento general de los datos y cálculos estadísticos .....	70
3.3 Conocer la incidencia y la importancia clínica de otros serotipos capsulados de <i>H. influenzae</i> distintos del serotipo b en la población general tras la administración de la vacuna conjugada de Hib en España .....	71
3.3.1 Pacientes .....	71
3.3.2 Microorganismo .....	71
3.3.3 Tratamiento general de los datos y cálculos estadísticos .....	74
3.4 Conocer los genes más frecuentes relacionados con la resistencia a cotrimoxazol, ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina .....	74
3.4.1 Pacientes .....	74
3.4.2 Microorganismo .....	75
3.4.3 Tratamiento general de los datos y cálculos estadísticos .....	82

## 4. RESULTADOS (Organizado por objetivos)

4.1 Conocer la incidencia de <i>H. influenzae</i> causante de enfermedad invasiva tras la administración de la vacuna conjugada de Hib en la CAM .....	87
4.1.1 Pacientes .....	87
4.1.2 Microorganismo .....	91
4.2 Estudiar las características de Hib causante de fallos vacunales tras la administración de la vacuna conjugada por Hib en 2 colecciones de cepas: española (CNM) y de Reino Unido (PHLS) .....	99
4.2.1 Pacientes .....	99
4.2.2 Microorganismo .....	100
4.3 Conocer la incidencia y la importancia clínica de otros serotipos capsulados de <i>H. influenzae</i> distintos del serotipo b en la población general tras la administración de la vacuna conjugada de Hib en España .....	112
4.3.1 Pacientes .....	112
4.3.2 Microorganismo .....	117
4.4 Conocer los genes más frecuentes relacionados con la resistencia a cotrimoxazol, ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina .....	130
4.4.1 Pacientes .....	130
4.4.2 Microorganismo .....	130

<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	157
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	179
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	185
<b>8. ARTÍCULOS PUBLICADOS</b> .....	205
1. Analysis of invasive <i>Haemophilus influenzae</i> infections after extensive vaccination against <i>H. influenzae</i> type b. J Clin Microbiol 2004; 42:524-9.	
2. Antibiotic resistance and clinical significance of <i>Haemophilus influenzae</i> type f. J Antimicrob Chemother. 2003;52: 961-6.	
3. Infections due to <i>Haemophilus influenzae</i> type e: Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Infect Dis 2003; 37(6):841-5.	
4. Molecular epidemiology of <i>Haemophilus influenzae</i> type b isolated from clinical cases of conjugate-vaccine failures in children. J Clin Microbiol 2003; 41:3915-8.	
5. Reciente incremento de los fallos vacunales por <i>Haemophilus influenzae</i> serotipo B. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21(7):383-5.	
6. ¿Regreso de la infección por <i>Haemophilus influenzae</i> b?. Ann Pediatr.2003;59(5):425-8.	
7. Molecular epidemiology of <i>Haemophilus Influenzae</i> type B causing vaccine failures in the United Kingdom. Emerg Infect Dis 2005; en prensa.	

## **INTRODUCCIÓN**

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1 INFECCIONES POR *Haemophilus influenzae*.

El género *Haemophilus* está formado por pequeños bacilos o cocobacilos gram-negativos, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos. Para su desarrollo requieren la adición de factores de crecimiento presentes en la sangre, sobre todo la protoporfirina IX (denominada factor X) y/o nicotinamida dinucleótido (NAD), denominada también factor V.

Son parásitos obligados de las mucosas de la especie humana. Pueden aislarse en el aparato respiratorio superior, la boca y también en la vagina y el intestino. Los requerimientos de los factores X y V, la prueba de la porfirina y la utilización de azúcares son las propiedades más importantes para su clasificación. Los microorganismos con la designación “para” sólo necesitan la presencia del factor V para su crecimiento. La clasificación de *H. ducreyi* y *H. aphrophilus* es dudosa. *H. aegyptius* es indistinguible de *H. influenzae* biotipo III (Tabla 1).

*Haemophilus influenzae*, descrito por Pfeiffer en 1892, fue designado “hemofílico” en virtud de su incapacidad para crecer en medios de cultivo sin la adición de sangre completa o sustancias derivadas de ella. La mayoría de las cepas pueden clasificarse en 6 biotipos diferentes sobre la base de propiedades bioquímicas sencillas. Los biotipos pueden tener cierto interés a efectos epidemiológicos. Según la composición de los polisacáridos capsulares se han identificado 6 serotipos (designados con las letras a hasta f). Más del 90 % de las cepas del serotipo b pertenecen al biotipo I.

Coloniza la nasofaringe de más del 75 % de los niños sanos, aunque las cepas capsuladas se encuentran en condiciones no epidémicas sólo ocasionalmente hasta en el 5 % de los individuos. A menudo se aísla en infecciones crónicas del aparato respiratorio

## INTRODUCCIÓN

superior e inferior, los senos paranasales, el oído medio y la conjuntiva; la mayoría de las cepas no son capsuladas y pertenecen a los biotipos II y III. Las cepas capsuladas del serogrupo b y otros serogrupos causan meningitis en niños y epiglotitis aguda, celulitis, osteomielitis, artritis y neumonía.

**Tabla 1.** Identificación fenotípica de las especies más frecuentes del género *Haemophilus*.

Especies	Protoporfirina IX (factor X)	NAD (factor V)	Prueba de la porfirina	Fermentación de:		
				Glucosa	Sacarosa	Lactosa
<i>H. influenzae</i>	+	+	-	+	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	+	+	-
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	+	+	+	+
<i>H. ducrey</i>	+	-	-	-	-	-
<i>H. segnis</i>	-	+	+	v	v	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	+	+	+	+

v: variable

### 1.1.1 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Cápsula. De acuerdo con la presencia o ausencia de cápsula, *H. influenzae* puede clasificarse como capsulado (aglutinable con sueros específicos) o no capsulado (no aglutinable). En general, la presencia de cápsula se correlaciona con la mayor virulencia del microorganismo. El serogrupo más frecuentemente aislado de sangre y LCR es el b en niños no vacunados, aunque otros serogrupos como e y f pueden también causar cuadros clínicos similares. La cápsula está compuesta por polisacáridos; el serogrupo b es un polímero de ribosa, fosfato y ribitol (RPR). Diversos antígenos de superficie de otras especies bacterianas han demostrado reactividad cruzada con el polisacárido capsular b de *H. influenzae*, entre ellas *Streptococcus pneumoniae* serogrupos 6, 15, 29 y 35, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* K100. Estas reacciones cruzadas deben tenerse en cuenta al interpretar las pruebas positivas de detección de antígenos en líquidos orgánicos.

## INTRODUCCIÓN

---

Proteínas de la membrana externa. La membrana externa de las bacterias gram-negativas contiene proteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos. *H. influenzae* presenta gran número de proteínas de membrana externa. Algunas de estas proteínas son antígenos potentes y posibles candidatos para la preparación de vacunas, sobre todo en infecciones por cepas no capsuladas. Además, se han utilizado como marcadores epidemiológicos.

Lipopolisacárido. La actividad biológica del lipopolisacárido (LPS) de *H. influenzae* produce una reacción de Schwartzman, es letal para el ratón, causa una respuesta febril en conejos, activa los linfocitos B y muestra actividad con el lisado de *Limulus*. En modelos animales contribuye a la capacidad del microorganismo para invadir la mucosa nasal. Los patrones electroforéticos del LPS pueden ser útiles para estudios epidemiológicos, combinados o no con proteínas de membrana externa.

Proteasas IgA. Son enzimas bacterianas cuyo único sustrato conocido es la IgA1, capaces de destruir la cadena pesada en sitios específicos. Podría tratarse de un importante factor de virulencia, dado que las defensas de las mucosas son en parte mediadas por IgA. Se ha observado una estrecha correlación entre el serotipo capsular y el tipo de proteasa IgA1 producido.

Fimbria (pili). Son proyecciones filamentosas de la superficie bacteriana que constituyen uno de los factores de adherencia más estudiados en bacilos gram-negativos. Pueden producir hemaglutinación de hematíes, sin estar implicados en la movilidad bacteriana. En el caso del *H. influenzae*, la mayoría de las cepas aisladas de LCR poseen fimbrias.



## INTRODUCCIÓN

---

### 1.1.2 RESPUESTA INMUNE

Una característica sobresaliente de la susceptibilidad natural a la infección por *H. influenzae* serogrupo b es la dependencia de la edad. La mayoría de las infecciones graves producidas por el serogrupo b afectan a niños menores de 4 años. El título de anticuerpos bactericidas anticapsulares varía con la edad de la misma manera que lo hace la actividad bactericida del suero. El recién nacido posee alrededor de 60-70 ng/mL de anticuerpos anticapsulares contra *H. influenzae* serogrupo b; el nivel desciende rápidamente y se mantiene bajo entre los 5 y 12 meses, edad en la que se registra la máxima incidencia de infecciones graves. A partir del primer año de vida el nivel de anticuerpos asciende, de forma que a partir de los 2 años es ya superior al nivel neonatal y a los 4 años alcanza un título similar al del adulto.

Los anticuerpos anti-RPR promueven la fagocitosis dependiente del complemento y la bacteriólisis *in vitro*. La erradicación o destrucción del microorganismo por el huésped requiere la cooperación de componentes del suero (anticuerpos y complemento) y la fagocitosis. En el calostro y en la leche materna se ha demostrado la presencia casi constante de anticuerpos anticapsulares, predominantemente del tipo IgA, que serían transportados al tracto gastrointestinal del recién nacido.

Después de la infección natural causada por *H. influenzae* se han identificado diversas proteínas de membrana externa con capacidad inmunogénica. Es posible que dichos anticuerpos no fueran protectores en todos los niños, dado que se han observado infecciones recurrentes causadas por el mismo subtipo; sin embargo, dichos anticuerpos son protectores en modelos animales experimentales.

La respuesta inmune natural frente los antígenos capsulares de *H. influenzae* serogrupo b relacionada con la edad ha permitido observar en niños mayores de 18 meses de

## INTRODUCCIÓN

---

vida un aumento de la concentración de anticuerpos igual o superior a 4 veces, en comparación con sólo el 15 % en niños más jóvenes. En la mayoría de los casos aparecen asimismo anticuerpos del tipo IgA en la mucosa respiratoria alta.

### 1.1.3 PATOGENIA

En modelos animales (monos y ratas) Hib causa bacteriemia y meningitis tras la inoculación de la bacteria por vía intranasal. Ambas son el resultado de la diseminación por vía sanguínea. La patogenicidad incluye la capacidad para: *a)* colonizar la mucosa nasal; *b)* penetrar la mucosa y alcanzar la sangre; *c)* sobrevivir e incluso multiplicarse en ella (bacteriemia), y *d)* causar inflamación en las meninges (meningitis). La presencia del polisacárido capsular b (RPR) presenta una estrecha correlación con la virulencia en modelos animales.

El primer acontecimiento en la secuencia de la acción invasiva de *H. influenzae* es la adquisición del microorganismo. La inoculación de cepas del serogrupo b en la nariz de animales recién nacidos da lugar a una infección local. El microorganismo se detecta en la sangre entre 12 y 24 h después de la inoculación intranasal en el animal. Esta bacteriemia primaria siembra todas las superficies serosas: peritoneo, pleura, pericardio y meninges. La colonización con los cinco tipos capsulares restantes o con cepas no capsuladas determina una bacteriemia transitoria de baja densidad, incluso utilizando inóculos elevados.

Como se ha dicho, en condiciones no epidémicas, hasta un máximo del 5 % de los niños son portadores de gérmenes del tipo b; sin embargo, sólo uno de cada 100 niños portadores desarrolla una infección grave. Tanto las cepas capsuladas como las no capsuladas pueden adherirse a las células epiteliales del tracto respiratorio superior. Los factores que determinan que un niño se convierta en portador o enfermo son desconocidos. Los niños con

## INTRODUCCIÓN

---

infecciones graves causadas por el serogrupo b podrían ser portadores fecales de *E. coli* K100 con una frecuencia muy inferior a los controles sanos; dicha bacteria posee una cápsula inmunológicamente similar a la de *H. influenzae* serogrupo b.

### 1.1.4 CUADRO CLÍNICO

La bacteria causa dos tipos de infecciones: **agudas**, y potencialmente graves, y **crónicas**, en las que parece desempeñar un papel secundario u oportunista. Entre las agudas causa dos grandes clases de patologías: la llamada enfermedad invasiva (meningitis, septicemia, epiglotitis, celulitis, neumonía, artritis y otras), casi siempre grave, debida a cepas productoras de cápsula polisacárida del tipo b especialmente del biotipo I antes de la vacunación masiva frente a *H. influenzae* b, aunque otros serogrupos (a, e y f) pueden presentar un cuadro similar; y la **no invasiva** que afecta sobre todo al aparato respiratorio superior (otitis media, sinusitis y conjuntivitis) y otras mucosas, principalmente en la infancia.

Sin embargo, existen numerosas excepciones ya que a menudo las cepas no capsuladas causan infecciones invasivas en pacientes con una deficiente respuesta inmune como es el caso de la sepsis neonatal y la neumonía del anciano. Por último, en las infecciones crónicas *H. influenzae*, en general sin cápsula polisacárida, puede aislarse en el tracto respiratorio inferior de pacientes con fibrosis quística durante las crisis agudas de la enfermedad.

Asimismo, en los adultos desempeña un importante papel en las reagudizaciones de la enfermedad pulmonar crónica (Tabla 2).

## INTRODUCCIÓN

---

**Tabla 2.** Principales cuadros clínicos producidos por *Haemophilus influenzae* en relación con la edad del paciente.

Grupo de edad	Patología	Observaciones
Embarazadas	Fiebre puerperal	Cepas no capsuladas
Recién nacidos	Sepsis, neumonía	En general, cepas no capsuladas
Lactantes	Meningitis, sepsis, epiglotitis, neumonía, artritis, celulitis Fallo vacunal.	La mayoría, cepas capsuladas
Niños	Otitis, sinusitis, conjuntivitis, fibrosis quística	La mayoría cepas no capsuladas
Adultos	Bronquitis crónica, neumonía, sepsis, meningitis	Cepas capsuladas y no capsuladas, a menudo causas predisponentes

**Meningitis.** La sintomatología clínica más común incluye fiebre y alteraciones del sistema nervioso central como irritabilidad, vómitos, somnolencia, convulsiones y coma. Puede presentarse con un curso fulminante. A las 24 h de la aparición de los síntomas puede producirse un rápido deterioro neurológico, con aumento de la presión intracraneal, convulsiones, coma y parada respiratoria. La monitorización de la presión intracraneal puede ser esencial para mejorar la supervivencia y disminuir la morbilidad. Es conocida la asociación de meningitis por *H. influenzae* y anemia.

Con tratamiento antibiótico adecuado la mortalidad es inferior al 5 %. Las complicaciones de mayor importancia son: pérdida de audición (10 %), alteraciones del lenguaje (15 %), retraso mental (10 %), anomalías motoras (3-7 %), convulsiones (2-8 %) y alteraciones de la visión (2-4 %). En comparación con otros tipos de meningitis, la frecuencia observada de complicaciones es inferior a la causada por la meningitis neumocócica (en

## INTRODUCCIÓN

---

particular por lo que se refiere a las complicaciones del SNC), pero más elevada que la registrada en la meningitis meningocócica.

**Neumonía.** Su verdadera frecuencia es desconocida, tiende a diagnosticarse más la neumonía con bacteriemia, posiblemente más grave. La mortalidad media está en torno al 6% reflejando probablemente la asociación frecuente con otros focos infecciosos (otitis media, meningitis, epiglotitis, pericarditis), presentes en la mitad de los pacientes con neumonía. La edad de presentación es aproximadamente la misma que en la meningitis. El 65% tiene 2 años o menos; existe una predominancia de 2:1 a favor del sexo masculino. La mayoría de los pacientes presentan fiebre, tos y una infección previa de las vías respiratorias altas. El 50% de los casos tienen afección pleural. La neumonía se ha descrito también en niños prematuros que desarrollan la enfermedad en el primer día de vida, con un cuadro similar al causado por estreptococos del grupo B.

También se presenta la neumonía por *H. influenzae* en ancianos e inmunodeprimidos. Clínicamente no se distingue de la causada por *S. pneumoniae*; aunque la radiología puede ser de ayuda el hecho de que la reacción pleural es mucho más frecuente en el primer caso. El hemocultivo y el cultivo de aspirado pulmonar y del líquido pleural son las pruebas de diagnóstico etiológico más útiles. La detección de polisacáridos capsulares en suero y orina es un método rápido, aunque se han descrito falsos positivos.

**Epiglotitis.** Los niños con epiglotitis tienden a ser mayores (media, 38,5 meses) que los enfermos de meningitis, entre otros motivos por la formación de los senos. Con mayor frecuencia son del sexo masculino. Clínicamente, esta entidad se caracteriza por un inicio brusco de la fiebre, disfagia y aspecto tóxico del niño. El paciente escoge la posición más favorable para el mantenimiento del flujo aéreo y evita permanecer en decúbito supino; la radiografía lateral de garganta contribuye al diagnóstico. La función respiratoria del niño

## INTRODUCCIÓN

---

puede verse seriamente comprometida, por lo que en muchos casos se requiere la intubación nasotraqueal, que es preferible a la traqueotomía, excepto en casos de extrema urgencia y en el medio extra-hospitalario. Se trata de una enfermedad casi siempre bacteriémica.

**Artritis séptica.** Clínicamente no se distingue de la debida a *S. aureus*, siendo en niños menores de 2 años la segunda causa de artritis séptica por orden de frecuencia. En general se afectan las articulaciones de los huesos largos y en ocasiones puede acompañarse de una osteomielitis adyacente.

**Celulitis.** Generalmente afecta la cara, la cabeza o la garganta; la celulitis bucal casi siempre se presenta en niños menores de un año de edad. Es también casi invariablemente una enfermedad bacteriémica. Se puede encontrar un foco secundario, incluyendo meningitis, hasta en el 10 % de los casos, por lo que la enfermedad debe tratarse con antibióticos por vía intravenosa. Debe considerarse la presencia simultánea de otros focos.

**Osteomielitis.** La osteomielitis aislada causada por *H. influenzae* es rara. Suele localizarse en las extremidades superiores y es indistinguible de la causada por *S. aureus*.

**Pericarditis.** Esta posibilidad debe ser investigada en un niño febril, tóxico, con distrés respiratorio y sin signos radiológicos pulmonares. Puede presentarse en asociación con neumonía y meningitis. El procedimiento diagnóstico de elección es la pericardiocentesis. Es posible hallar niveles elevados de antígenos capsulares en el líquido pericárdico y en el suero. El ecocardiograma es una buena técnica diagnóstica para establecer la presencia del derrame pericárdico. Aunque el pericardio se esteriliza rápidamente con el tratamiento antibiótico intravenoso, la respuesta inflamatoria puede persistir, en cuyo caso es imprescindible el drenaje quirúrgico.

## INTRODUCCIÓN

---

**Infección neonatal y del tracto genital femenino.** En ocasiones, *H. influenzae* se ha aislado de casos de salpingitis y abscesos ováricos, con frecuencia asociado a la presencia de dispositivos intrauterinos o lesiones previas. Tanto *H. influenzae* como *H. parainfluenzae* pueden colonizar la mucosa vaginal y es probable que las prácticas sexuales orogenitales incrementen dicha colonización y el riesgo de infección secundaria. Las infecciones perinatales pueden afectar a la madre, al niño o a ambos, con bacteriemia o sin ella, y suelen acompañarse de un líquido amniótico turbio y maloliente. En la mayoría de los casos, los microorganismos causales no son capsulados. La infección en el neonato puede simular y presentar un cuadro clínico indistinguible de la infección de comienzo precoz causada por *Streptococcus agalactiae*. Las infecciones debidas al serogrupo b son más frecuentes después de los 30 días de vida, pero se ha observado hasta un 9 % de incidencia en el primer mes de vida. Estos hechos deben tenerse muy en cuenta al establecer la terapéutica antibiótica de cobertura.

**Fiebre purpúrica brasileña.** En 1984 se describió por primera vez en Brasil, en niños de 3 meses a 10 años de edad, una enfermedad que comienza con una conjuntivitis purulenta, causada por *H. influenzae* biogrupo *aegyptius*. En un porcentaje pequeño de pacientes la enfermedad progresa y cursa con fiebre y otras manifestaciones sistémicas debidas a una infección diseminada.

Si no se tratan, los pacientes presentan petequias y púrpura y fallecen por endotoxemia y shock. La presentación clínica es, pues, similar a la meningococemia, con la cual debe hacerse el diagnóstico diferencial. El microorganismo se puede aislar de sangre. La mayoría de los casos de fiebre purpúrica brasileña fueron causados por la diseminación de una clona única. El aumento de la virulencia se ha asociado a la presencia de un plásmido de 24 megadaltons.

**Otras infecciones.** Las cepas no tipificables de *H. influenzae* constituyen una causa de primera importancia como agentes causales de otitis media, sinusitis y conjuntivitis, sobre todo en niños. También se ha asociado con enfermedad pulmonar obstructiva crónica incluyendo bronquitis crónica, fibrosis quística y bronquiectasias.

### 1.1.5 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

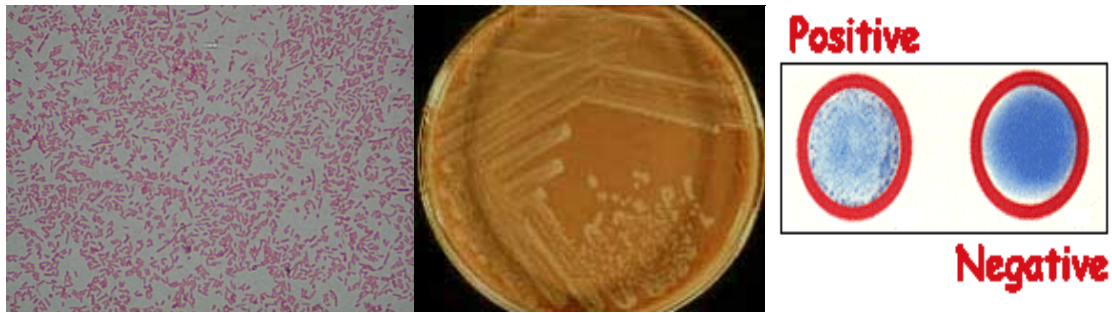
El LCR y la sangre son las muestras en las que con mayor frecuencia se aísla el serogrupo b y otros serogrupos. Es imprescindible transportarlas con rapidez al laboratorio y sembrarlas en medios de cultivo ricos en nutrientes como agar chocolate. Otras muestras en las que se puede aislar el microorganismo incluyen: líquido pleural, aspirado articular, pus y exudados de las vías respiratorias altas, conjuntival, ótico y, más raramente, vaginal. El examen microscópico del LCR es de gran importancia para el diagnóstico rápido de meningitis. Se puede intentar la detección precoz del antígeno RPR mediante el empleo de la técnica de aglutinación con partículas de látex o similar, teniendo en cuenta la posibilidad de reacciones cruzadas.

La aglutinación en porta y la co-aglutinación son los métodos comerciales utilizados para determinar el grupo capsular; ambos pueden dar lugar a casos de falsos positivos y negativos por lo cual se han desarrollado métodos por PCR para el genotipificado molecular (Figura 1).



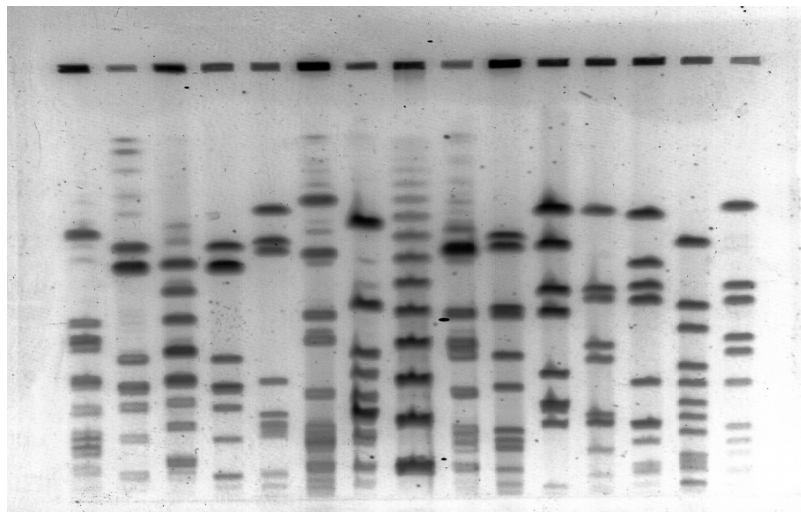
## INTRODUCCIÓN

---



**Figura 1.** *Haemophilus influenzae* al microscopio óptico tras tinción de Gram. Placa de agar chocolate con cultivo puro de *Haemophilus influenzae*. Aglutinación en látex con antisuero específico capsular frente al serotipo b.

Entre los métodos de epidemiología molecular más usados para determinar la identidad epidemiológica de *H. influenzae* se encuentran el análisis de los patrones electroforéticos en campos pulsantes del ADN total cortado con enzimas de restricción (generalmente *Sma*I) (PFGE-RFLP, según las iniciales en inglés). Actualmente el método MLST (*Multilocus Sequence Typing*) permite establecer diferentes relaciones filogenéticas entre grupos de cepas en base de las diferentes secuencias de varios genes constitutivos “housekeeping” (en el caso de *H. influenzae* está desarrollado frente a 7) (1,2) (figura 2).



**Figura 2.** Patrón electroforético (PFGE) de cepas de *Haemophilus influenzae* tras digestión con *Sma*I.

### 1.1.6 TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

La resistencia de *H. influenzae* a ampicilina se describió a mediados de los años 70; desde entonces se ha observado resistencia a otros beta-lactámicos, cloramfenicol, tetraciclina, aminoglicósidos, cotrimoxazol, rifampicina y fluorquinolonas. Las tasas de resistencia pueden ser muy variables aunque en general las cepas capsuladas son más resistentes que las no capsuladas y las aisladas de procesos respiratorios crónicos más resistentes que las productoras de infecciones agudas. La resistencia a ampicilina se debe generalmente a la producción de  $\beta$ -lactamasas del tipo TEM-1 plasmídica; otro mecanismo menos frecuente pero que parece estar aumentando es la modificación de la afinidad de las proteínas fijadoras de penicilina.

La resistencia múltiple es consecuencia de la acumulación de distintos genes de resistencia localizados tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano de la misma cepa. En España, el mecanismo más común de la resistencia múltiple entre las cepas de *H. influenzae* tanto capsuladas como no capsuladas, es la presencia de plásmidos grandes conjugativos que transportan diferentes genes de resistencia.

La elección del tratamiento antibiótico apropiado debe basarse en el conocimiento de los patrones de sensibilidad del área geográfica obtenidos por métodos de referencia, generalmente microdilución y Epsilon test o E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) en presencia de cepas de referencia de sensibilidad conocida; el método de difusión en agar (método Kirby-Bauer) (figura 3).

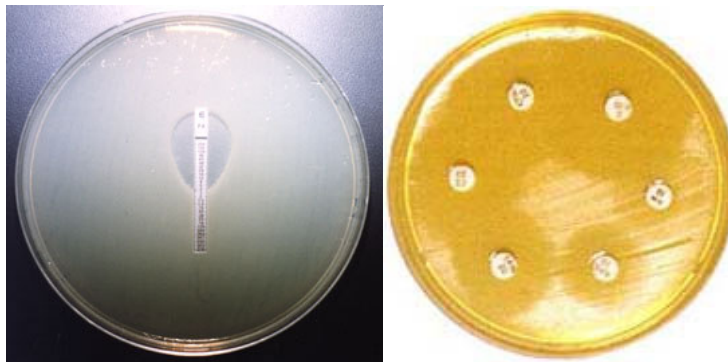
Ello implica que todas las cepas deben someterse a pruebas de sensibilidad “in vitro” así como a pruebas rápidas de producción de  $\beta$ -lactamasa sobre todo las cepas aisladas de procesos infecciosos graves, como meningitis y bacteriemia. Dados los niveles de resistencia a la ampicilina y otros antibióticos clásicos, una cefalosporina de tercera

## INTRODUCCIÓN

---

generación, como la cefotaxima o la ceftriaxona, debe ser el tratamiento de primera elección en infecciones graves. En España, *H. influenzae* presenta también niveles elevados de resistencia a cotrimoxazol, la asociación trimetoprima-sulfametoxazol, que parece relacionada a modificaciones en el gen de la dihidrofolato reductasa y que tiende a mantenerse en el tiempo a pesar de su escasa utilización clínica. La combinación de ampicilina y ácido clavulánico es eficaz en las cepas resistentes, productoras de  $\beta$ -lactamasa, causantes de infecciones de las vías respiratorias altas (sinusitis y otitis).

La duración del tratamiento de la meningitis y otras infecciones graves es de 7 a 10 días. Las dosis de cefotaxima recomendada en el tratamiento de la meningitis es de 200 mg/kg/24 h (4 dosis) y de 100 mg/kg/24 h para la ceftriaxona (2 dosis) (3-6).



**Figura 3.** Determinación de sensibilidad de *Haemophilus influenzae* en “*Haemophilus Test Medium*” (HTM). Métodos de E-test (a la izquierda) y difusión en agar (Kirby–Bauer) a la derecha.

### 1.1.7 EPIDEMIOLOGÍA Y PROFILAXIS.

La especie humana es el único reservorio conocido de *H. influenzae*. Las cepas más virulentas y que con mayor frecuencia son responsables de enfermedad invasiva son, como se ha mencionado, las capsulares, especialmente el serotipo b. Los antígenos específicos de este serotipo PRP se han utilizado para el desarrollo de vacunas.

La incidencia media anual de meningitis en EE.UU. era de unos 35-40 casos/100.000 niños menores de 5 años antes de la vacunación intensiva de la población

---

## INTRODUCCIÓN

---

infantil con la vacuna conjugada. En España, la incidencia se situaba en 10-15 casos/100.000. Después de la inmunización intensiva con la vacuna conjugada, la incidencia de la enfermedad se ha reducido drásticamente. Sin embargo, según la OMS la prevalencia de la enfermedad invasiva por Hib continua siendo muy elevada ya que la vacuna no se ha introducido en la mayoría de países en desarrollo por su falta de recursos. La máxima incidencia de meningitis y otras enfermedades invasivas se da a los 6-7 meses de vida; alrededor del 80 % de los casos tienen menos de un año de edad.

La primera generación de vacunas se basaba en el polisacárido capsular purificado (PRP), la experiencia clínica demostró que éstas vacunas presentan pocos efectos secundarios pero su principal desventaja era que la respuesta de anticuerpos y la eficacia protectora dependían de la edad ya que los niños de 18 meses o mayores respondían adecuadamente, pero en los menores de 18 meses, el grupo que presenta mayor susceptibilidad y la tasa de ataque más alta, no se lograba una protección adecuada. Además, la revacunación no inducía el aumento de la respuesta inmune (efecto “booster”).

En la segunda generación de vacunas, la estrategia utilizada para aumentar la inmunogenicidad del polisacárido fue conjugarlo con proteínas portadoras que aumentan la memoria inmunogénica ligada a los linfocitos T. Las proteínas empleadas son el toxoide tetánico, el toxoide diftérico y proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis*. Se han evaluado cuatro vacunas conjugadas: PRP-D (Connaught), PRP-T (Aventis-Pasteur), PRP-OMP (Merck-Frosst), 2 versiones y HbOC (Wyeth-Ayest). La más ampliamente estudiada es la que contiene el toxoide diftérico como coadyuvante. Cada una de estas vacunas se distingue por su proteína portadora, el tamaño del polisacárido, el tipo de unión polisacárido-proteína y la proporción de polisacárido-proteína. Todas son bien toleradas y dan

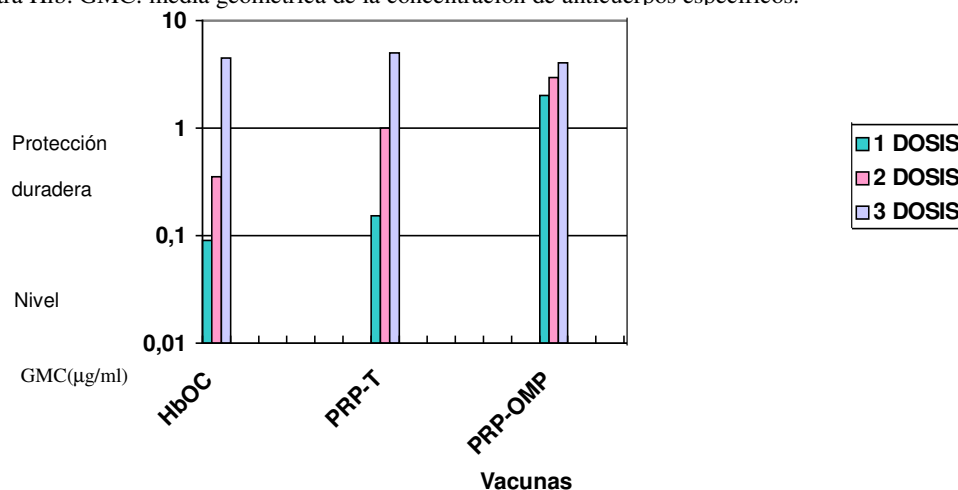
## INTRODUCCIÓN

lugar a un alto grado de protección aunque hay diferencias en su capacidad inmunógena. Las características específicas de las vacunas conjugadas actualmente disponibles se muestran en la tabla 3 y figura 4.

Tabla 3. Características de las vacunas contra Hib disponibles.

VACUNAS	Proteína	Composición	Presentación	Preservativo	Combinación
<i>PRP-D</i>	Toxoide diftérico	25µg PRP	Líquido monodosis	Mertiolate	PRP-D+DTP
<i>Pro-HIBIT</i>		18µg DT			
PRP-CRM 197	CRM 197	10µg PRP	Líquido monodosis	Mertiolate en multidosis	HbOC+DTP
<i>HibTITER</i>		15µg CRM 197	10 dosis		
PRP-OMP	OMP de <i>N. meningitidis</i> Grupo B	15µg PRP	Liofilizado monodosis	No	Sin datos
<i>PedvaxHib</i>		250µg OMP			
PRP-T	Toxoide tetánico	10µg PRP	Liofilizado monodosis	No	PRP-T reconst. con DTP
<i>Act.Hib</i>		20-40µg TT	10 dosis		
PRP-T	Toxoide tetánico	10µg PRP	Liofilizado monodosis	No	PRP-T reconst. con DTP, DTP-Hep B
<i>Hiberix</i>		20-40µg TT			
PRP-CRM 197	CRM 197	10µg PRP	Líquido monodosis	Mertiolate	Sin datos
<i>Vaxem-Hib</i>		25µg CRM 197			

Figura 4. Niveles de anticuerpos obtenidos tras la administración de 1, 2, ó 3 dosis de los diferentes tipos de vacuna conjugada contra Hib. GMC: media geométrica de la concentración de anticuerpos específicos.



## INTRODUCCIÓN

---

Para evitar sucesivas inyecciones, las vacunas conjugadas se suelen administrar al mismo tiempo y mezcladas con la vacuna DTaP desde los 2 primeros meses de vida, el calendario vacunal habitual incluye la administración a los 2-4-6 y 18 meses de vida. La vacuna conjugada además reduce la colonización por *H. influenzae* b. Aunque la vacuna conjugada reduce la incidencia de la enfermedad en más del 90% de los casos, se han descrito fallos vacunales relacionados en parte con enfermedades subyacentes inmunodepresoras.

El aislamiento de LCR y/o sangre de *H. influenzae* en un niños bien vacunado requiere la investigación detallada del caso para determinar si se trata de un fallo vacunal verdadero o de una infección con otros serotipos o bien una cepa no capsulada.

La Academia Americana de Pediatría recomienda administrar rifampicina a todos los contactos familiares cuando conviven niños de 4 años o menores, incluyendo el propio enfermo y los adultos, así como niños previamente vacunados. La dosis es de 20 mg/kg una vez al día durante 4 días para contactos menores de 12 años; los adultos reciben 600 mg una vez al día durante 4 días. En guarderías, se recomienda individualizar los criterios de administración; existe acuerdo en que todos los contactos deben ser tratados tras la aparición de 2 casos o más (7-10).

### 1.2 LA ENFERMEDAD INVASIVA POR *H. influenzae*. DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN GENERALIZADA CON LA VACUNA CONJUGADA DE *H. INFLUENZAE* SEROTIPO b

Como hemos dicho, después de la vacunación generalizada de las vacunas conjugadas, las infecciones graves por Hib y su prevalencia en portadores faríngeos sanos ha disminuido substancialmente (10,11) si bien se han descrito fallos vacunales (12,13).

## INTRODUCCIÓN

---

Desde principios de la década de los 90, la vacunación generalizada con la vacunas conjugadas frente Hib, ha reducido en una elevada proporción la prevalencia de las infecciones invasivas debidas a este microorganismo (12). Desde 1994 se encuentra disponible la vacuna conjugada Hib en España, su introducción en el calendario vacunal se ha llevado a cabo de forma paulatina en las distintas Comunidades Autónomas hasta generalizarse en 2000 (14-18).

Las campañas de vacunación dan lugar a un entorno epidemiológico nuevo. El descenso en el número de infecciones producidas por Hib podría favorecer la aparición de enfermedades causadas por otros serotipos o por otras especies de *Haemophilus* (5,19-21). En los EE.UU. se ha descrito el aumento de las infecciones causadas por Hif (19,20). En nuestra experiencia, las infecciones por Hif e Hie se producen sobre todo en pacientes con enfermedades predisponentes de base (5,20,21).

Desde el punto de vista de la salud pública es muy importante determinar el serotipo capsular implicado en todos los casos de infección invasiva por *H. influenzae*, especialmente ante un caso de en un niño bien vacunado porque: primero, es una información esencial para evaluar la eficacia de la vacuna, segundo, permite diagnosticar eventuales casos de fallo vacunal y tercero es el único modo de detectar eventuales cambios epidemiológicos que podrían dar lugar a la emergencia de otros serotipos y/o cepas no capsuladas.

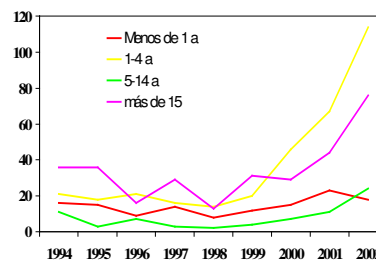
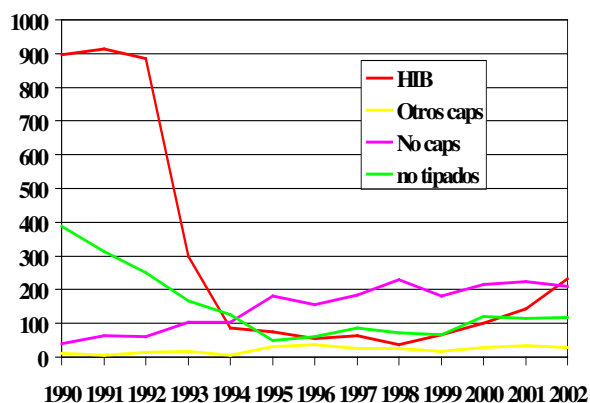
### 1.2.1. FALLOS VACUNALES

Se define aquí como fallo vacunal verdadero la enfermedad invasiva por *H. influenzae* tipo b, caracterizado por PCR ocurriendo: a) al menos 2 semanas después de recibir una dosis de vacuna conjugada por Hib en niños mayores de 1 año ó b) al menos 1 semana después de dos o más dosis en niños menores de 1 año (22).

## INTRODUCCIÓN

Aunque en la mayoría de los casos no se encuentra ningún factor de riesgo para sufrir fallo vacunal, en el 20-40% de los casos existen factores predisponentes del huésped, como prematuridad, deficiencia de IgGs y otros problemas inmunitarios (HIV, cáncer) (23). El estudio inmunitario del paciente puede orientar ante la sospecha de un fallo vacunal.

En la era prevacunal la incidencia anual europea de enfermedad invasiva por Hib en niños menores de 5 años era de 20-60 casos/100.000 habitantes con variaciones geográficas, el 60% de los casos eran meningitis. Se estima que en los países desarrollados en los que se han llevado a cabo programas de vacunación con Hib, se han logrado prevenir 40.000 casos/año de enfermedad invasora por Hib en niños de 0-4 años (24) (Figura 5). Aunque la conjugación de la vacuna PRP a proteínas ha permitido desarrollar nuevas vacunas que incrementan la inmunogenicidad y tienen capacidad de inducir memoria inmunológica, se siguen informando casos de enfermedad invasiva atribuible a Hib en países donde la vacuna se ha administrado de forma generalizada.



**Figura 5.** Evolución del nº de casos de enfermedad invasiva por Hib en Inglaterra y Gales en los distintos grupos de edad en los últimos 12 años

Inicialmente, los casos de fallo vacunal en niños eran esporádicos y sin aparente conexión epidemiológica, tanto en la experiencia inglesa (23) como o la española (12).



## INTRODUCCIÓN

---

En un artículo publicado en JAMA, en noviembre de 2000 por el Grupo de estudio de vacunas de Oxford, Reino Unido, se afirmaba que, aunque los niveles de anticuerpos anti-RPR de la vacuna conjugada de Hib y la protección clínica contra la enfermedad invasiva tienden a disminuir con el tiempo, este efecto es mínimo por lo que la administración de una dosis de recuerdo no era esencial según el esquema de vacunación inicial en el Reino Unido (24).

Sin embargo, en enero de 2003 la revista Lancet publica una primera carta en la que se alerta sobre la continuada amenaza de la enfermedad por Hib en el Reino Unido (25).

Los autores comunican dos casos de epiglotitis, cuadro clínico casi desaparecido en países occidentales desde la década de los 90 y shock séptico causados por Hib ingresados en un periodo de dos semanas, ambos bien vacunados según el esquema vigente en el Reino Unido de tres dosis de vacuna a los 2, 3 y 4 meses de edad. En febrero y mayo de 2003, nuevas cartas y artículos editoriales de la misma revista comunican nuevos casos de fallo vacunal y enfermedad invasiva en niños y orientan hacia sus posibles causas (13,26-29).

Se puede hablar pues del inicio de una situación epidémica de fallos vacunales en el RU. Una nueva carta publicada en mayo de 2003 por investigadores holandeses (30) refiere el retorno de las infecciones por Hib en Holanda.

Reino Unido y Holanda fueron los primeros países europeos que incorporaron la vacuna conjugada contra Hib en su calendario vacunal en 1992 y 1993, respectivamente. En el Reino Unido, en 1991, último año prevacunal, se produjeron 907 casos de enfermedad invasora por Hib, de ellos 802 (88,4%) en niños de 4 años o menores (31). En 1998, seis años después de la introducción de la vacuna, se produjeron únicamente 38 casos, 22 de ellos (57,8%) en niños de 4 años o menores. En 2001 tuvieron 144 casos (62,5% en niños) y 266 en 2002, un aumento considerable aunque inferior a la incidencia prevacunal (26). La incidencia

## INTRODUCCIÓN

---

poblacional más baja fue de 0,65 casos por 100.000 niños de menos de 5 años en 1998, pero a finales de 2002 había aumentado a 4,6 (13) que, aunque todavía alejado del 22,9 de 1990, alertó a pediatras, epidemiólogos y microbiólogos como un fenómeno clínico inesperado. El mayor incremento de los casos se produjo en niños entre 1 y 2 años de vida (25,27).

Entre las posibles causas que se han sugerido para explicar el aumento de fallos vacunales en el Reino Unido (26,28,29) se encuentran: Primera, un improbable descenso en las tasas de vacunación de la población o de la eficacia vacunal (lo que no parece ser el caso) y por tanto en la inmunidad de grupo (“Herd immunity”) junto a un aumento de la circulación de Hib en portadores y/o reintroducción de cepas procedentes de inmigrantes, adultos o niños no vacunados; segunda, la aplicación de un esquema reducido de vacunaciones sin dosis de recuerdo en el Reino Unido (24) útil en los primeros años en que los niños de uno a cuatro años fueron vacunados mediante un programa de “catch up” (en los que se ha demostrado una tasa de anticuerpos superior a los niños vacunados desde la infancia {31}), y tercera, problemas relacionados con la vacuna.

Los fallos vacunales no parecieron asociarse a ninguna marca o lote concreto, pero en los últimos años se ha incrementado el uso de vacunas conjugadas de Hib en combinación con otras, sobre todo con vacuna de *Bordetella pertussis* acelular (13,25). La vacuna tradicionalmente usada en el Reino Unido es la DTP (celular completa) combinada con Hib (PRP-T) (Aventis-Pasteur); a partir de 2000 se cambió a DtaP-Hib (PRP-T) (Infanrix) por problemas de suministro de la primera (M. Ramsay, comunicación personal).

Numerosos estudios han demostrado que la vacuna contra Hib combinada con con difteria-tétanos-*B. pertussis* acelular produce menos respuesta de anticuerpos que la vacuna celular completa; este efecto parece ser dosis-dependiente y más manifiesto en esquemas acelerados de vacunación (31-33). La reducción del título de anticuerpos hasta

## INTRODUCCIÓN

---

ahora se pensaba que carecía de trascendencia clínica ya que la respuesta inmune, aunque menor, parecía suficientemente protectora (31-33).

Sin embargo, en el Reino Unido en el que, como hemos dicho, no se administraba una dosis de recuerdo en el segundo año de vida, existía desde hace tiempo preocupación por las posibles consecuencias a largo plazo de este hecho (33).

Las causas de este problema no están del todo claras; las interferencias inmunológicas podrían atribuirse a la presencia de la proteína transportadora de la vacuna conjugada (como los toxoides tetánico y diftérico), los antígenos purificados del componente acelular de *B. pertussis* o bien otros componentes de la vacuna (estabilizadores, preservativos, coadyuvantes) (33,34).

Si bien las vacunas combinando distintos antígenos se han administrado con éxito en pediatría desde hace más de 50 años, la acelerada incorporación de nuevas vacunas obliga a la administración combinando de un número inusualmente elevado de antígenos. Este hecho eleva considerablemente la posibilidad de múltiples interacciones (35-37). Hasta ahora se han desarrollado un número limitado de proteínas transportadoras por lo que la incorporación de nuevas vacunas conjugadas contra *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* requiere la administración simultánea de varios antígenos polisacáridos conjugados con la misma proteína transportadora, lo cual podría ocasionar un problema de interferencia en la respuesta inmune (34).

Según la hipótesis más aceptada (13,25-29) el descenso de la respuesta inmune inducida por las vacunas combinadas que contienen *B. pertussis* acelular junto a la no administración de dosis de recuerdo, podría explicar el rápido aumento de casos de fallo vacunal (13,24-30). En consecuencia, en el Reino Unido se ha adoptado la decisión de la

## INTRODUCCIÓN

---

administrar una dosis de recuerdo a lo largo de 2003 a todos los niños entre 6 meses y 4 años (29), seguramente esta medida se acompañará de cambios en el calendario vacunal.

En Holanda el problema del aumento de los fallos vacunales parece tener un origen distinto al del Reino Unido y no ha sido bien explicado hasta la fecha. Desde 1993 utilizan la vacuna combinada con *B. pertussis* celular completa, con dosis de recuerdo incluida, a los 3, 4, 5 y 11 meses y la vacuna conjugada de Hib (RPT-T) administrada en inyección separada. Aunque se ha mencionado el posible efecto de la administración simultánea de la vacuna conjugada contra meningococo C, las razones del aumento del número de casos de fallo vacunal en niños holandeses son todavía casi desconocidas (30). Los datos iniciales apuntan a que los fallos vacunales tienen un origen más frecuente en zonas con tasas de cobertura vacunal más bajas (GT Rijkers, comunicación personal).

Hasta ahora no hay evidencia de que la situación descrita, es decir el aumento epidémico de los fallos vacunales por la vacuna Hib en contraste con los fallos vacunales esporádicos, sea generalizable a otros países como Finlandia, Canadá o España (12,38,39). En España no se ha detectado hasta ahora una situación epidémica de fallos vacunales aunque aquí se administra la vacuna combinada DTP-Hib con *B. pertussis* acelular, recomendada por el Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría (14) que incluye la administración de una dosis de recuerdo de vacuna Hib a los 18 meses. Sin embargo, la situación clínica y epidemiológica descrita es lo bastante seria como para alertar a los pediatras y aconseja realizar un estudio exhaustivo de todas las cepas de *H. influenzae* aisladas de LCR y/o sangre en niños vacunados.

Ello puede aumentar el riesgo de interacciones químicas e inmunológicas (35-37, 40) y una pérdida de eficacia vacunal bien con repercusión clínica (aparición de infecciones severas en niños bien vacunados) o sin ella (41).

## INTRODUCCIÓN

---

La situación descrita de incremento de casos de fallo vacunal justificaría el mantenimiento activo de los sistemas epidemiológicos de vigilancia de las enfermedades infecciosas de las que se dispone de vacuna (29,41). Reino Unido y Holanda, con excelentes sistemas públicos de vigilancia activa, son un buen ejemplo de ello (42,43).

### 1.2.2 EL PAPEL DE OTROS SEROTIPOS CAPSULADOS

Tras la introducción de la vacuna conjugada en el calendario vacunal (9-10) diversos autores plantearon la posibilidad de que se produjera en la población una sustitución del serotipo más frecuente en la etapa prevacunal (serotipo b) por otros serotipos diferentes que comparten el mismo nicho ecológico (5) (Figura 5). En concreto, en Estados Unidos se observó un aumento en la incidencia de los serotipos e y f, sobre todo éste último; la incidencia de enfermedad invasiva debida a *H. influenzae* serotipo f aumentó de 0,5 casos por 100.000 de habitantes en 1989 a 1,9 casos por 1,000,000 en 1994. Un aumento similar no se ha descrito para el serotipo e (19,44).

Ya nos hemos referido al interés que tienen el conocer el serotipo para evaluar la eficacia de la vacunación y los posibles cambios en la epidemiología de las infecciones debidas a *H. influenzae*. Recientemente los “Centers for Diseases Control and Prevention” (CDC) ha reconocido discrepancias y fallos importantes en cuanto a la determinación de los distintos serotipos en los laboratorios de USA (45). Dado el gran predominio clínico de Hib, el estudio de otros serogrupos ha recibido poca atención. (20,21). Así la información disponible en la literatura acerca de las infecciones debidas a Hie y Hif, se resume en algunos casos clínicos esporádicos de meningitis, neumonía y bacteriemia (19, 44, 46-59). Recientemente se han descrito en Italia cinco casos de enfermedad invasiva por *H. influenzae* serotipo e en adultos, todos ellos eran sensibles a ampicilina, cloramfenicol, tetraciclina y cotrimoxazol (60). Los datos aportados en este trabajo de tesis, sugieren que la epidemiología

## INTRODUCCIÓN

---

y la presentación clínica de las infecciones debidas a *H. influenzae* serotipos e y f es muy distinta a las de las infecciones invasivas clásicas producidas por el serotipo b. En nuestra casuística recogida en España, sólo un pequeño porcentaje de casos por otros serotipos se produce en niños menores de cinco años, la mayoría ocurren en pacientes adultos con alguna patología de base.

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

### 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

#### 2.1 JUSTIFICACIÓN

A partir de principios de los años 80, en España se describieron elevadas tasas de resistencia antibiótica en *H. influenzae* en general y en *H. influenzae* serotipo b en particular (3,4,61). En España se han comunicado, además, unas cifras de consumo de antibióticos en la comunidad que se encuentran entre las más elevadas de Europa (62).

Un hito muy importante en la evolución natural de la epidemiología y de la enfermedad invasiva por Hib fue la vacunación masiva de la población infantil con una nueva generación de vacunas en las que el polisacárido capsular se conjuga con proteínas portadoras. Esta vacuna es tan eficaz que rápidamente fue capaz de prevenir >90% de casos de meningitis y sepsis producidas por Hib en la población pediátrica susceptible, constituyendo así un avance sanitario de primer orden y cuyo modelo ha sido seguido posteriormente con otros patógenos como son meningococo y neumococo. Los estudios de campo posteriores a la vacunación mostraron, sin embargo, que en determinados casos se producían fallos vacunales que, en el caso del Reino Unido, llegaron a alcanzar proporciones epidémicas

La casi totalidad de países occidentales empezando con el Reino Unido y Holanda en 1992 incorporaron rápidamente la vacuna conjugada contra Hib en sus calendarios vacunales pasando así de una época pre-vacunal a otra post-vacunal en la que la epidemiología de Hib y de *Haemophilus* en general sufría cambios muy importantes y planteaba nuevos e interesantes retos. Entre ellos se encontraban la inquietud por la posible sustitución de serotipos, el conocimiento de las causas de los fallos vacunales y la evolución de la resistencia a los antibióticos en este patógeno ya que el serotipo b, como hemos dicho, era el que presentaba mayores tasas de resistencia a los antibióticos y el que acumulaba, por

---



tanto, mayor cantidad y variedad de determinantes de resistencia tanto cromosómicos como plasmídicos.

En España la información sistemática publicada acerca de la epidemiología, microbiología y la epidemiología molecular de la enfermedad invasiva producida por *H. influenzae* después de la vacunación generalizada con vacunas conjugadas contra Hib ha sido muy escasa (15-18, 62-65).

Por todo ello esta tesis se plantea como un intento de responder en parte a esos retos post-vacunales mencionados y así mismo responde a preguntas sencillas que la autora se formuló a sí misma como las siguientes:

- ¿Cómo es la enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* en la actual etapa post-vacunal?
- ¿En la etapa post-vacunal cómo ha evolucionado la resistencia a antibióticos en *H. influenzae* en España.
- A pesar de la gran eficacia de la vacuna conjugada contra Hib ¿se producen fallos vacunales? ¿Cómo son esos fallos vacunales?
- ¿Hay riesgo de la aparición de nuevas clonas “resistentes” a la vacuna como consecuencia de la enorme presión que la misma ejerce sobre la supervivencia de Hib?
- ¿Otros serotipos de *H. influenzae* distintos del b o bien cepas no capsuladas han sustituido a éste como causa de enfermedad invasiva?
- ¿Qué se sabe de otros serotipos? ¿Qué enfermedad producen? ¿Son también resistentes a los antibióticos?
- ¿Cuáles son los mecanismos predominantes de resistencia a antibióticos en la actualidad en *H. influenzae* en España?

### 2.2 OBJETIVOS

GENERAL: Evaluar la incidencia de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* en la población general tras la vacunación generalizada con la vacuna conjugada de Hib con el fin de conocer las características demográficas de los enfermos infectados por esta bacteria, sus diagnósticos clínicos y posibles factores de riesgo asociados, la epidemiología molecular de las cepas causales y estudiar su sensibilidad a los antibióticos y de sus determinantes de resistencia en comparación con el consumo de antibióticos en la misma población.

#### ESPECIFICOS:

1. Conocer la incidencia de *H. influenzae* causante de enfermedad invasiva tras la administración de la vacuna conjugada de Hib en la CAM.
  - a. Estudiar las características demográficas, diagnósticos clínicos y factores de riesgo asociados a la población afectada.
  - b. Estudiar la epidemiología molecular de las cepas causales.
  - c. Conocer la sensibilidad de las cepas invasivas de *H. influenzae* estudiadas a los antibióticos usados habitualmente en el tratamiento frente a ellas .
  - d. Estudiar las cifras de resistencia en comparación con el consumo de antibióticos.
2. Estudiar las características de Hib causante de fallos vacunales tras la administración de la vacuna conjugada de Hib en 2 colecciones de cepas: Española (CNM) y de Reino Unido (PHLS).
  - a. Estudiar las características demográficas, diagnósticos clínicos y factores de riesgo asociados a la población afectada.
  - b. Estudiar la epidemiología molecular de las cepas causales.

- c. Conocer la sensibilidad de las cepas invasivas de *H. influenzae* estudiadas a los antibióticos usados habitualmente en el tratamiento frente a ellas
3. Conocer la incidencia y la importancia clínica de otros serotipos capsulados de *H. influenzae* distintos del serotipo b en la población general tras la administración de la vacuna conjugada de Hib en España.
  - a. Estudiar las características demográficas, diagnósticos clínicos y factores de riesgo asociados a la población afectada.
  - b. Estudiar la epidemiología molecular de las cepas causales.
  - c. Conocer la sensibilidad de las cepas invasivas de *H.influenzae* estudiadas a los antibióticos usados habitualmente en el tratamiento frente a ellas.
4. Conocer los genes más frecuentes relacionados con la resistencia a cotrimoxazol, ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS** (Organizado por objetivos)

#### **3.1 CONOCER LA INCIDENCIA DE *H. influenzae* CAUSANTE DE ENFERMEDAD INVASIVA TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA CONJUGADA DE HIB EN LA CAM.**

##### **3.1.1 PACIENTES**

##### **A) ESTUDIO CLÍNICO Y POBLACIONAL**

Durante el periodo de estudio, comprendido desde Enero de 1999 a Diciembre de 2000 se estudiaron todos los pacientes con enfermedad invasiva por *H. influenzae* diagnosticados en los laboratorios clínicos de la CAM. Se definió la enfermedad invasiva como “caso de infección con *H. influenzae* aislado de una muestra clínica estéril”. Al inicio del estudio, se consultó el censo oficial de habitantes y hospitales de la CAM. La población total fue de 5.022.289 de personas. Se contactó con todos los laboratorios de microbiología clínica de todos los hospitales de la CAM tanto al principio del estudio como con regularidad una vez iniciado éste. Se solicitó de los microbiólogos que enviaran todas sus cepas invasivas de *H. influenzae* al LNRH del CNM, Instituto de Salud Carlos III.

Las historias clínicas de los pacientes fueron revisadas posteriormente por un médico epidemiólogo. En cada caso se completó un protocolo clínico elaborado previamente que incluyó datos de identificación del paciente, cuadro clínico y diagnóstico de enfermedades predisponentes de base y evolución clínica. Se calculó la incidencia general, expresada en casos por 100.000 personas /año y la incidencia específica por grupos de edades. La incidencia en niños de edad  $\leq 4$  años se comparó con datos obtenidos en 1994, antes de que las vacunas conjugadas contra Hib estuvieran disponibles en la CAM (66).

### 3.1.2 MICROORGANISMO

#### A) IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

En el laboratorio de referencia, se procedió a determinar la identificación completa de las cepas, a realizar pruebas de sensibilidad antibiótica y a estudiar su epidemiología molecular.

La identificación del género *Haemophilus* se realizó de acuerdo con los métodos recomendados (2), e incluyeron la tinción de Gram (identificándose como coco-bacilos pequeños Gram-negativos polimórficos) y las necesidades nutricionales para su desarrollo: factores de crecimiento presentes en la sangre como protoporfirina IX (factor X) y/o nicotinamida dinucleótido (NAD) (factor V). La clasificación dentro de las distintas especies se basó en los requerimientos de los factores X y V, la prueba de la porfirina y la utilización de azúcares (glucosa, sacarosa, lactosa y ribosa) (Tabla 1).

Todas las cepas de *H. influenzae* se aglutinaron mediante un preparado comercial (Phadebact *Haemophilus* Test, Boule Diagnostics AB, Huddinge, Sweden) frente a antisueros específicos del serotipo “b” y una mezcla de antisueros específicos de los serotipos “a”, “c”, “d”, “e” y “f”. En el caso de aglutinación positiva se procedió a la determinación del tipo capsular mediante sueros específicos obtenidos tras la vacunación de conejos con cepas de referencia de los serogrupos “a” a “f”. En último término, como método de referencia, se utilizó el genotipado molecular mediante PCR (67), de uso habitual en el laboratorio y considerada de referencia (68). Se describe en detalle a continuación.

#### A) Obtención del ADN.

Se suspendió un asa del cultivo fresco del microorganismo en 200 µl de H<sub>2</sub>O. Posteriormente, se hirvió durante 10 min, se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min y se recogió el sobrenadante que fue almacenado a -20°C.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l, con la siguiente composición:

- Agua bidestilada estéril : 20,75  $\mu$ l
- PCR Buffer: 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCl (Roche, Barcelona, España)
- MgCl<sub>2</sub>: 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Roche)
- DNTPs: 200 $\mu$ M dATP; 200 $\mu$ M dCTP; 200 $\mu$ M dGTP; 200 $\mu$ M dTTP (Pharmacia Biotech, Orsay, France)
- Cebadores: 1 $\mu$ M de cada uno (Pharmacia)
- Taq polimerasa: 2.5 U de Taq polymerase (Roche)
- ADN bacteriano: 5  $\mu$ l del extracto bacteriano

B) Cebadores (“primers”) utilizados y condiciones de amplificación. Los cebadores utilizados para la amplificación el gen *bexA* de la cápsula y sus posibles mutaciones (IS1016), se describen en la tabla 5. Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn), con las siguientes condiciones de amplificación: i) desnaturalización de las muestras a 95°C durante 5 min; ii) 25 ciclos de amplificación: 95°C durante 1 min; 1,5 min a 42°C; 1 min a 72°C para la polimerización; iii) y para la extensión completa de los amplicones se realizó un ciclo final de 72°C durante 7min.

C) Electroforesis en gel y visualización del producto. Para observar los resultados de la amplificación, se tomaron 5  $\mu$ l de las muestras amplificadas y se sometieron a electroforesis convencional en geles de agarosa MS-8 (Pronadisa, Madrid, España) al 1% en TE 1 $\times$  durante 30 minutos a 100 voltios. Los geles se tiñeron en una solución de 1  $\mu$ g /ml de bromuro de etidio en agua y se visualizó el producto amplificado en un transiluminador de luz ultravioleta (300 nm de longitud de onda), para fotografiarse a continuación. El marcador de

peso molecular utilizado fue el Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, Burlington, ON, Canada).

La determinación del biotipo se llevó a cabo según el método descrito por Kilian (69) basado en la producción de indol, urea y ornitina descarboxilasa (Tabla 4).

**Tabla 4.** Diferenciación de los distintos biotipos de *H. influenzae*

<b>Biotipo</b>	<b>Indol</b>	<b>Ureasa</b>	<b>Ornitina descarboxilasa</b>
Biotipo I	+	+	+
Biotipo II	+	+	-
Biotipo III	-	+	-
Biotipo IV	-	+	+
Biotipo V	+	-	+
Biotipo VI	-	-	+
Biotipo VII	+	-	-
Biotipo VIII	-	-	-

### **B) ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA**

La determinación de la CMI se llevó a cabo mediante la técnica de microdilución en caldo siguiendo las normas del NCCLS, (70). El medio líquido utilizado fue *Haemophilus* Test Medium (HTM) que se preparó con caldo Muller-Hinton (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) suplementado con HTM Supplement (Oxoid) y extracto de levadura (0,5%) (Difco, Detroit, MI). Las placas de microdilución se inocularon con una densidad final del inóculo de aproximadamente  $5 \times 10^5$  ufc/ml. El volumen final en cada



pocillo era de 200  $\mu$ l. Las placas una vez inoculadas fueron incubadas entre 20-24 horas a 35°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> antes de la lectura de los resultados.

Se llevó a cabo el recuento bacteriano final para comprobar la fiabilidad del inóculo utilizado. Como cepas control del estudio de sensibilidad se utilizaron las cepas de referencia *H. influenzae* no tipificables ATCC 49247, ATCC 49766 y ATCC 51907 (cepa Rd) y la cepas de referencia *H. influenzae* serotipo e ATCC 8142.

Los antibióticos estudiados se indican en la Tabla 7 según el método utilizado.

Para determinar la producción de  $\beta$ -lactamasa se utilizó nitrocefín, como sustrato, una cefalosporina cromogénica que muestra un rápido cambio de color del amarillo al rojo cuando el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico es hidrolizado por la  $\beta$ -lactamasa.

### C) ESTUDIOS MOLECULARES

#### Electroforesis en campo pulsante

Se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE)(Figura 6). Las distintas fases de su desarrollo fueron:

A) Obtención del ADN cromosómico. Se siguió la técnica descrita por Lee (71) para la tipificación de *H. influenzae* pero con las siguientes modificaciones: i) se procedió a la extracción a partir de un cultivo fresco de 18 horas en medio sólido de agar chocolate; ii) se midió, por espectrofotometría a 420 nm, la cantidad de inóculo bacteriano a resuspender en el tampón de lavado (10 mM tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA y 1 M de NaCl, pH 7.5) con el fin de obtener un intervalo de absorbancia 0,9-1,1 (ajustando así la solución a 10<sup>9</sup> ufc/ml); iii) dicha solución se mezcló con agarosa “multipurpose” al 2 % V/V (Roche), para la realización de los bloques; iv) se incubaron con la solución de lisis (250 mM EDTA, 20 mM EGTA, 1% (w/v) de lauril-sarcosil pH 7.5) y 0.25 mg/ml de proteinasa K, durante una noche a 50°C, con recambio al día siguiente e incubación de tres horas; v) se procedió a realizar al menos 4 lavados de los bloques con TE pH 7,2 y se almacenaron a 4°C.

B) Digestión del ADN. Se cortaron porciones de bloques del ADN contenido en agarosa y se estabilizaron con 100  $\mu$ l del buffer de la enzima de restricción utilizada, durante 30 min a 4°C. El ADN fue digerido en 100  $\mu$ l de mezcla de digestión con 10-15 U/ml del enzima SmaI (MBI-Fermentas), incubando durante cuatro horas a 30°C y cambiando la mezcla de digestión a las dos horas.

C) Condiciones de electroforesis y visualización del DNA en geles de agarosa. Para la separación de los fragmentos de DNA, se cargaron los bloques en una agarosa multipurpose al 1% (Roche) en tampón TBE 0,5x (TBE 10X: 44,5 mM tris-borato/ EDTA Na<sub>2</sub> 1mM pH8). Se utilizó el equipo de electroforesis CHEF-DRIII (Biorad, Hemel Hempstead, UK) (Figura 8), aplicando las siguientes condiciones: pulsos iniciales de 5 segundos y pulsos finales de 50 segundos, 6 voltios/cm<sup>2</sup>, durante 24 horas y temperatura de 12°C.

Como control de peso molecular se utilizó el concátmero lambda (PFGE marker I, Roche) con el rango 48,5-970 kpb. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (1  $\mu$ g/ml) en agua destilada, se visualizaron en un trans-iluminador de luz ultravioleta y posteriormente se fotografiaron.

D) Definición de los perfiles de PFGE. En una primera fase, los fragmentos de restricción fueron visualmente comparados e interpretados de acuerdo con los criterios de Tenover (72).

**Figura 6.** Instrumentación para la electroforesis en campo pulsante (PFGE).



### **Análisis de los datos de tipificación obtenidos**

A) Índice de discriminación. El índice numérico de discriminación (ID), indica la probabilidad de que dos cepas no relacionadas, tomadas de la población analizada, se sitúen en diferentes grupos de tipificación y viene determinado por el número de tipos definidos por el método aplicado y la frecuencia relativa de esos tipos. Se calcula por el índice de la diversidad de Simpson (73) con la siguiente ecuación:

$$ID = 1 - [\sum n_j (n_j - 1) / N(N-1) ]$$

N: número total de cepas en la muestra

S: número total de tipos descritos

$n_j$ : número de cepas pertenecientes al tipo j.

Presenta un valor que oscila entre 0 y 1, un valor de 1 nos indicaría que si se seleccionasen al azar en la población de estudio dos cepas no relacionadas, en el 100% de las repeticiones de la técnica de tipado, estarían en distintos grupos de tipificación.

B) Relación filogenética. El análisis de convergencia genética entre los diferentes tipos genómicos generados por PFGE se realizó por la determinación del grado de similitud entre los perfiles de bandas obtenidos. Mediante la utilización de un método cualitativo que consiste en codificar la presencia o ausencia de bandas en el perfil, como 1 ó 0, respectivamente (74). Estos datos fueron procesados aplicando el coeficiente de similitud de Dice (75). Dicho coeficiente expresa la proporción de fragmento de DNA compartidos entre dos perfiles, aplicando la siguiente fórmula:  $S = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$

$n_x$ : número total de bandas del perfil x

$n_y$ : número total de bandas de y

$n_{xy}$  : número de bandas comunes entre los dos perfiles

Si se obtiene un valor de  $S=1$  indica que los dos perfiles son idénticos. Del análisis resulta una matriz de similitud entre perfiles y un dendograma de similitud o árbol filogenético de similitudes genéticas, que agrupa los perfiles más parecidos.

El índice de correlación de Dice se aplicó mediante el programa Molecular Analyst Software (BioRad, Madrid), representándose mediante el método algorítmico de agregación UPGMA, que permite representar gráficamente las relaciones entre las cepas en orden creciente de similitud. La posición de tolerancia utilizada fue del 1%. En este análisis computerizado, se consideraron las bandas correspondientes a fragmentos de peso molecular (pm) superior a 48 kpb (entre 7 y 10).

### C) Estimación del tamaño molecular de los fragmentos de ADN.

El cálculo del peso de los fragmentos obtenidos por PFGE se obtuvieron directamente mediante el programa Molecular Analyst Software (Biorad). Todas las cepas clínicas fueron estudiadas por electroforesis de su ADN total en campos pulsantes (pulsed, field gel electrophoresis, PFGE) después de la digestión del ADN con la enzima *SmaI* (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) y separación de los fragmentos en geles de agarosa al 1% en 0,5 X TBE buffer con el sistema BioRad CHEF Mapper apparatus. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y fueron iluminados con luz ultravioleta. Los fragmentos de ADN se compararon primero visualmente y después fueron analizados mediante el método UPGMA “clustering” y el coeficiente de Dice, disponibles en el programa Molecular Analyst Program (BioRad, Madrid, Spain).

### **Detección de Plásmidos Conjugativos**

La detección plásmidos conjugativos de *H. influenzae* se realizó mediante la técnica de PCR según los cebadores que se indican en la tabla 5 descritos previamente por Leaves et al (76). Las condiciones de amplificación fueron: i) desnaturalización de las muestras a 94°C durante 5 min; ii) 30 ciclos de amplificación: 94°C durante 1 min; 1 min a

55°C; 1 min a 72°C para la polimerización; iii) y para la extensión completa de los amplicones se realizó un ciclo final de 72°C durante 10 min.

**Búsqueda de cepas deficientes en cápsula del serotipo b**

La búsqueda de cepas con el fenotipo b- se realizó mediante PCR (67) según Leaves et al. (77); los cebadores descritos en la tabla 5 y las siguientes condiciones de amplificación: i) desnaturalización de las muestras a 94°C durante 5 min; ii) 25 ciclos de amplificación: 95°C durante 1 min; 1 min a 60°C; 2 min a 72°C para la polimerización; iii) y para la extensión completa de los amplicones se realizó un ciclo final de 72°C durante 10 min.

**Tabla 5.** Cebadores utilizados para la detección la cápsula de *H. influenzae*, la detección de plásmidos conjugativos y la búsqueda de cepas b-.

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia nucleotídica</b>	<b>Nº pb</b>
<b>Cápsula (<i>bexA</i>, IS1016)</b>		343
HI-1	5'-CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC -3'	
HI-2	5'-TGCCATGTCTTCAAAATGATG-3'	
<b>Plásmidos conjugativos</b>		
<b>1er grupo</b>		370
F1	5'-TCAGTAATGTTTGTATCAGCC-3'	
R2	5'-CGTGTACCTAGACAATACAC-3'	
<b>2º grupo</b>		410
F2	5'-GTGTATTGGCTAGGTACACG-3'	
R1	5'-GGGAGCTTCTTCAGTTAAAG-3'	
<b>3er grupo</b>		240
F2	5'-GTGTATTGGCTAGGTACACG -3'	
Y1	5'-ACACCTTTCGGTGCTTACTT-3'	
<b>Cepas b- (<i>hcsB</i>)</b>		311
ORF6	5'-GTTATTACTTGCGTGATCGT-3	

### **D) CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS**

Los datos de consumo de antibióticos se obtuvieron a partir de la base de datos del Ministerio de Sanidad español que mantiene los registros de las prescripciones de los medicamentos con cargo al Sistema Nacional de Salud (78,79). El total de ventas expresadas en gramos fue convertido en unidades estándar internacionales (Dosis diarias definidas o DDD) del principio activo de cada antibiótico según la metodología de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999). A continuación se obtuvo el número de DDDs por 1000 habitantes y día (DHD) teniendo en cuenta los registros oficiales de la población.

#### **3.1.3 TRATAMIENTO GENERAL DE LOS DATOS Y CÁLCULOS ESTADÍSTICOS**

Se llevaron a cabo con los programas: Whonet (WHO/CSR/DRS/99.1, World Health Organization) y GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

Las diferencias encontradas en algunas de las variables categóricas estudiadas entre diferentes grupos se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher. El grado de asociación se determinó mediante el cálculo del intervalo de confianza (IC) al 95%. Se rechazó la hipótesis nula para valores de  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron con el programa EPI-Info versión 6.04.

### **3.2 ESTUDIAR LAS CARACTERÍSTICAS DE HIB CAUSANTE DE FALLOS VACUNALES TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA CONJUGADA POR HIB EN 2 COLECCIONES DE CEPAS: ESPAÑOLA (CNM) Y DE REINO UNIDO (PHLS).**

#### **3.2.1 PACIENTES**

##### **A) ESTUDIO CLÍNICO Y POBLACIONAL**

**España.** En 1996, por primera vez en España se introduce la vacuna conjugada frente Hib en los programas oficiales de vacunación. Primero en algunas Comunidades

Autónomas hasta hacerse extensivo a todo el país. El LNRH activó un programa de vigilancia con el fin de caracterizar en su caso el fenotipo y el genotipo de las cepas causantes en el contexto general de un estudio europeo similar. El laboratorio se puso en contacto con microbiólogos y epidemiólogos del sistema público de salud para que enviaran información acerca de los casos, así como las cepas causantes de los mismos. Además se solicitó una muestra de suero para determinar el nivel de anticuerpos anti-RPR y se remitió un protocolo clínico que incluía datos de identificación del paciente, datos clínicos, factores e riesgo (prematuridad, enfermedades de base, inmunodepresión, enfermedades congénitas), datos sobre el tipo de vacuna administrada así como el nº de lote.

En paralelo a las cepas procedentes de fallos vacunales verdaderos y como controles prevacunales históricos, se estudiaron 8 cepas de Hib cuyas referencias son: 23095, 1494, 2995, 4194, 11194, 4394, 0994, y 3295, todas ellas aisladas entre 1994 y 1995 de pacientes de edad, diagnóstico clínico y procedencia geográfica similar a las de los pacientes que presentaron fallo vacunal.

**Reino Unido.** La recogida de datos y el estudio poblacional en Reino Unido se hizo de forma análoga en el “*Haemophilus* Reference laboratory”, PHLS, Health Protection Agency, al pertenecer también al grupo europeo de estudio de los fallos vacunales (“Invasive Bacterial Infections Surveillance in the European Union (EU-IBIS/*H. influenzae*)” y European Biomed Study, CE/DG Sanco. El mencionado laboratorio disponía de la colección de cepas inglesas de fallos vacunales para el estudio europeo que se completó posteriormente con nuevas cepas pertenecientes a 100 pacientes adicionales, representativas del 2º periodo de fallos vacunales en el RU de carácter más epidémico, con el fin de poder determinar las posibles variaciones epidemiológicas entre las cepas aisladas en diferentes épocas.

La definición utilizada de fallo vacunal verdadero en los estudios ingleses, tal y como se mencionada en la introducción, fue: enfermedad invasiva causada por *H. influenzae*

---

tipo b, caracterizado por PCR ocurriendo: a) al menos 2 semanas después de recibir una dosis de vacuna conjugada por Hib en niños mayores de 1 año ó b) al menos 1 semana después de dos o más dosis en niños menores de 1 año (22).

### 3.2.2 MICROORGANISMO

#### A) DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS

**España.** Las cepas objeto de estudio fueron todos los aislamientos españoles sospechosos de ser fallo vacunal recibidos por el LNRH durante el periodo de estudio.

**Reino Unido.** Se recibieron en el mismo laboratorio un total de 376 cepas de Hib aisladas en Inglaterra y Gales desde 1991 hasta 2003, 164 cepas procedentes de casos clínicos de fallo vacunal y 212 procedentes de controles. Los controles históricos procedían de infecciones invasivas en pacientes de edades, diagnóstico clínico y localización geográfica similares a los pacientes con fallo vacunal. Las cepas se dividieron en 3 periodos El **primero** desde 1991 hasta 1993, que incluye Hib invasivos aislados en 144 niños y 20 adultos procedentes de la era prevacunal y considerados controles históricos. Constituyen una representación de la enfermedad natural invasiva por Hib en Inglaterra y Gales antes de que la vacuna estuviera disponible para su uso generalizado en la población infantil. El **segundo** desde 1993 hasta 1999, incluye 134 cepas invasivas de Hib aisladas en niños correctamente vacunados, considerados por tanto fallos vacunales verdaderos y el **tercero** desde 2000 hasta 2003, que incluye cepas de Hib aisladas durante la fase más aguda de aparición de fallos vacunales y la forman 30 casos infantiles de fallo vacunal verdadero y un grupo control o de casos de enfermedad invasiva por Hib en personas sin vacunar; 29 niños y 19 adultos.

La cepa Eagan fue utilizada como control de Hib positivo conocido. Todos estos datos se resumen en la tabla 6.



**Tabla 6.** Procedencia clínica de las cepas del estudio de fallos vacunales por Hib. Distribución y clasificación temporal.

<b>PROCEDENCIA CLÍNICA</b>	<b>Nº de cepas (%)</b>
<b>FALLOS VACUNALES</b>	<b>164 (43.5)</b>
1 <sup>er</sup> Periodo (1993-1999)	134 (35.5)
2 <sup>o</sup> Periodo (2000-2003)	30 (8.0)
<b>CONTROLES</b>	<b>212 (56.5)</b>
Controles históricos infantiles (Antes de 1993)*	144 (38.3)
Controles actuales infantiles (niños no vacunados)	29 (7.8)
Controles históricos en adultos (Antes de 1993)*	20 (5.3)
Controles actuales en adultos (2000-2003)	19 (5.1)
<b>TOTAL</b>	<b>376 (100)</b>

\*Vacuna no disponible

## **B) IDENTIFICACIÓN MICROBIANA**

Los dos laboratorios de referencia de Inglaterra y España identificaron las cepas de Hib de sus propios países si bien los estudios de epidemiología molecular mediante PFGE fueron realizadas en LNRH (CNM). Los métodos empleados se detallan en el apartado 3.1.2. de Identificación bacteriana.

## **C) RESPUESTA INMUNOLÓGICA**

Las muestras de suero procedentes de niños con sospecha de fallo vacunal fueron enviadas a un laboratorio de Inmunología de referencia para el estudio Europeo para la determinación del nivel de anticuerpos anti RPR (Radcliffe Hospital, Oxford University, UK, Dra. Helen Griffiths). Los niveles de anticuerpos, inmunoglobulina IgG anti-RPR fue cuantificado mediante técnicas de ELISA tal y como se había descrito previamente (23). Los niveles de anticuerpos  $\geq 1,0 \mu\text{g/ml}$  fueron considerados protectores (Figura 4) (80).

## **D) ESTUDIOS MOLECULARES**

### **Electroforesis en campo pulsante**

**España y Reino Unido.** Con el fin de hacer comparaciones en la epidemiología molecular de las cepas de Hib, se empleó la técnica de electroforesis en campo pulsante y se realizó un análisis de los datos de tipificación obtenidos tal y como se describe en el apartado 3.1.2. Hib (81), se incluyeron los controles mencionados en el prólogo del apartado 3.2.2.

Además para las cepas de Reino Unido, se utilizó una nueva versión del programa utilizado que permitió completar los estudios con el análisis de la multi-varianza de los patrones de bandas obtenidos (Fingerprinting II, Informatix TM Software. BioRad 2000. Alfred Nobel Drive. Hercules, CA 94547)

### **Epidemiología molecular de la estructura capsular del serotipo b de *H. influenzae* (cap b)**

**España.** En las cepas españolas se procedió al estudio de la estructura molecular genotipado de la cápsula de *H. influenzae* serotipo b..

Para el mismo, a todas las cepas de *H. influenzae* tanto de casos como de controles y a la cepa Hib de referencia Eagan, se les realizó una técnica de “Southern blot” usando un sonda capsular pUO38, sonda de ADN correspondiente a una región cromosómica implicada en la síntesis y expresión de la cápsula del tipo b (proporcionada por el Dr. S Kroll, Imperial College of Science, Technology, and Medicine, London, UK). La técnica ya publicada (82) se describe a continuación con algunas modificaciones.

Los primeros pasos de la técnica son idénticos a los de PFGE y se detallan en el apartado 3.1.2. Partimos del gel después de la electroforesis.

A) TRATAMIENTO DEL GEL. Se aclara el gel varias veces con pasos sucesivos en agua destilada, solución de desnaturalización con NaCl, 1,5 M / NaOH, 0,5 M, agua destilada y solución de neutralización con NaCl, 1,5 M / Tris-Cl,0,5 M, Ph 7.

B) TRANSFERENCIA. Se realiza en soporte de cristal con el fin de transferir las bandas de ADN desde el gel a una membrana de nylon (Amersham Life Science Ltd, Arlington Heights, IL). i) Se cubre el soporte de cristal con papel de Whatman 3MM y se humedece con una solución llamada SSC 20X compuesta por NaCl, 3 M / Na<sub>3</sub> Citrato 2H<sub>2</sub>O, 0,3 M con cuidado de que no se formen burbujas, los extremos del papel deben estar dentro de una cubeta con SSC 20X. ii) Se enmarcan los 4 lados con parafilm y se coloca el gel sobre el papel con el DNA hacia arriba. iii) Se coloca sobre él una membrana de nylon del mismo tamaño del gel (300 cm<sup>2</sup>) previamente humedecida en SSC 10X. (Manipular la membrana siempre con guantes limpios y por los extremos, cortar de ella el extremo superior derecho o anotar con lápiz la fecha en la cara que no contacta con el gel, dónde no estará el DNA y evitar la formación de burbujas). iv) Se cubren los 4 lados con parafilm y se forma una pirámide de transferencia hasta el día siguiente. v) Una vez seca la membrana, se fija o inmoviliza irradiándola con luz UV 3 ó 4 minutos por el lado en el que se encuentra el ADN hacia abajo. vi) Se envuelve en “film” transparente adherente denominado en inglés “Saran-wrap” protegiéndolo de la luz hasta su uso o se introduce en la bolsa de hibridación para continuar la técnica.

C) MARCADO DE LA SONDA. Se realizó mediante un ensayo de “random prime” y para ello se siguieron las instrucciones de un preparado comercial que utiliza fluoresceína como marcador (Gene Images random prime labelling module, Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Seguidamente se continuó con el ensayo de hibridación o bien se añadió 100 µl de EDTA 20 mM y se guardó a -20°C, durante un tiempo máximo de una semana hasta proceder a la hibridación.

D) HIBRIDACIÓN Y LAVADOS DE LA MEMBRANA. La hibridación se realizó en tampón de hibridación compuesto por una solución de SSC 5X: 25ml de solución de origen 20X, SDS 0,1X: 3,01 gr, dextrán-sulfato 5%: 5 gr, reactivo de parada de la reacción o

“blocking reagent” 1:20: 5 ml en 70 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Se necesitan 37,5 ml puesto que son 0,125ml/cm<sup>2</sup> y nuestra membrana es de 300 cm<sup>2</sup>.

En las bolsas para ese fin y unas condiciones apropiadas, se introduce la membrana y la sonda marcada desnaturalizada y centrifugada, con el fin de que el ADN fijo a la membrana y la sonda hibriden. Se incuba durante toda la noche, en agitación, a 60°C . ii) Al día siguiente se procede a los lavados de la membrana a 60°C con las soluciones de lavado 1 y 2 , en agitación.

E) DETECCIÓN. Se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del preparado comercial adecuado (Gene Images CDP-Star detection module, Amersham Corp., Arlington Heights, IL) en la misma bolsa de hibridación y de lavados. Se procede como sigue: i) Se añade anti-fluoresceína-conjugada, ii) se lava varias veces con tampón y iii) se detiene la reacción mediante la adición de un reactivo de parada. Iv) Por último se deja secar la membrana en papel secante.

F) REVELADO. I) Se realiza en carcasa de radiografía poniendo brevemente en contacto la placa de la radiografía con la membrana de nylon tras el paso anterior. Ii) tras el contacto se añaden las soluciones de revelado y fijado en obscuridad. Iii) Finalmente, la placa se aclara y se deja secar al aire.

### **Análisis de los datos de tipificación obtenidos**

Se realizó siguiendo los mismos criterios aplicados al PFGE (ver apartado 3.1.2) y además en la colección inglesa se realizó un análisis preliminar de los datos mediante el programa Multi-Variate Statistical Package (MVSP) software, vs. 3.13m (1985-2004 Kovach Computing Services).

### 3.2.3 TRATAMIENTO GENERAL DE LOS DATOS Y CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

Se utilizaron las mismas bases de datos y criterios detallados en el apartado 3.1.3.

### 3.3 CONOCER LA INCIDENCIA DE OTROS SEROTIPOS CAPSULADOS DISTINTOS DEL SEROTIPO B DE *H. influenzae* EN LA POBLACIÓN GENERAL TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA CONJUGADA DE HIB EN ESPAÑA.

#### 3.3.1 PACIENTES

##### **A) ESTUDIO CLÍNICO Y POBLACIONAL**

A partir de 1996 en que se incluyó la vacuna conjugada (Hib) en las campañas regulares de vacunación en España, el LNRH desarrolló un programa activo centrado en la caracterización fenotípica y genotípica no sólo de las cepas de *H. influenzae* serotipo b (ver apartado 3.3.1) sino de otros tipos capsulares. El laboratorio se puso en contacto con microbiólogos y epidemiólogos del sistema público de salud para que enviaran información acerca de los casos de infección por de *H. influenzae* capsulados, así como las cepas causantes de los mismos. Los datos del historial clínico de los pacientes se examinaron retrospectivamente mediante un protocolo clínico que incluía datos de identificación del paciente, diagnóstico y patología de base.

#### 3.3.2 MICROORGANISMO

##### **A) DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS**

En este apartado del presente trabajo de tesis las cepas objeto de estudio son todas las cepas de *H. influenzae* capsuladas no pertenecientes al serotipo b en el periodo de estudio (1996-2003) las cuales se enviaron al LNRH, CNM.

Las cepas utilizadas como controles positivos de otros serotipos fueron dos del serotipo e (NCTC 10479 y ATCC 8142) y una del serotipo f (ATCC 9833).

##### **B) IDENTIFICACIÓN MICROBIANA**

Se utilizaron los mismos procedimientos descritos en el apartado 3.1.2.

### **C) SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA**

Se estudiaron los mismos antibióticos y con los mismos procedimientos descritos en el apartado el 3.1.2.

### **D) ESTUDIOS MOLECULARES**

Se aplicó la técnica de PFGE siguiendo la metodología y criterios descritos en el apartado 3.1.2 en la sección de estudios moleculares.

El análisis de los datos de tipificación obtenidos también se hizo igual al descrito en esta sección, apartado 3.1.2.

La detección de plásmidos conjugativos también se hizo siguiendo las pautas citadas en esta sección y apartado 3.1.2.

### **Técnica de Multi-Locus Sequence Typing (MLST)**

Las cepas de la colección de los serotipos e y f obtenidas fueron estudiadas mediante la técnica de MLST en colaboración con el equipo del Dr. Brian Spratt. El esquema de MLST para *H. influenzae* ha sido desarrollado tanto frente a cepas tipificables o capsuladas como frente a no capsuladas. La base de datos inicial se creó a partir de los perfiles alélicos de los 131 aislamientos provenientes de la publicación de Meats et.al. (83) y otros posteriores . Tanto el esquema como la base de datos han sido creadas por en Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College de Londres que lidera el Dr. Brian Spratt.

A) OBTENCIÓN DEL PERFIL ALÉLICO Y COMPARACIÓN DE LAS CEPAS CON LAS DE LA BASE DE DATOS. El perfil alélico de *H. influenzae* se obtiene a partir de la secuenciación de fragmentos internos de 7 genes constitutivos (los llamados genes *house-keeping*). Los cebadores son los mismos para la amplificación inicial que para la secuenciación. Las secuencias se introducen en la base de datos de la web <http://haemophilus.mlst.net> en las dos direcciones porque cualquier error podría conducir a la

descripción de un nuevo alelo. Una vez introducidas las secuencias se les asigna un número y el perfil alélico igual al de las cepas introducidas que sean iguales. En caso de que sea nuevo, recibirá un número adicional y consecutivo de ST. La base de datos permite también construir árboles filogenéticos.

B) CEBADORES Y CONDICIONES DE PCR. Los cebadores se muestran en la tabla 6. Las condiciones de PCR se resumen a continuación.

PCR inicial. Se realiza en una placa de microtiter de formato de 96 pocillos y se emplea un volumen de reacción de 50µl. Se utiliza un termociclador “PTC-200 DNA engine” (MJ Research Inc., Waltham, Ma) programado con una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 min, seguida de 30 ciclos de 95°C durante 30 seg, 55°C durante 30 seg, 72°C durante 60 seg y mantenimiento de las muestras a 72°C durante 10 min, refrigerado a 4°C y conservación a -20°C.

A) Purificación del producto amplificado. Los fragmentos amplificados se precipitan usando al 20% PEG<sub>8000</sub>/2.5M NaCl, se lavan 2 veces con etanol al 70%, se desecan y se resuspenden en agua destilada.

B) Secuenciación. Se utiliza un kit comercial al que se le añaden los mismos primers de PCR inicial (ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Ca) y un secuenciador ABI3700 DNA sequencer. Las secuencias directa y reversa se recortan al tamaño adecuado y previamente descrito en la base de datos y se editan. Posteriormente se introducen en la misma para su comparación siguiendo las instrucciones de la página (<http://haemophilus.mlst.net>).

**Tabla 6.** Cebadores empleados para detectar los fragmentos de ADN de los 7 genes constitutivos estudiados. Todos tienen una secuencia de 20 (pb).

Cebador	Secuencia nucleotídica	Cebador	Secuencia nucleotídica
adk-up	5'-GGTGCACCGGGTGCAGGTAA-3'	adk-dn	5'-CCTAAGATTTTATCTAACTC-3'
atpG-up	5'-ATGGCAGGTGCAAAAGAGAT-3'	atpG-dn	5'-TTGTACAACAGGCTTTTGCG-3'
frdB-up	5'-CTTATCGTTGGTCTTGCCGT-3'	frdB-dn	5'-TTGGCACTTTCCACTTTTCC-3'
fucK-up	5'-ACCACTTTCGGCGTGGATGG-3'	fucK-dn	5'-AAGATTTCCCAGGTGCCAGA-3'
mdh-up	5'-TCATTGTATGATATTGCCCC-3'	mdh-dn	5'-ACTTCTGTACCTGCATTTTG-3'
pgi-up	5'-GGTGAAAAAATCAATCGTAC-3'	pgi-dn	5'-ATTGAAAGACCAATAGCTGA-3'
recA-up	5'-ATGGCAACTCAAGAAGAAAA-3'	recA-dn	5'-TTACCAAACATCACGCCTAT-3'

### 3.3.3 TRATAMIENTO GENERAL DE LOS DATOS Y CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

Se realizó siguiendo los mismos procedimientos descritos en el apartado 3.1.3.

### 3.4 CONOCER LOS GENES DE RESISTENCIA MÁS FRECUENTES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A COTRIMOXAZOL, AMPICILINA, CLORAMFENICOL Y TETRACICLINA.

Entre 1994 y 2003, en el LNRH del CNM, se ha llevado a cabo la vigilancia de la sensibilidad a diversas familias de antibióticos, de las cepas de *Haemophilus spp.* recibidas desde toda la geografía española (aproximadamente unas 600 cepas anuales).

#### 3.4.1 PACIENTES

##### A) POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron cepas representativas de todas las poblaciones bacterianas incluidas en los objetivos de la tesis y cuyas características se describen en el siguiente apartado.



### 3.4.2 MICROORGANISMO

#### **A) DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS**

Las cepas en las que se investigó la presencia de genes de resistencia se seleccionaron a partir de las colecciones de estudio de manera que fueran representativas de las diferentes clases de resistencia a cada uno de los antibióticos así como de los diferentes serotipos encontrados.

#### **B) IDENTIFICACIÓN MICROBIANA**

Se siguió la metodología descrita en los apartados anteriores. Se incluyeron 58 cepas de *H. influenzae* de distintos serotipos: catorce b, catorce e, catorce f y dieciséis no tipificables o sin cápsula.

Las cepas incluidas en el estudio de sensibilidad a trimetoprima fueron:

- 1. Grupo de cepas sensibles y cepas control: formado por 21 cepas de *H. influenzae*: Cinco cepas del serotipo b y la cepa de referencia Eagan, cuatro cepas del serotipo e y la cepa de referencia del serotipo e, ATCC 8142, cuatro cepas del serotipo f y tres cepas no tipificables y las cepas de referencia no tipificables ATCC 51907 o cepa Rd, ATCC 49247 y la cepa MAP. La selección de estas cepas se llevó a cabo en base a los siguientes criterios: similar fecha de aislamiento, área geográfica, diagnóstico clínico, origen de la muestra, tipo de cápsula y biotipo que las cepas del segundo grupo.

- 2. Grupo de cepas resistentes: formado por 37 cepas de *H. influenzae* que presentaban una CMI a trimetoprima  $> 1 \mu\text{g/ml}$ .

#### **C) DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA UTILIZADOS**

La determinación de la CMI de los distintos antimicrobianos en la totalidad de las cepas de *H. influenzae* había sido estudiada mediante las técnicas de micro-dilución en

caldo (ver apartado 3.1.2). Pero además en las cepas de esta colección seleccionada, se utilizaron las técnicas de dilución en agar y E-test (AB Biodisk,) para la determinación de sensibilidad a algunos antibióticos (Tabla 7 y Figura 7).

La técnica de **dilución en agar** utilizada para el estudio de la sensibilidad a trimetoprima fue una modificación del método de referencia recomendado por el NCCLS para otros microorganismos (70). A partir de un cultivo fresco del microorganismo en agar chocolate se realizó un inóculo directo de colonias aisladas en solución salina y se ajustó la turbidez de la suspensión hasta un McFarland 0,5. Las placas de HTM Base (Oxoid) suplementado con HTM Supplement (Oxoid) con antibiótico fueron inoculadas con un replicador de Steers, obteniéndose un inóculo final de  $10^5$  ufc/ depósito. Una vez inoculadas las placas se dejaron a temperatura ambiente hasta que el depósito del microorganismo estuviese completamente seco. Luego fueron incubadas entre 20-24 horas a 35°C con 5% CO<sub>2</sub> antes de su lectura. La CMI se definió como la concentración más baja de antibiótico que inhibía el crecimiento bacteriano. Los antibióticos estudiados, al igual que el resto de los antimicrobianos, fueron proporcionados por sus respectivos laboratorios fabricantes, como sustancias valoradas y de potencia conocida.

El método de **E-test** se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor (AB Biodisk,). Para cada cepa se inocularon dos placas de 150 mm con HTM agar (Oxoid) con una suspensión bacteriana ajustada a una turbidez equivalente a la escala McFarland 0,5 y se dejaron secar al aire. En cada placa se pusieron seis tiras de E-test. Las placas se incubaron entre 18-24 horas a 35°C con 5% CO<sub>2</sub>. La lectura del valor de CMI se hizo en la inserción entre la elipse de inhibición y la tira, luego se ajustó a la dilución convencional superior más próxima para permitir la comparación con los otros métodos aplicados.

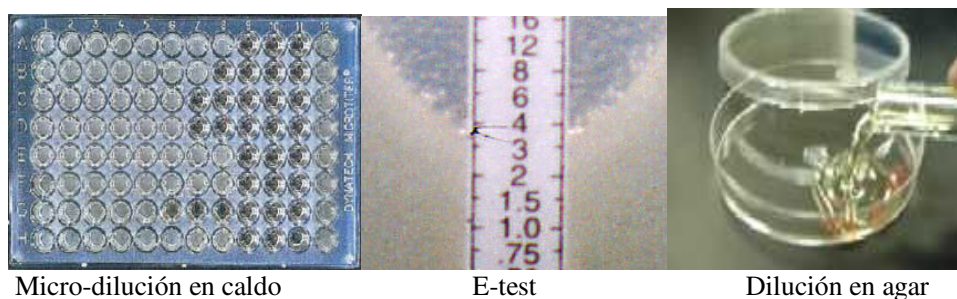
En todos los métodos se llevó a cabo un recuento bacteriano para comprobar el inóculo final utilizado. Como cepas de control de sensibilidad conocida se utilizaron las cepas

## MATERIAL Y METODOS

de referencia *H. influenzae* no tipificables ATCC 49247, ATCC 49766 y ATCC 51907 (cepa Rd) y la cepa de referencia *H. influenzae* serotipo e ATCC 8142.

La producción de  $\beta$ -lactamasa se determinó según el método de la cefalosporina cromogénica anteriormente descrito.

**Figura 7.** Detalle de las tres técnicas usadas para el estudio de la sensibilidad antibiótica de *H. influenzae*.



**Tabla 7.** Antibióticos incluidos en el estudio de sensibilidad

Microdilución		Dilución en agar	E-test
<b><math>\beta</math> lactámicos</b>	<b>Fluoroquinolonas</b>	Trimetoprima	Cotrimoxazol
Ampicilina	Levofloxacin		Trimetoprima
Amoxicilina-	Ciprofloxacina		Sulfametoxazol
Clavulánico	Cotrimoxazol,		
Cefuroxima	Tetraciclina,		
Cefotaxima	Cloramfenicol		
Cefixima	Rifampicina		
Cefepime			
Meropenem			
<b>Macrólidos</b>			
Claritromicina			

### **D) CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA DE *H. influenzae*.**

Se estudiaron los principales mecanismos genéticos de resistencia de *H. influenzae* a cotrimoxazol (trimetoprima y sulfametoxazol), ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina. Los métodos empleados se describen a continuación.

#### **Determinación de la resistencia a trimetoprima**

##### **A) SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA DIHIDROFOLATO REDUCTASA *folA* Y SU PROMOTOR**

El estudio del gen de la dihidrofolato reductasa (*folA*) y su promotor, implicados en la resistencia a trimetoprima en *H. influenzae* (84) se realizó mediante PCR y secuenciación. Los cebadores usados fueron los que se muestran, junto a los de los otros genes en la tabla 8.

Seguidamente se realizó la secuenciación partiendo del producto de amplificación de esta primera PCR como a continuación se describe.

A) Purificación del producto de PCR. Los productos fueron purificados con el equipo de purificación de PCR (Quiagen, Hilden, Germany).

B) Reacción de Secuenciación. La secuenciación de *folA* y su promotor se realizó en ambas cadenas de DNA con los mismos cebadores utilizados en la amplificación, y las siguientes condiciones de amplificación: i) desnaturalización de las muestras a 94°C durante 3 min; ii) 25 ciclos de amplificación: 96°C durante 10 seg; 5 seg a 50°C; 4 min a 60°C para la polimerización y con el equipo de secuenciación “Big Dye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit” (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos fueron analizados mediante el secuenciador Abi prism<sup>f</sup> 377 DNA Sequencer.

C) Análisis de las secuencias. El análisis de la secuencia de nucleótidos y su posterior traducción a secuencia aminoacídica se realizó con el soporte informático “DNASTar” software (Madison, WI). Los programas de alineamiento utilizados fueron el “DNASTar” y Clustal W.A (European Bioinformatic Institute). Con estos programas se llevó a cabo el análisis de las mutaciones tanto no silentes como las silentes.

El alineamiento y análisis filogenético de las secuencias se realizó con los soportes informático MEGA version 3.0 (“Kumar 2004”) y Clustal W EMBL-EBI.

### B) ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS PRESENTES EN *folA* Y SU PROMOTOR.

Tanto para el gen *folA* como para su promotor se hizo el cálculo del número de posiciones variables por cada 100 bp tanto para las mutaciones no silentes como en las silentes.

Dentro de los polimorfismos silentes (SNP) se consideraron diferentes niveles en la frecuencia de aparición: i) **polimorfismo de baja frecuencia**, como aquel SNP presente en menos de un 25% de las cepas; ii) **polimorfismo de media frecuencia**, SNP encontrado entre el 25% de las cepas y menos del 50%; iii) **polimorfismo de alta frecuencia**, SNP identificado entre un 50% y menos del 75% de las cepas; iv) **polimorfismo de muy alta frecuencia**, SNP presente en más de un 75% de las cepas secuencias.

También se determinó el número de SNPs acumulados en las distintas secuencias del gen *folA* y de su promotor. A cada variante de secuencia (incluso en un solo nucleótido) se le asignó un número correlativo, y cada una de las citadas variantes fue considerada un alelo distinto.

Con el fin de representar gráficamente las relaciones genéticas entre los alelos encontrados, se obtuvo un árbol filogenético o dendograma mediante la estimación de las distancias genéticas entre todas las posibles parejas de secuencias plasmadas en una matriz de

distancias. La distancia genética se midió en función del número de nucleótidos sustituidos entre dos secuencias, luego se construyó el árbol filogenético aplicando un algoritmo de agregación.

El método de agregación utilizado fue el “Neighbor-joinig”, el cual identifica parejas de secuencias que reducen al mínimo la longitud total del árbol. El programa “MEGA” se utilizó para construir el árbol filogenético mediante el método “Neighbor-joinig”. Para determinar la fidelidad del árbol se aplicó el método estadístico “Bootstrap”. Este método construye el árbol consenso a partir de 500 árboles obtenidos reorganizando las distintas secuencias.

### C) OBTENCIÓN DE MUTANTES *IN VITRO* RESISTENTES A TRIMETOPRIMA

A partir de la cepa Rd y la cepa MAP cuyas CMI a trimetoprima fueron: 0,047 y 0,19 µg/ml, respectivamente, se obtuvieron mutantes isogénicos “in vitro” de la forma que a continuación se describe.

**A)** Tras crecimiento de 18 h. en agar chocolate se inoculó un asa de siembra en 6 ml de “Brain Heart Infusión Broth” (BHI) (Oxoid) enriquecido con suplemento para “*Haemophilus* Test Medium” (HTM) (Oxoid) y extracto de levadura (0.5%) (Difco, Detroit, MI) incubándose 3 h a 37°C en agitación.

**B)** Tras centrifugar el sedimento, se resuspendió en 1 ml de PBS y se sembraron 100 µl de la suspensión bacteriana en placas de HTM con 1 µg/ml de trimetoprima. Tras incubación a 37°C se hicieron dos lecturas a las 24 y 48 horas resemebrando las colonias obtenidas en agar chocolate.

**C)** Los mutantes fueron identificados como *H. influenzae* y se determinó su CMI a trimetoprima mediante dilución en agar y en todos ellos se secuenció el gen *folA* y su promotor.

Las frecuencias de mutación se obtuvieron dividiendo el número de mutantes obtenidos entre la población bacteriana total utilizada. Los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### **Determinación de la resistencia a sulfametoxazol**

Basándonos en lo descrito previamente en la literatura (85), mediante PCR (ver apartado 3.1.2) se determinó la presencia o no de un gen plasmídico responsable de la resistencia a este antibiótico (*sul2*) en *H. influenzae* y *E. coli*. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn), con las siguientes condiciones de amplificación: i) desnaturalización de las muestras a 95°C durante 3 min; ii) 40 ciclos de amplificación: 95°C durante 1 min; 1 min a 55°C; 1 min a 72°C para la polimerización; iii) y para la extensión completa de los amplicones se realizó un ciclo final de 72°C durante 4 min.

Además de forma metodológicamente idéntica y con las mismas técnicas utilizadas con trimetoprima (ver más arriba), se secuenció en algunos casos (ver resultados), el gen *folP*, gen de la dihidrofolato sintetasa.

### **Determinación de la resistencia a otros antibióticos**

El estudio de los genes de resistencia a los antibióticos ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina, se llevó a cabo, en todos los casos, mediante PCR. Los cebadores empleados se muestran en la tabla 8 y las condiciones de PCR que para cada caso se detallan a continuación.

#### **A) RESISTENCIA A AMPICILINA**

Se llevó a cabo la determinación de los genes *tem*, mediante PCR tal y como se describe en la literatura (86). Las condiciones de amplificación fueron las mismas descritas en el apartado 3.1.2 para la “Detección de plásmidos conjugativos”.

### B) RESISTENCIA A CLORAMFENICOL

Se llevó a cabo la determinación de los genes *cat* más comunes que codifican la producción de cloranfenicol-acetil-transferasas (CAT), mediante PCR tal y como se describe en la literatura (87,88). Se utilizaron cebadores para detectar los tres más frecuentemente descritos en la literatura científica en bacterias Gram-negativas (tabla 8). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: i) desnaturalización de las muestras a 94°C durante 2 min; ii) 34 ciclos de amplificación: 94°C durante 30 seg; 30 seg a 50°C; 30 seg a 72°C para la polimerización; iii) y para la extensión completa de los amplicones se realizó un ciclo final de 72°C durante 10 min.

### C) RESISTENCIA A TETRACICLINA

Se llevó a cabo la detección de los genes *tet* más frecuentemente descritos en *H. influenzae* y otros patógenos, mediante PCR. Dichos genes están implicados en la producción de resistencia a este antibiótico principalmente a través de 2 mecanismos: protección ribosómica (*tetM*, *tetO*) o eflujo o achique (*tetM2*, *tetR*, *tetK*, *tetB*). Se utilizaron cebadores previamente descritos en la literatura (89,90) (tabla 8) y las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn), con las siguientes condiciones de amplificación: i) desnaturalización de las muestras a 94°C durante 5 min; ii) 35 ciclos de amplificación: 94°C durante 1 min; 1 min a 55°C; 1,5 min a 72°C para la polimerización; iii) y para la extensión completa de los amplicones se realizó un ciclo final de 72°C durante 10 min.

### 3.4.3 TRATAMIENTO GENERAL DE LOS DATOS Y CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

Todos los cálculos se realizaron de tal y como se describen en el apartado 3.1.3.



## MATERIAL Y METODOS

**Tabla 8 .** Descripción de los cebadores específicos utilizados en el estudio de genes de resistencia.

Genes de resistencia	Cebador	Secuencia nucleotídica	Nº pb
<b>Gen <i>folA</i></b>	<i>folA</i> D	5'-GACGGATCCCAAGCCTGAATTAATTGGCTC-3'	30
	<i>folA</i> R	5'-CTAGAATTCAGTTGCAGTTTTGCGTCATAAT-3'	31
<b>Promotor</b>	Pro- <i>folA</i> D	5'-GAAATCCATCATTGTGCAGTT-3'	21
	Pro- <i>folA</i> R	5'-AAATCTGCAGGCAAGTGCCAA-3'	21
<b>Gen <i>folP</i></b>	<i>folP</i> D	5'-CGTCCGTCATTCCTTTAT-3'	18
	<i>folP</i> R	5'-ACTGCCTATCACTCTCTG-3'	18
<b>Plásmido <i>sul2</i></b>	<i>sul2</i> D	5'-TCGTCAACATAACCTCGGACAG-3'	23
	<i>sul2</i> R	5'-GTTGCTTTGATACCGGCAC-3'	19
<b><i>tem</i></b>	<i>TemI</i> D	5'- TGGGTGCACGAGTGGGTTAC-3'	20
	<i>TemI</i> R	5'-TTATCCGCTCCATCCAGTC-3'	20
<b><i>cat</i></b>	<i>CatI</i> D	5'-TGCTCGCTTCGCTACTT-3'	17
	<i>CatI</i> R	5'-TGGCGGGACCAGTGACG-3'	17
	<i>CatII</i> D	5'-CCTGGAACCGCAGAGAAC-3'	18
	<i>CatII</i> R	5'-CCTGCTGAAACTTTGCCA-3'	18
	<i>CatIII</i> D	5'-ATTGGGTTCCCGTGAGC-3'	18
	<i>CatIII</i> R	5'-AGTCTATCCCCTTCTTG-3'	18
<b><i>tet</i></b>	<i>tetM</i> D	5'-GTGGACAAAGGTACAACGAG-3'	19
	<i>tetM</i> R	5'-CGGTAAAGTTCGTACACAC-3'	20
	<i>tetO</i> D	5'-AACTTAGGCATTCTGGCTCAC-3'	19
	<i>tetO</i> R	5'-TCCCCTGTTCATATCGTCA-3'	19
	<i>tetM2</i> D	5'-GAACTCGAACAAGAGGAAAAGC-3'	20
	<i>tetM2</i> R	5'-ATGGAAGCCCAGAAGGA-3'	17
	<i>tetR</i> D	5'-ATGTCTAGATTAGATAAAAG-3'	22
	<i>tetR</i> R	5'-CTAGTGAAAAACCTTGTGGC-3'	21
<i>tetK</i> D	5'-TCGATAGGAACAGCAGTA-3'	18	

## MATERIAL Y METODOS

---

<i>tetK</i> R	5'-CAGCAGATCCTACTCCTT-3'	18
<i>tetB</i> D	5'-TTGGTTAGGGGCAAGTTTG-3'	20
<i>tetB</i> R	5'-GTAATGGGCAATAACACCG-3'	20

D: cebadores directos; R: cebadores reversos .

## **RESULTADOS**

### 4. RESULTADOS (Organizado por objetivos)

#### 4.1 CONOCER LA INCIDENCIA DE *H. influenzae* CAUSANTE DE ENFERMEDAD INVASIVA TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA CONJUGADA DE HIB EN LA CAM.

##### 4.1.1 PACIENTES

##### A) ESTUDIO POBLACIONAL

Durante el periodo de estudio (Enero de 1999-Diciembre de 2000), 113 pacientes tuvieron infecciones invasivas causadas por *H. influenzae*. La distribución por hospitales y áreas de salud se muestra en las tablas 9 y 10. En 75 casos (66,4%) fueron hombres y en 38 (33,6%) fueron mujeres ( $p < 0,001$ ). La incidencia global fue de 1,25 casos/100.000 habitantes en 1999 y 0,99 casos/100.000 habitantes en 2000, sin que esta diferencia fuera estadísticamente significativa. La incidencia media del periodo de estudio fue de 1,12 casos/100.000 personas por año. En 4 casos (3,5%) la edad del paciente era desconocida, en los restantes 109 enfermos, 85 (78%) fueron adultos ( $>14$  años) y 28 (25,7%) fueron niños ( $\leq 14$  años); 22 pacientes (20,2%) tuvieron una edad  $\leq 4$  años y 14 (12,8%)  $< 1$  año.

La incidencia de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* fue superior en pacientes de edad  $\leq 14$  años que en aquellos de edad superior a los 14 años ( $p < 0,001$ ). La mayor frecuencia de enfermedad invasiva se observó en niños de edad inferior a 1 año, con 16,3 casos/100.000 habitantes. En adultos, la mayor incidencia se observó en el grupo de pacientes de edad superior a los 70 años (Figura 8).

RESULTADOS

**Tabla 9.** Aislamientos de *H. influenzae* causantes de enfermedad invasiva en hospitales de la Comunidad Autónoma de Madrid. Se expresan el nº de casos y el porcentaje por hospital de procedencia entre los años 1999 y 2000.

Hospital	Nº casos 1999	%	Nº casos 2000	%	Total	%
H.U. Gregorio Marañón	17	27	11	22	28	24,8
H.U. Príncipe de Asturias	6	9,5	4	8	10	8,8
H.U. Ramón y Cajal	6	9,5	4	8	10	8,8
H.U. La Paz	4	6,3	1	2	5	4,5
I.S. Carlos III	1	1,6	0	0	1	0,8
H.U. Puerta de Hierro	3	4,8	0	0	3	2,7
Fundación Jiménez Díaz	5	7,9	4	8	9	8
H.U. Clínico San Carlos	6	9,5	2	4	8	7,2
H.G. Móstoles	4	6,3	5	10	9	8
H.G. Severo Ochoa	3	4,8	5	10	8	7,2
H.U. Getafe	8	12,7	1	2	9	8
H.U. Doce de Octubre	0	0	9	18	9	8
Clínica La Zarzuela	0	0	1	2	1	0,8
Clínica La Moncloa	0	0	1	2	1	0,8
Clínica Ntra. Sra. de América	0	0	1	2	1	0,8
H. El Escorial	0	0	1	2	1	0,8
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>113</b>	<b>100</b>

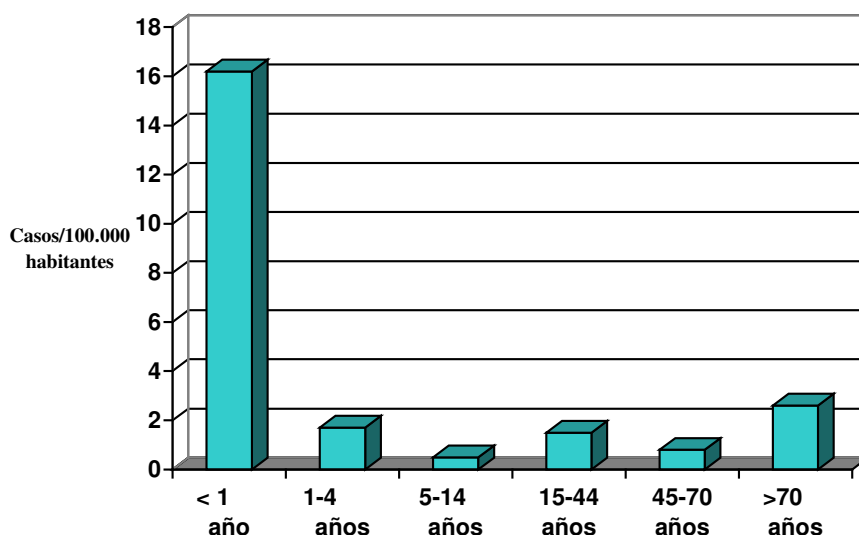
**Tabla 10.** Aislamientos de *H. influenzae* causantes de enfermedad invasiva en la Comunidad Autónoma de Madrid. Distribución por Área de residencia en los años 1999 y 2000.

Área de residencia	Enfermedad invasiva por <i>H. influenzae</i> en 1999			Enfermedad invasiva por <i>H. influenzae</i> en 2000			Total		
	Nº	%	Tasa	Nº	%	Tasa	Nº	%	Tasa
Área 1	9	14,3	1,41	6	12	0,94	15	13,2	2,35
Área 2	3	4,8	0,74	2	4	0,5	5	4,5	1,24
Área 3	7	11,1	2,59	6	12	2,22	13	11,4	4,82
Área 4	5	7,9	0,98	3	6	0,59	8	7,2	1,57
Área 5	5	7,9	0,82	2	4	0,33	7	6,2	1,15
Área 6	1	1,6	0,24	2	4	0,48	3	2,7	0,72
Área 7	8	12,7	1,54	5	10	0,96	13	11,4	2,50
Área 8	5	7,9	1,25	4	8	1	9	8	2,25
Área 9	3	4,8	0,86	6	12	1,73	9	8	2,59
Área 10	8	12,7	3,2	1	2	0,4	9	8	3,6
Área 11	4	6,3	0,6	9	18	1,35	13	11,4	1,95
Área 12	2	3,2	Nd	3	6	Nd	5	4,5	Nd
Área 13	3	4,8	Nd	1	2	Nd	4	3,5	Nd
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>100</b>	<b>1,25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>1,25</b>	<b>113</b>	<b>10</b>	<b>0,99</b>

Nd: No de terminada.

La incidencia media durante los años 1999 y 2000 de infección invasiva por cepas no capsuladas y capsuladas de *H. influenzae* fue 0,7 y 0,3 casos/100.000 personas por año, respectivamente sin que se observaran diferencias significativas entre los dos años estudiados.

**Figura 8.** Incidencia de la infección invasiva por *Haemophilus influenzae* en la Comunidad Autónoma de Madrid según la edad del enfermo (número de casos por 100.000 habitantes).



Respecto a la edad de los pacientes infectados por cepas no capsuladas de *H. influenzae*, 55 (80,9%) fueron mayores de 14 años y el resto (n= 12),  $\leq 14$  años de edad ( $p = 0,005$ ). No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de edad en relación al número de infecciones causadas por cepas de los serotipos a, b, c, d, e y f. En niños de edad de 4 años o menores, la frecuencia de las infecciones invasivas causadas por cepas capsuladas y no capsuladas no se incrementó durante el periodo de estudio.

En niños de 4 años o menores, se aislaron un total de 8 cepas capsuladas (4 Hib en 1999 y 3 Hib y 1 Hie en 2000) de LCR o sangre; todos los casos de infecciones por Hib ocurrieron en niños no vacunados o parcialmente vacunados con la vacuna conjugada frente a Hib. En comparación con datos publicados en la CAM antes de la existencia de la vacuna (66),

la incidencia de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* descendió en una proporción del 75%, 71% y 86% in niños de edad  $\leq 4$  años,  $< 1$  años y entre 1 y 4 años, respectivamente (66).

### **B) ESTUDIO CLÍNICO**

*H. influenzae* causó bacteriemias en 72 pacientes (63,7%), neumonía en 23 (20,3%) y meningitis en 12 (10,6%). En el grupo de infecciones por cepas capsuladas, los diagnósticos de meningitis y neumonía ocuparon el segundo y tercer lugar después de la bacteriemia. Entre los casos de neumonía, el 79% fueron causados por cepas no capsuladas de *H. influenzae* y el 21% por cepas capsuladas ( $p < 0,001$ ).

En todos los grupos de edad, la bacteriemia fue la presentación clínica más frecuente. La neumonía fue más frecuente en pacientes de edad superior a los 14 años, 21/81 (25,9%), que en los pacientes de 14 años o menos, 2/28 (7,1%) ( $p = 0,03$ ).

La meningitis fue más frecuente en niños de 14 años de edad o menores que en adultos, 14,3% en comparación con 9,8%, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa; sin embargo, la meningitis causada por cepas capsuladas de *H. influenzae* sí fue más frecuente en niños ( $p = 0,03$ ). La incidencia de la meningitis en niños menores de 1 año de edad fue de 3,5 casos/100.000 habitantes.

De los 113 pacientes con infecciones invasivas por *H. influenzae*, 84 (74,3%) tenían factores de riesgo o enfermedades de base predisponentes; las más frecuentes fueron las que afectaron al estado inmunitario del paciente: tumores, trasplante de órganos y afectación primaria de la inmunidad en 36 casos (31,8%), enfermedades respiratorias en 26 casos (23%) (17 de los cuales tenían enfermedad pulmonar obstructiva crónica), abuso de drogas intravenosas en 15 casos (13,3%), infecciones por VIH en 10 casos (8,8%) y nacimiento prematuro y/o complicaciones obstétricas en 10 casos (8,8%). La mortalidad entre los 113

pacientes estudiados fue de 17 casos (15%). Todos los pacientes fallecidos fueron adultos y el 55% de ellos tenía más de >65 años de edad.

### 4.1.2 MICROORGANISMO

#### **A) IDENTIFICACIÓN MICROBIANA**

De las 113 cepas clínicas invasivas de *H. influenzae* estudiadas, 87 (77,1%) procedían de hemocultivo, 12 (10,7%) de líquido cefalorraquídeo, 7 (6,2%) de líquido pleural, 4 (3,5%) de líquido abdominal, 2 (1,7%) de biopsia y 1 (0,8%) de líquido articular.

En 91 casos (80,5%), las cepas estuvieron disponibles para estudios microbiológicos posteriores. La mayoría de cepas, 67/91 (73,6%), fueron no capsuladas, mientras que 15 (16,5%), 6 (6,6%) y 3 (3,3%) pertenecieron a los serogrupos b, f y e, respectivamente. De las 24 cepas capsuladas aisladas durante el periodo del estudio, 12 lo fueron en 1999 (7 serotipo b, 4 serotipo f y 1 serotipo e) y 12 en el año 2000 (8 serotipo b, 2 serotipo f y 2 serotipo e).

#### **B) RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS DE LOS AISLAMIENTOS DE *H. influenzae***

El estudio de la sensibilidad de las cepas invasivas se realizó mediante el método de referencia de micro-dilución en caldo. Las CMIs de las cepas de control estuvieron siempre dentro de los límites recomendados (70).

De los 91 aislados de *H. influenzae* estudiados, 22 (24,2%) fueron resistentes a ampicilina mediante la producción de  $\beta$ -lactamasa. Se observó disminución de la sensibilidad a cotrimoxazol, claritromicina, tetraciclina, cloramfenicol y rifampicina en el 48,3, 19,8, 7,7, 6,6 y 2,2% de las cepas, respectivamente. No se observó resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico, cefuroxima, cefotaxima, cefixima, cefepima, meropenem, levofloxacino y ciprofloxacino.



La descripción de la sensibilidad a los antibióticos y las CMI's para el 50% y el 90% de la población de *H. influenzae* estudiada se muestra en la Tabla 11 y en la Figura 9.

La resistencia a ampicilina fue más frecuente en cepas capsuladas (11/24; 45,8%) que en cepas no capsuladas (11/67; 16,4%) ( $p = 0,004$ ). Las cepas capsuladas fueron también más resistentes a cotrimoxazol ( $p < 0,001$ ) y cloramfenicol ( $p < 0,004$ ) que las cepas no capsuladas. Por el contrario, la pérdida de la sensibilidad a claritromicina fue superior en cepas no capsuladas (23,9%) que en cepas capsuladas (8,3%).

Los cepas causantes de infecciones en niños fueron más resistentes a ampicilina y cotrimoxazol que los procedentes de adultos (44% vs. 17,1% y 48% vs. 28,6%, respectivamente), aunque sólo la diferencia encontrada para la ampicilina fue significativa ( $p = 0,007$ ).

La resistencia a ampicilina se asoció a la disminución de la sensibilidad a la tetraciclina, cotrimoxazol y cloramfenicol ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, la disminución de la sensibilidad a claritromicina fue más frecuente en aislados sensibles a la ampicilina (18/76, 23,7%), que en los resistentes a la ampicilina (2/22, 9,1%) ( $p = 0,02$ ).

Los aislados de sangre y LCR mostraron una mayor proporción de resistencia a la ampicilina (41/80, 51,2%) que los procedentes de otras muestras estériles (0/11, 0%) ( $p < 0,01$ ). Por el contrario, la resistencia a claritromicina fue menos frecuente en aislados de sangre y LCR que en los de otras muestras estériles (15/80, 18,7% vs. 6/11, 54,5%), aunque la diferencia estuvo en el límite de la significación estadística ( $p = 0,07$ ).

La resistencia múltiple (pérdida de sensibilidad simultánea a 3 o más antibióticos) se registró en 10 cepas (10,9%) de las 91 de *H. influenzae*. El fenotipo de resistencia múltiple más común fue la combinación simultánea de ampicilina-tetraciclina-

## RESULTADOS

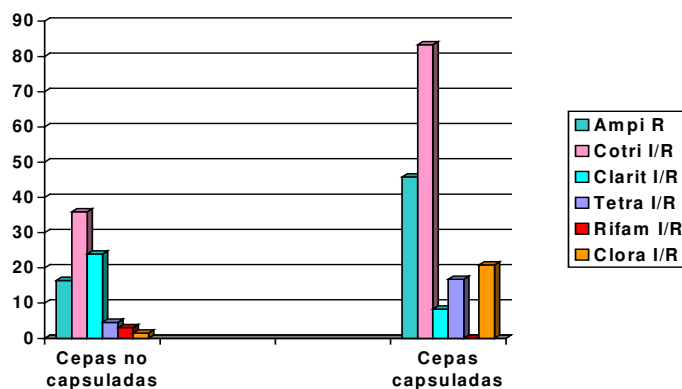
cloramfenicol que se observó en tres aislados (30% de las cepas con resistencia múltiple y 3,3 % de las cepas en su totalidad).

**Tabla 11.** Comparación de la sensibilidad a los antibióticos de 91 cepas invasivas de *H. influenzae* procedentes de la CAM entre cepas capsuladas y no capsuladas.

Cepas no capsuladas (n = 67)						
Antibióticos	MIC <sub>50</sub> *	MIC <sub>90</sub> *	Rango*	S (%)	I (%)	R (%)
Ampicilina	0,25	>4	0,12->4	56(83,6)	0	11(16,4)
Amox-Clav	≤0,5	1	≤0,5-1	67 (100)	0	0
Cefuroxima	0,5	1	0,25-2	67 (100)	0	0
Cefotaxima	≤0,03	0,06	≤0,03-0,12	67(100)	0	0
Cefixima	≤0,25	≤0,25	≤0,25	67(100)	0	0
Cefepime	0,12	0,5	≤0,06-0,5	67(100)	0	0
Meropenem	≤0,12	≤0,12	≤0,12-0,5	67(100)	0	0
Claritromicina	8	16	1->16	51 (76,1)	13 (19,4)	3 (4,5)
Levofloxacino	≤0,25	≤0,25	≤0,25	67(100)	0	0
Ciprofloxacino	≤0,06	≤0,06	≤0,06	67(100)	0	0
Cotrimoxazol	≤0,5	>2	≤0,5->2	43 (64,2)	6 (9)	18 (26,9)
Tetraciclina	0,5	0,5	≤0,25->4	64 (95,5)	1(1,5)	2 (3)
Cloramfenicol	≤2	≤2	≤2->4	66(98,5)	1(1,5)	0
Rifampicina	≤0,5	1	≤0,5-2	65(97)	2 (3)	0
Cepas capsuladas (n = 24)						
Antibióticos	MIC <sub>50</sub> *	MIC <sub>90</sub> *	Rango*	S (%)	I (%)	R (%)
Ampicilina	0,5	>4	0,25->4	13(54,2)	0	11(45,8)
Amox-Clav	≤0,5	≤0,5	≤0,5-1	24 (100)	0	0
Cefuroxima	0,5	1	0,25-2	24(100)	0	0
Cefotaxima	≤0,03	0,06	≤0,03-0,06	24(100)	0	0
Cefixima	≤0,25	≤0,25	≤0,25	24(100)	0	0
Cefepime	0,12	0,5	≤0,06-0,5	24(100)	0	0
Meropenem	≤0,12	≤0,12	≤0,12	24(100)	0	0
Claritromicina	4	8	2-16	22 (91,7)	2 (8,3)	0
Levofloxacino	≤0,25	≤0,25	≤0,25	24(100)	0	0
Ciprofloxacino	≤0,06	≤0,06	≤0,06	24(100)	0	0
Cotrimoxazol	>2	>2	≤0,5->2	4 (16,7)	6 (25)	14 (58,3)
Tetraciclina	0,5	>4	≤0,25->4	20 (83,3)	3 (12,5)	1 (4,2)
Cloramfenicol	≤2	>4	≤2->4	19 (79,2)	3(12,5)	2 (8,3)
Rifampicina	≤0,5	≤0,5	≤0,5-1	24 (100)	0	0

\* Expresado en µg/ml

**Figura 9.** Comparación (%) de la resistencia a antibióticos de las cepas estudiadas de *H influenzae* no capsuladas y capsuladas



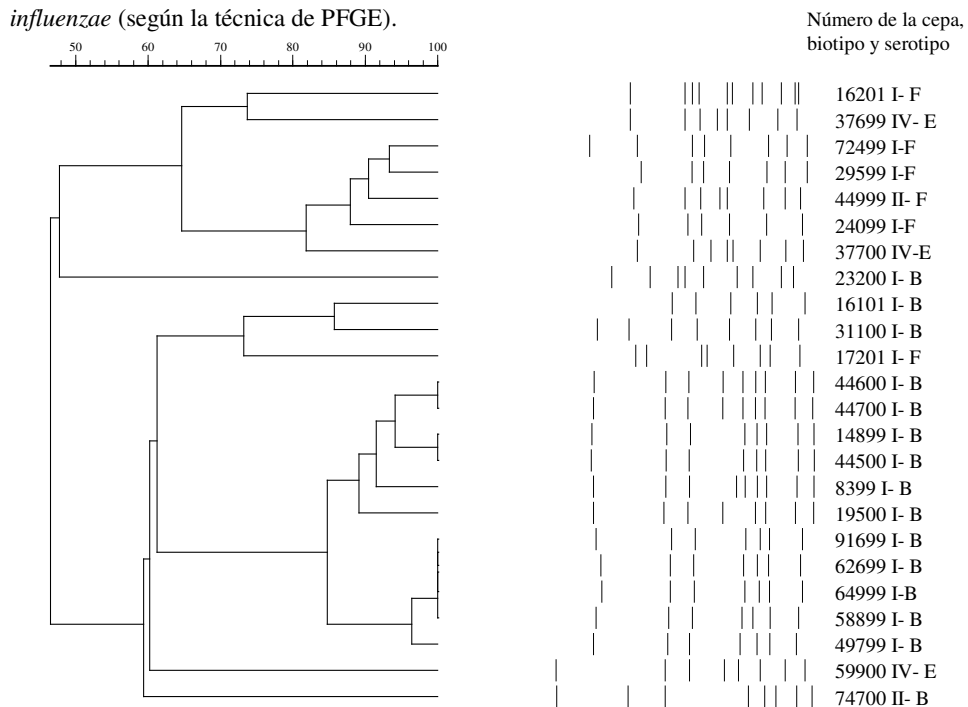
**C) ESTUDIOS MOLECULARES**

**Electroforesis en campo pulsante y análisis de los pulsotipos obtenidos**

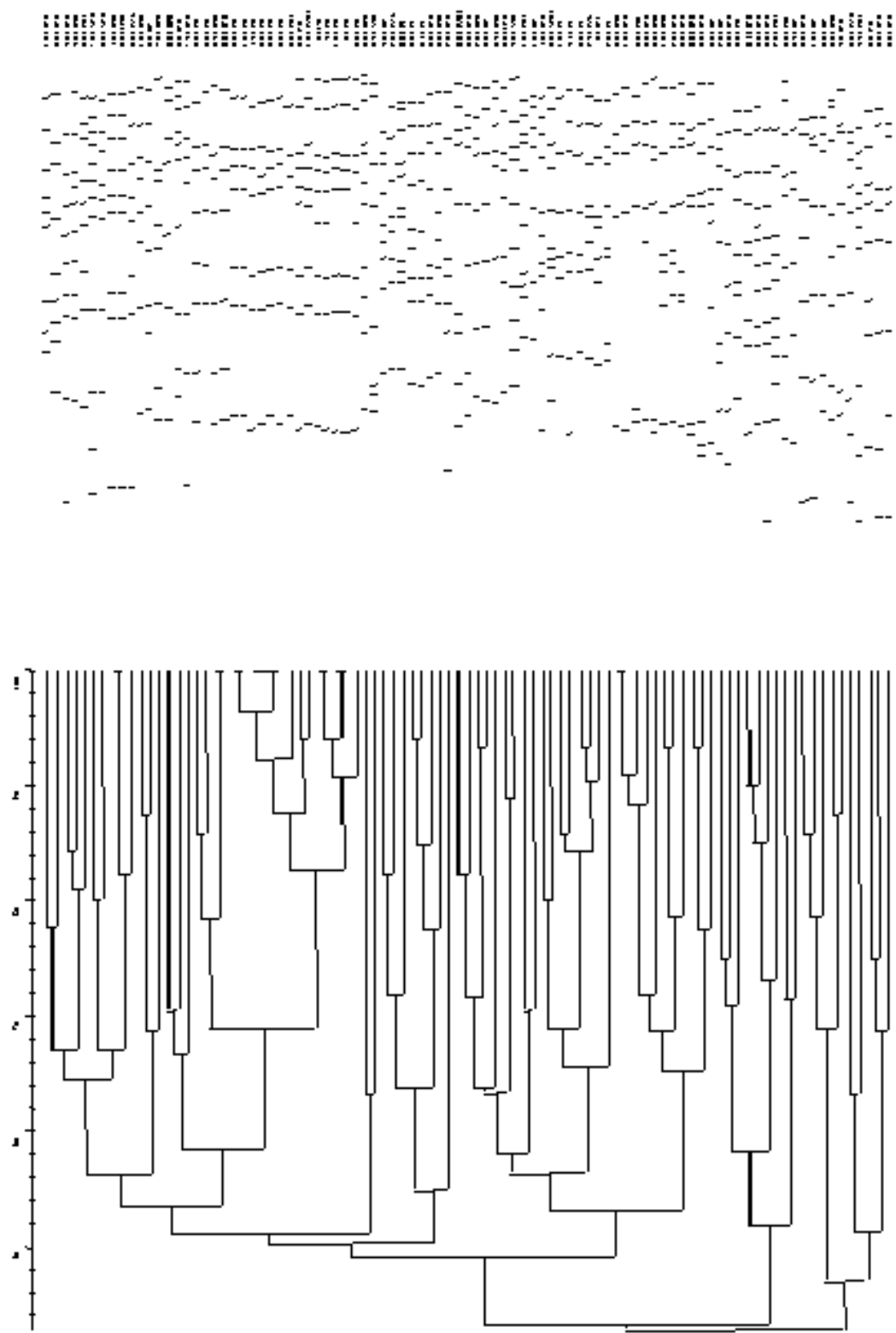
La colección de 91 cepas de *H. influenzae* fue analizada mediante la técnica de PFGE utilizando la endonucleasa *SmaI* para la digestión del DNA cromosómico total. Se siguieron los criterios de similitud propuestos por Tenover (71). El análisis de los patrones de ADN obtenidos según la técnica del PFGE se muestran en las figuras 11 (*H. influenzae*) y 10 (cepas capsuladas de *H. influenzae*). La enzima *SmaI* no digirió el ADN en 8 cepas, siete de ellas no capsuladas. Como puede observarse, las cepas de *H. influenzae* no capsuladas mostraron una considerable diversidad genética (Figura 11); por el contrario, las cepas capsuladas demostraron un alto grado de similitud, ya que, por ejemplo, la distancia genética entre la mayoría de las cepas del serotipo b fue  $\leq 18\%$  (Figura 10).

Para el análisis filogenético se seleccionó la región comprendida entre 48,0 y 97,0 Kpb. Los dendogramas se obtuvieron tras el análisis de los índices de similitud genética de Dice entre cada pareja de cepas.

**Figura 10.** Dendrograma para representar la relación genética de 24 cepas invasivas y capsuladas de *H. influenzae* (según la técnica de PFGE).



**Figura 11.** Dendrograma para representar la relación genética de 91 cepas invasivas de *H. influenzae* de la CAM (según la técnica de PFGE).



\* Número de la cepa, biotipo y presencia de cápsula.  
(N/NT: no tipable o no capsulada)

**Detección de plásmidos conjugativos**

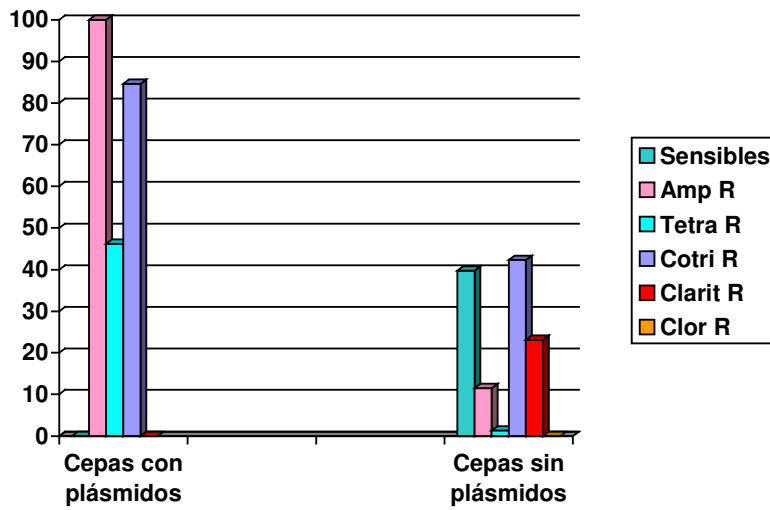
Se detectó la presencia de plásmidos conjugativos de gran tamaño en 13 (13%) de las cepas de *H. influenzae*. Entre las cepas resistentes a ampicilina, tetraciclina y cloramfenicol, el 56,5%, 85,7% y 100% fueron portadoras de plásmidos conjugativos, respectivamente, mientras que en ninguna de las cepas sensibles a estos antibióticos se detectaron este tipo de plásmidos (Tabla 12 y Figuras 12 y 13). Todos los plásmidos fueron extracromosómicos y siete de ellos estaban también integrados en el cromosoma. Se encontraron plásmidos en 9 de 24 cepas capsuladas de *H. influenzae* (37,5%) en comparación con 4 de 67 cepas no capsuladas (6%) ( $p < 0.001$ ). No se observaron diferencias significativas entre las cepas portadoras de plásmidos procedentes de niños y adultos.

**Tabla 12.** Comparación de la frecuencia de la resistencia a antibióticos en cepas invasivas de *H. influenzae* en la CAM con la presencia de plásmidos conjugativos de elevado peso molecular.

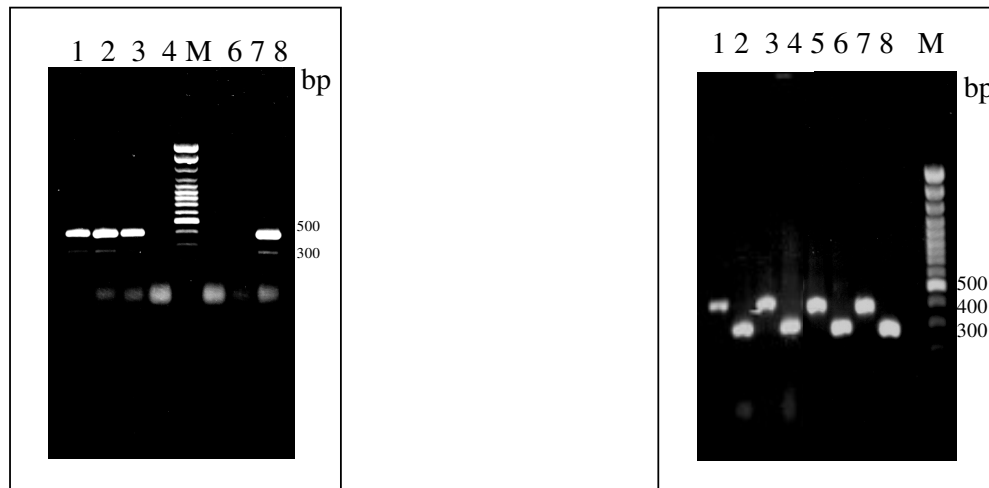
Antibiótico	Plásmidos (+) (n=13)	Plásmidos (-) (n=78)	p*
	N (%)	N (%)	
Sensibles	0	31 (39,7)	0,008
Ampicilina - R	13 (100)	9 (11,5)	<0,000001
Tetracilcina - R	6 (46,2)	1 (1,3)	0,00001
Cotrimoxazol - R	11 (84,6)	33 (42,3)	0,02
Claritromicina - R	0	18 (23,1)	0,03
Cloramfenicol - R	6 (46,2)	0	0,00001

\*Prueba exacta de Fisher.

**Figura 12** Histograma para mostrar las diferencias en la proporción de plásmidos conjugativos.



**Figura 13.** Determinación de plásmidos conjugativos mediante PCR



Carriles 1,2,3,8 cepas con posibles plásmidos

Carriles 4,6,7 cepas sin

Carriles 1,3,5,7 cepas portadoras de plásmidos no integrados

Carriles 2,4,6,8 cepas portadoras de plásmidos integrados

### **Búsqueda de cepas deficientes en cápsula del serotipo b**

Entre los aislamientos de *H. influenzae* invasivos no se detectaron cepas deficientes en cápsula (fenotipo  $b^-$ ).

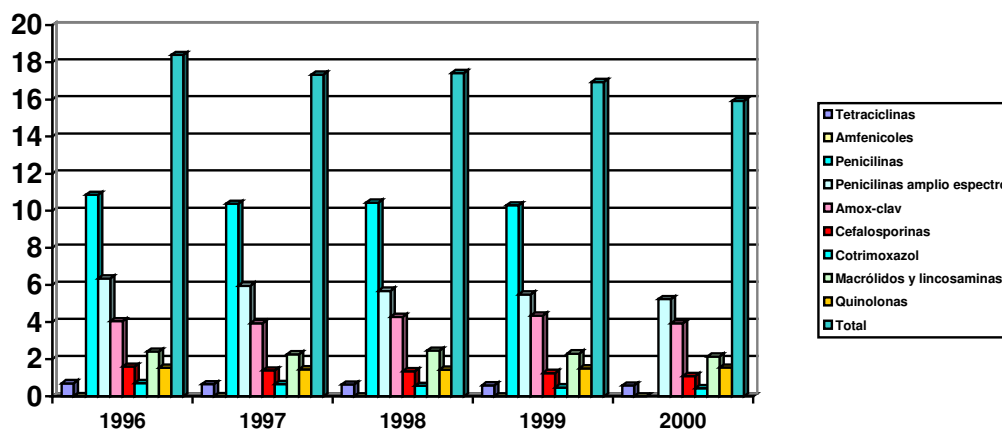
**D) CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS**

El uso de antibióticos en la CAM disminuyó desde 18,40 DDD/1.000 habitantes/día (1996) hasta 15,91 DDD/1.000 habitantes/día (2000). Se observó la misma tendencia en la mayoría de clases de antibióticos. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (grupo J01C), sobre todo penicilinas, fueron los antibióticos más recetados en la CAM en la comunidad durante el periodo de estudio. El uso de tetraciclinas (grupo J01A) y cotrimoxazol (grupo J01EE) fue muy bajo y con tendencia a la disminución en el tiempo. Se observó un uso muy escaso de anfenicoles (grupo J01B) (Tabla 13 y Figura 14).

**Tabla 13.** Consumo de antimicrobianos en la Comunidad Autónoma de Madrid, 1996-2000, expresados en DDD/1.000 habitantes/día.

Antibióticos		1996	1997	1998	1999	2000
J01A	Tetraciclinas	0,70	0,64	0,63	0,59	0,58
J01B	Amfenicoles	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
J01C	$\beta$ -lactámicos, Penicilinas	10,86	10,37	10,44	10,29	9,62
	Penicilinas con espectro ampliado	6,35	5,96	5,69	5,48	5,24
	Amoxicilina/ácido clavulánico	4,04	3,94	4,28	4,34	3,93
J01DA	Cefalosporinas	1,60	1,39	1,35	1,25	1,09
J01EE	Trimethoprim/sulfamethoxazol	0,71	0,66	0,56	0,47	0,43
J01F	Macrólidos y lincosaminas	2,41	2,26	2,46	2,30	2,14
J01M	Quinolonas	1,53	1,45	1,43	1,50	1,55
Total		18,40	17,34	17,42	16,94	15,91

**Figura 14.** Representación gráfica del consumo de antibióticos en la CAM, por familias de antibióticos entre 1997 y 2000.



### 4.2 ESTUDIAR LAS CARACTERÍSTICAS DE HIB CAUSANTE DE FALLOS VACUNALES TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA CONJUGADA POR HIB EN 2 COLECCIONES DE CEPAS: ESPAÑOLA (CNM) Y DE REINO UNIDO (PHLS).

#### 4.2.1 PACIENTES

##### A) ESTUDIO CLÍNICO Y POBLACIONAL

**España:** Desde 1996 hasta 2002 se recogieron 8 cepas de *H. influenzae* aisladas en LCR y sangre de niños previamente bien vacunados con la vacuna conjugada frente a Hib. Las cepas fueron centralizadas en el LNRH (CNM) y todas procedían de Áreas Geográficas distintas excepto 2 de Baracaldo, País Vasco, pero que se aislaron con un intervalo de 8 meses. No se encontraron afinidades en el tipo de vacuna, marca o nº de lote que relacionaran los casos entre si.

**Reino Unido:** La Agencia de Protección de la Salud identifica casos de enfermedad invasiva por Hib a través de la Unidad de Referencia de *Haemophilus*, la cual a su vez confirma las infecciones al Centro de Desarrollo de Enfermedades Comunicables desde los laboratorios de Inglaterra y Gales. Entre 1992 y 2000 los casos infantiles han sido informados a través de la Unidad Inglesa de Desarrollo pediátrico en colaboración con el Grupo de Vacunas de Oxford. Sólo eran incluidos los casos de enfermedad por *H. influenzae* aislados de una muestra normalmente estéril. Todos los casos incluidos fueron confirmados como Hib por la mencionada Unidad de Referencia por métodos convencionales (ver material y métodos) considerando como se ha mencionado en la introducción y en el material y métodos, **caso** como la enfermedad invasiva causada por *H. influenzae* tipo b, caracterizado por PCR ocurriendo: a) al menos 2 semanas después de recibir una dosis de vacuna conjugada



por Hib en niños mayores de 1 año ó b) al menos 1 semana después de dos o más dosis en niños menores de 1 año (22).

Con el fin de determinar si las cepas de Hib causantes de fallos vacunales en Reino Unido pertenecía a nuevos genotipos en comparación con controles de Hib aislados de pacientes no vacunados en las épocas pos-vacunal y pre-vacunal, se eligió una muestra representativa de ambos periodos cuyos resultados se exponen en el siguiente apartado.

#### 4.2.2 MICROORGANISMO

##### A) IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

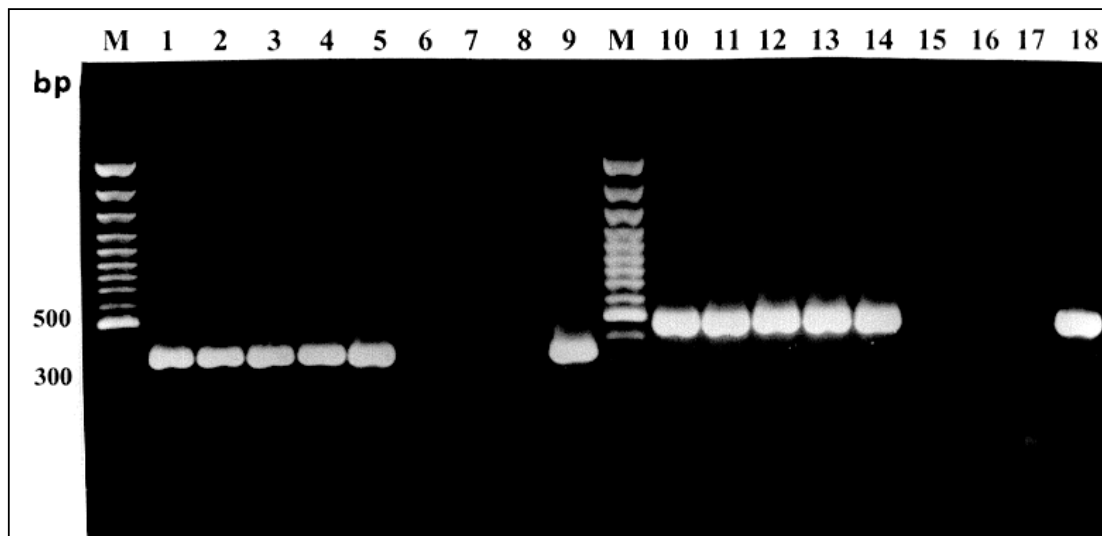
La tabla 14 resume las características clínicas y de laboratorio más relevantes de los aislamientos españoles. El diagnóstico más frecuente fue la meningitis, que presentaron 5 pacientes. Todos los niños infectados por cepas no capsuladas tuvieron niveles de anticuerpos anti PRP mayores de 1µg/ml, mientras que ello sólo ocurrió en una de las cepas del serotipo b (cepa 2999). Esta cepa pertenecía a un paciente VIH +, aunque no había desarrollado SIDA y cuyo conteo de linfocitos T, CD4+ era normal y los niveles de carga vírica, indetectables. En ningún otro caso se habían descrito anomalías en la inmunidad de los pacientes.

**Tabla 14.** Características de los pacientes vacunados frente a Hib mediante vacuna conjugada y que presentaron cuadros clínicos de enfermedad invasiva.

Nº de cepa y tipo	Fecha	Edad del paciente	Diagnóstico clínico	Tipo de muestra	Ciudad	Anti-RPR*	Factores de riesgo	Dosis de vacuna
90797 Nt	31/01/97	3 años	Sepsis	Sangre	Gijón	6,24	No	1
70097 Nt	16/0/97	4 años	Meningitis	LCR	Vigo	2,81	No	1
38398 Nt	20/04/98	15 meses	Sepsis	Sangre	Logroño	4,55	No	3
37398 b	24/04/98	12 meses	Meningitis	LCR	Baracaldo	<0,15	No	3
2999 b	08/01/99	4 años	Neumonía	Sangre	Baracaldo	2,29	VIH +	1
67299 b	23/09/99	15 meses	Meningitis	LCR	Marbella	0,17	No	3
52901 b	08/06/01	12 meses	Meningitis	LCR	Santiago	<0,15	No	3
42402 b	18/07/02	19 meses	Meningitis	LCR	Las Palmas	<0,15	No	4

\*Expresado en µg/ml. Nt: cepas no tipables.

**Figura 15.** Resultados de la PCR para el genotipificado capsular de las 8 cepas españolas de presunto fallo vacunal por Hib.



Los carriles M indican el marcador de peso molecular conocido. En los primeros carriles del 1 al 9 se muestran los amplicones obtenidos con los cebadores para detectar la presencia de cualquier tipo capsular. Los carriles del 10 al 18, muestran los amplicones obtenidos mediante cebadores específicos de Hib. En ambos casos las cepas eran: Carriles 1-5: 2999, 67299, 52901, 42402 (los 5 cepas Hib), carriles 6-8: las cepas 38398, 70097, 90797 y 38398 (cepas no Hib, no tipificables) y carril 9 la cepa control Hib o cepa Eagan.

## B) ESTUDIOS MOLECULARES

### Electroforesis en campo pulsante de las cepas causantes de fallos vacunales.

**España:** Se realizó un análisis mediante PFGE de las 8 cepas aisladas de muestras invasivas en niños con posibles sospecha de fallo vacunal, de las 8 controles y de la cepa control de Hib Eagan (Figura 16 a). Los resultados mostraron una buena separación entre las cepas capsuladas y no capsuladas. Todas las cepas de Hib, incluida la cepa Eagan, se agruparon dentro de un porcentaje de similitud genética del 85-100% excepto la cepa 2999 (causante de fallo vacunal) cuya grado de similitud genética con el resto de cepas Hib fue aproximadamente del 60% (Figura 16 a).

**Reino Unido:** La colección de Hib representativa del Reino Unido fue de 376 cepas cuya epidemiología molecular se determinó mediante PFGE (376 aislamientos clínicos y la cepa de Hib, cepa Eagan). Las características de su procedencia están descritas en el

apartado 3.1.2 del Material y Métodos (Tabla 5). La figura 17 ilustra con un ejemplo de gel de PFGE parte de los resultados obtenidos.

El análisis preliminar de la matriz de similitudes entre todas las cepas del estudio se realizó mediante el programa Multi-Variate Statistical Package (MVSP) software, vs. 3.13m (1985-2004 Kovach Computing Services). El número total de grupos genéticos diversos obtenidos fue de 77. De los 376 aislamientos de Hib procedentes de fallos vacunales y controles, 269 (71,5%) se pertenecieron a 10 grupos; 148 cepas (39,4%), (72 fallos vacunales verdaderos y 76 controles) formaron un único grupo.

De estos 77 grupos de diversidad, 40 (47 cepas) fueron exclusivos de aislamientos de Hib procedentes de pacientes del grupo control en comparación con 18 (19 cepas) que fueron exclusivos de fallos vacunales ( $p=0,0004$ ; OR: 3,5, 95% IC: 1,7-7); los 19 grupos restantes (310 aislamientos, 82,4%) fueron comunes a ambos.

Los resultados del índice de diversidad de Simpson fueron como sigue: 78% para los aislamientos de Hib causantes de fallos vacunales verdaderos y el 81% para los controles; 79% para los aislamientos de procedentes de niños y 90% para los aislamientos de los adultos; 80% para los aislamientos de los controles procedentes de niños y 90% para los aislamientos de los controles de los adultos; 83% para los aislamientos de los niños en la época pre-vacunal y del 76% para los aislamientos de los niños en la época pos-vacunal (Figura 18).

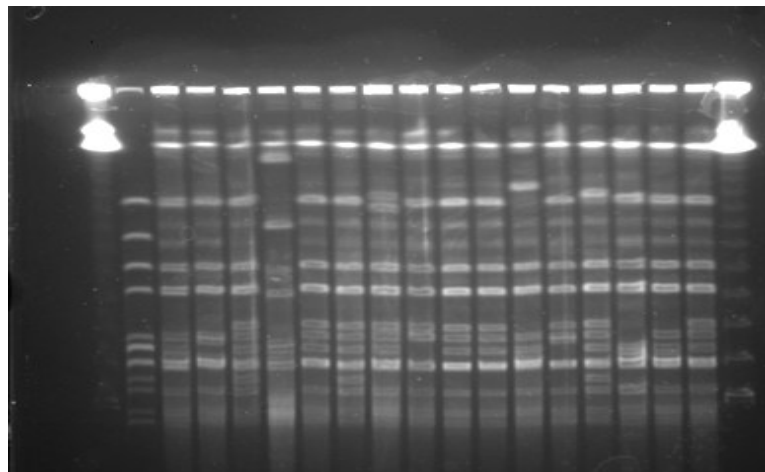
Las cepas de Hib de los controles procedentes de niños (n: 173) se distribuyeron en 50 grupos de diversidad en comparación con los 23 grupos de diversidad encontrados en controles de adultos (n: 39) ( $p=0,0006$ ; OR 0,28; 95% IC: 0,13-0,57). Todo ello sugiere que las cepas de los controles (sobre todo de los controles procedentes de adultos) son más diversas genéticamente que las de los fallos vacunales.

Se encontraron 46 grupos de diversidad genética en las 144 cepas de Hib de niños aisladas en la época pre-vacunal en comparación con 40 grupos pertenecientes a las 193 cepas de Hib de niños aisladas en la época pos-vacunal ( $p= 0,02$ ; OR: 1,8; 95% IC: 1,1-2,9). La misma comparación hecha en adultos, no resultó estadísticamente significativa ( $p=0,7$ ).

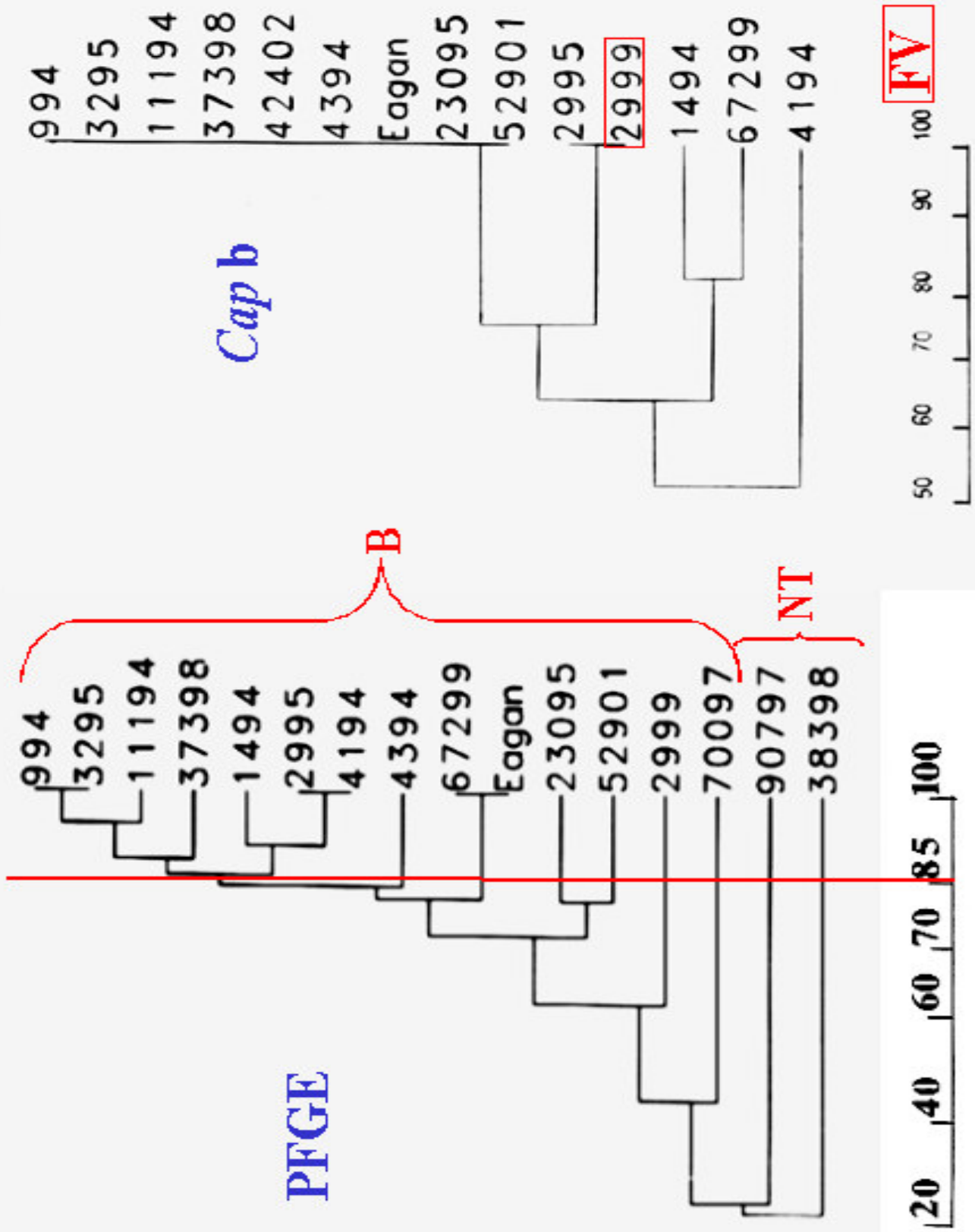
La figura 19 muestra la diversidad genética de los aislamientos de Hib, medida mediante el índice de diversidad genética de Simpson, dividida en periodos de 3 años de intervalo, desde 1991 a 2003. En términos generales, desde 1991 hasta 1999 el grado de diversidad genética fue similar mientras que desde 2000 hasta 2003, descendió. Pero si desglosamos los resultados entre niños y adultos, vemos que en el grupo de adultos el índice de diversidad genética de Simpson aumenta.

Con el fin de avanzar en el estudio de las relaciones genéticas entre las cepas inglesas, se procedió al análisis de la misma matriz de similitudes según el software incluido en el programa “Fingerprinting II” basado en el índice de Dice. Este programa orienta mejor hacia el estudio de la relación genética entre las cepas (ver Material y Métodos). Asimismo, se tuvieron en cuenta los criterios de Tenover para las cepas iguales y altamente relacionadas (72).

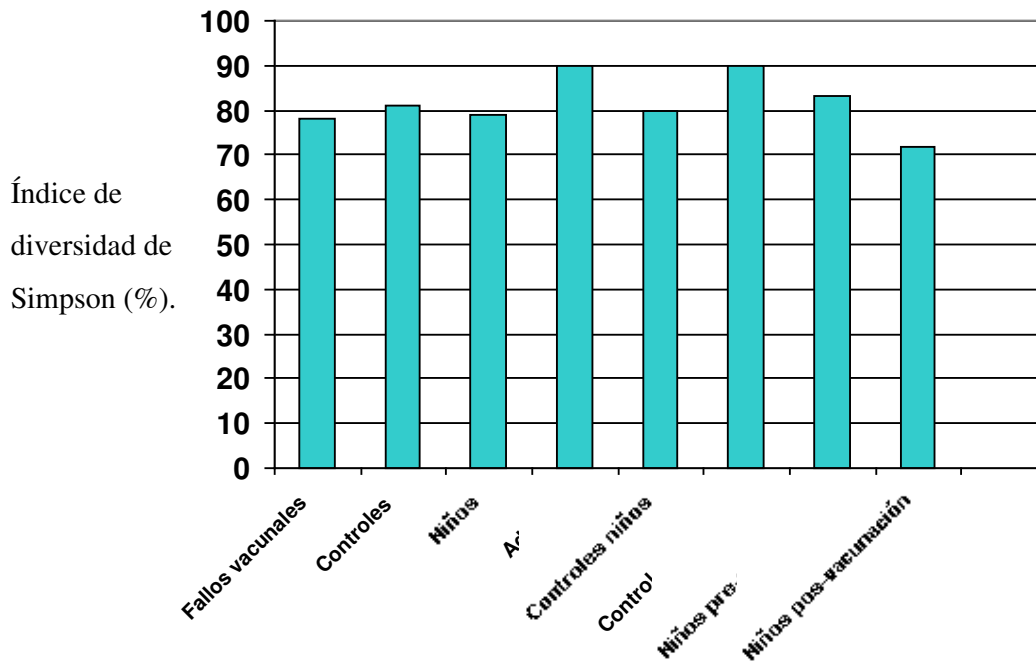
**Figura 17.**  
Ejemplo de gel de  
PFGE obtenido  
en el estudio de  
las cepas  
invasivas Hib de  
la colección  
inglesa .



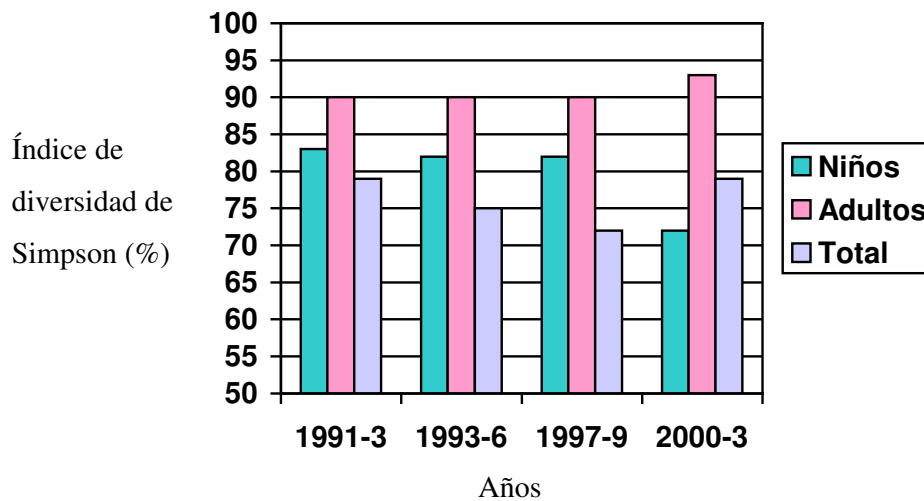
**Figura 16.** Dendogramas para representar la relación genética de 16 cepas invasivas de *H. influenzae* para el estudio de los posibles fallos vacunales españoles.  
**a:** A la izquierda según la técnica de PFGE y **b:** A la derecha según la técnica de genotipificado de la cápsula *Cap b* mediante la sonda PUC38.



**Figura 18** . Diversidad genética según el índice de Simpson aplicado a los pulsotipos obtenidos mediante PFGE de las 376 cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b del Reino Unido.



**Figura 19** . Diversidad genética de las cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b aisladas de pacientes y estratificadas en periodos de 3 años. El diagrama de barras muestra el índice de diversidad genética de Simpson basado en los resultados obtenidos mediante PFGE .



Los resultados de este análisis mostraron que la totalidad de las cepas de Hib del estudio se agruparon en cuatro grandes grupos principales o *clusters* denominados Tipos I, II, III y IV (Figuras 20 y 21).

El tipo I incluye 352 cepas de Hib (92,2%) (156 fallos vacunales y 195 controles) y la cepa Eagan (tipo I subtipo j); los tipos II, III y IV tenían 16 (4,2%), 7 (1,8%) y 4 (1,1%) aislamientos, respectivamente (Figuras 20 y 21). Los “clusters” tipos III y IV están constituidos por aislamientos individuales. El tipo I se subdivide a su vez en 14 subtipos distintos (“a” a “n”) aunque todos ellos muy directamente relacionados (similitud genética >85%) (Figuras 20 y 21). La mayoría de los aislamientos del cluster tipo I pertenecían a los subtipos a (79,4%), b (3,4%) y c (3,4%); los 11 subgrupos restantes agrupaban de 1 a 4 aislamientos. La cepa Eagan se incluyó en el tipo I y subtipo j.

El grupo más importante por el nº de cepas, el tipo I/a está formado por 299 aislamientos; 137 de ellos fallos vacunales y 162 controles; 123 aislados en la época pre-vacunal y 176 en la época pos-vacunal.

Los patrones de PFGE se sometieron además a análisis multivariante (MANOVA) mediante el “software” del programa Fingerprinting II. Siguiendo sus criterios, 11 de las 21 bandas incluidas en el análisis inicial se consideraron como críticas para la clasificación de la colección total de cepas en los cuatro “clusters” o tipos principales (I-IV) si bien con diferente poder de discriminación; así, por ejemplo, una banda de 146 Kpb sólo estaba presente en los “clusters” tipos I y II pero no en los otros dos; otra banda de  $\approx 20$  Kpb sólo estaba presente en el “cluster” tipo III. Los tipos III y IV, fueron claramente diferenciados de los tipos I y II mediante el mencionado análisis multivariante ( $L = 0,06$  y  $0,18$ , respectivamente;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas

suficientes para diferenciar los tipos I y II entre sí ( $L= 0,46$ ;  $p= 10,4$ ), lo cual sugiere que probablemente ambos son subtipos de un único y gran “cluster” (Figura 22).

Finalmente, la tabla 15 muestra la comparación entre los “clusters” principales según su distribución entre fallos vacunales y controles; como puede observarse, ambos grupos de cepas se distribuyen de manera equilibrada entre los dos clusters más importantes.

Los otros dos tipos minoritarios III y IV fueron exclusivos o bien de las cepas de los controles, el tipo III ( $p= 0,02$ ), o bien de las cepas causantes de fallos vacunales, el tipo IV ( $p= 0,03$ ) (Tabla 15). Los 7 aislamientos del tipo III procedían de adultos ( $n=3$ ) y niños ( $n=4$ ) y los aislamientos del tipo IV (5616, 8106, 8272 y 9240), aunque todos ellos eran de niños al ser fallos vacunales, procedían de regiones inglesas distintas South West, Midlands y Londres.

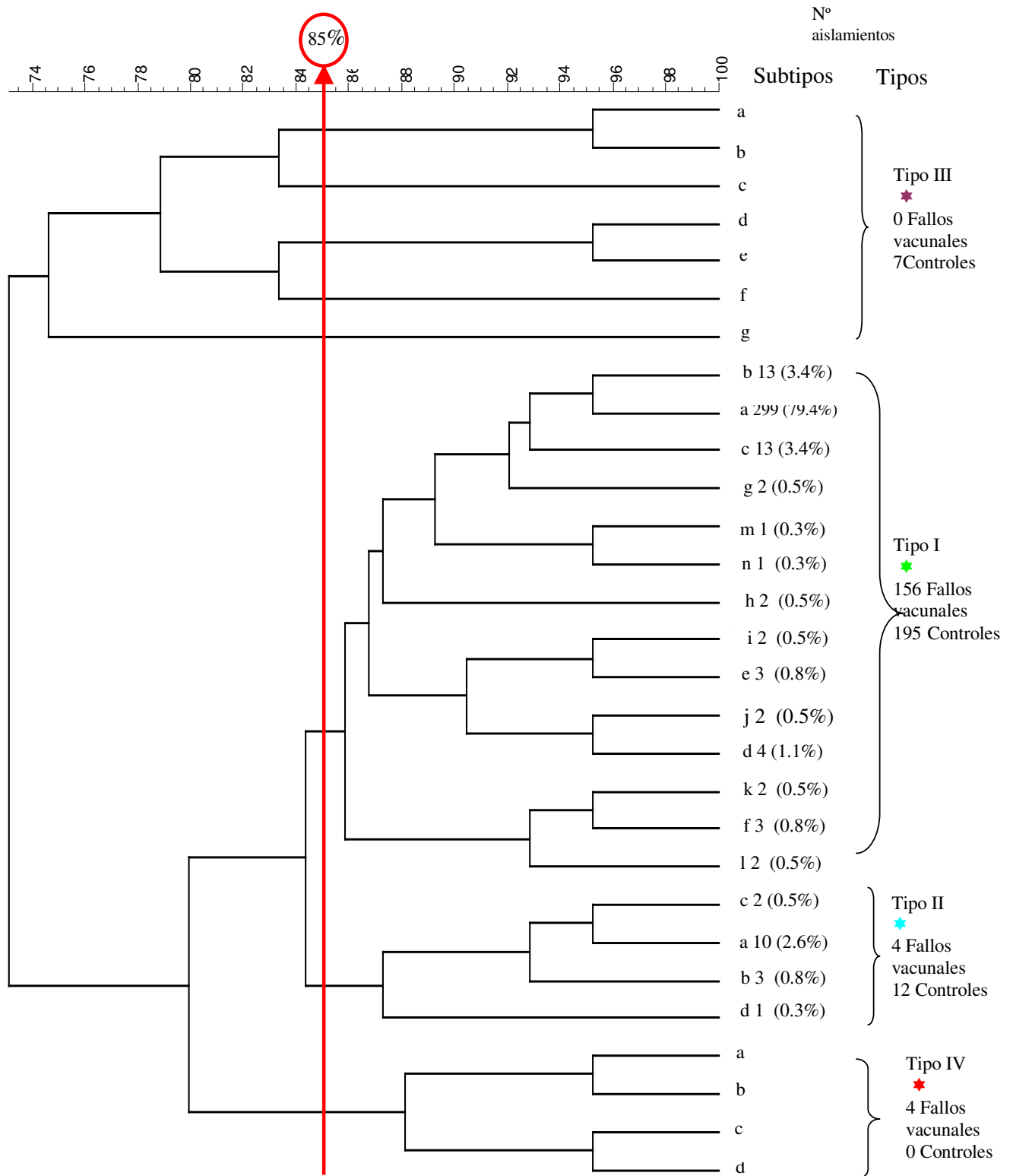
**Tabla 15.** Distribución de las cepas Hib invasivas estudiadas de Reino Unido (Años 1991- 2003) en patrones de PFGE y según pertenecieran al grupo de los fallos vacunales o a los controles.

Patrones PFGE	FALLOS VACUNALES		CONTROLES		Test exacto de Fisher	
	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	OR	p
Tipo I	156	41,3	195	51,3	1.900	0.16
Tipo II	4	1,1	12	3,1	0.417	0.19
Tipo III	0	0	7	2,1	0.083	0.02
Tipo IV	4	1,1	0	0	11.92	0.03
Total	164	43,5	212	56,5		

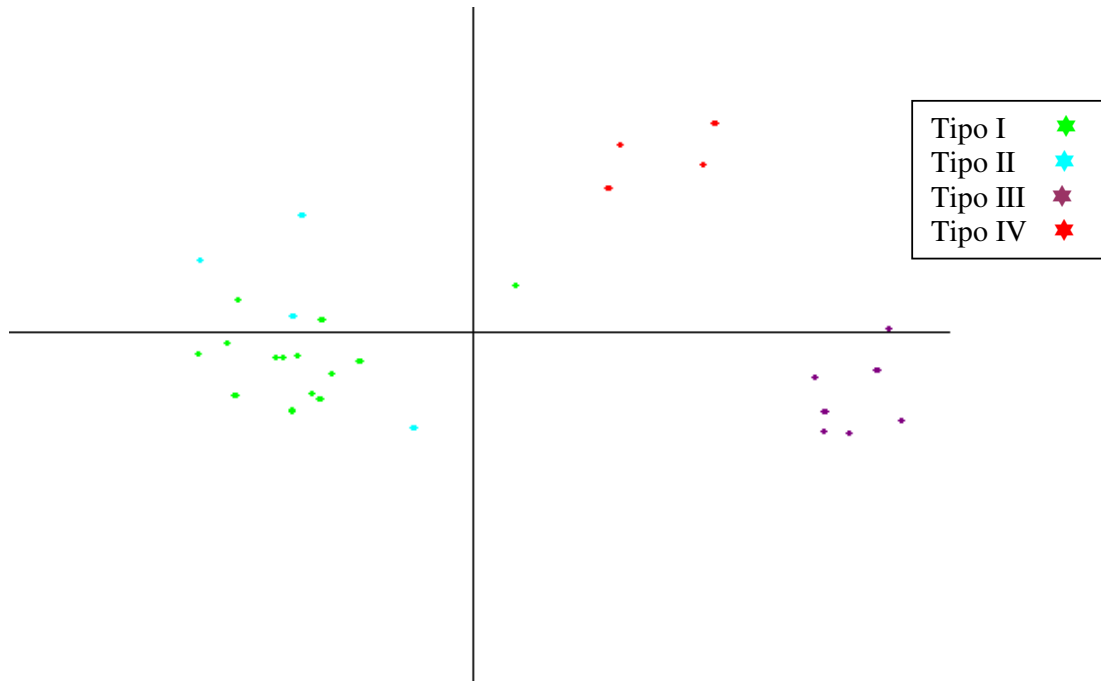




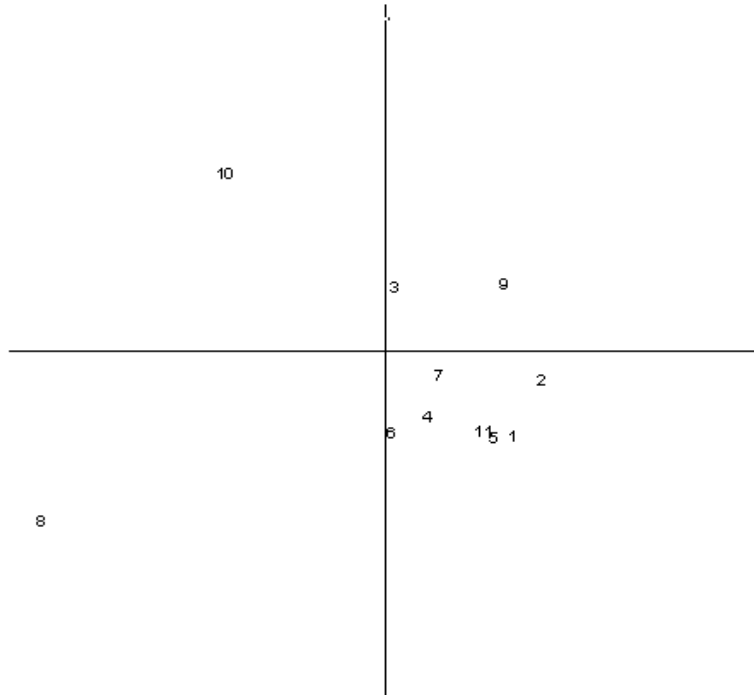
**Figura 21.** Representación gráfica de la relación genética obtenida mediante PFGE de los fallos vacunales ingleses según el programa Fingerprinting II.



**Figura 22. A.** Diferenciación de los Tipos I-IV y subtipos resultantes del análisis con PFGE, mediante análisis multivariante



**B.** Poder discriminativo de las 11 bandas (de 21) consideradas de PFGE para la elaboración de MANOVA



**Epidemiología molecular de la estructura capsular del serotipo b de *H. influenzae* (*cap b*)**

Este estudio se llevó a cabo con las cepas españolas (ver más arriba). La sonda PUO38 formada por un plásmido, que contiene el inserto correspondiente a la cápsula del serotipo b (*cap b*), hibridó sólo con las cepas capsuladas b. Se obtuvo un patrón de bandas de hibridación que se esquematiza en la figura 23. Se incluyeron 3 cepas no tipificables: 70097, 90797, 38398 (columnas 15-7 del esquema) y el fago  $\lambda$  (columna 18), como controles negativos; 5 cepas de niños no vacunados: 37398, 52901,42402 (columnas 1-3), 2999 (columna 11), 67299 (columna 13), y 8 de controles de Hib invasivo en la época pre-vacunal; 0994, 4394, 11194, 3295 y 23095 y la cepa Eagan (columnas 4 y 9), 2995 (columna 10), 1494 (columna 12), 4194 (columna 14). Se encontraron muy pocas variaciones en la estructura genética de *cap b*; 8 cepas presentaron el mismo patrón que la cepa Eagan, estuvieran o no implicadas en la producción de fallos vacunales. En tres de las 5 cepas de fallos vacunales la estructura de *cap b* era idéntica a Eagan. La cepa 2999 causante de fallo vacunal, se mantuvo a una distancia del 75% de las demás, aunque otra cepa perteneciente al grupo de los controles pre-vacunales (2995), presentó un patrón

idéntico. La sonda no hibridó con ninguna de las cepas no capsuladas.

**Figura 23.** Esquema del patrón de bandas obtenido al hibridar con la sonda PUO38 (*cap b*) el ADN de las bandas de PFGE fijado en membrana de nylon en las cepas españolas sospechosas de fallo vacunal.

La Figura 16 b muestra el árbol de las relaciones filogenéticas de la estructura del gen *cap b* construido a partir de los datos de la figura 23 .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
10.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
5.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							
4.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
2.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### 4.3 CONOCER LA INCIDENCIA Y LA IMPORTANCIA CLÍNICA DE OTROS SEROTIPOS CAPSULADOS DE *H. influenzae* DISTINTOS DEL SEROTIPO B EN LA POBLACIÓN GENERAL TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA CONJUGADA DE HIB EN ESPAÑA.

#### 4.3.1 PACIENTES

##### A) ESTUDIO CLÍNICO Y POBLACIONAL

En el período comprendido entre Abril de 1998 y Diciembre de 2002, se recibieron en el LNRHI un total de 3.934 aislamientos de *H. influenzae* procedentes de diferentes muestras clínicas incluyendo muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo y secreciones respiratorias. De este total de aislamientos, 26 cepas (0,66%) fueron identificadas como serotipo e biotipo IV y 49 (0,81%) como serotipo f y biotipo I (n: 47) y biotipo II (n: 2). Estos aislamientos correspondían a igual número de pacientes procedentes de 10 Instituciones de 5 áreas geográficas distintas.

En cuanto a las características de los pacientes, en el caso del serotipo e, 15 eran varones (57,7%) y 11 mujeres (42,3%); su edad media era de 35,5 años (rango: 7 meses a 80 años), 16 cepas (61,5%) se aislaron de pacientes adultos (mayores de 16 años) y 10 cepas (38,5%) de niños menores de 16 años. De los pacientes en los que se aisló el serotipo f, 24 eran varones (49%) y 25 mujeres (51%); su edad media era de 42 años (rango: 5 meses a 95 años); 37 cepas (75,5%) se aislaron en pacientes adultos (mayores de 14 años) y en los menores de 14 años (el resto), 7 cepas pertenecían a niños menores de 5 años.

**Serotipo e.** Cuando se analizaron los diagnósticos clínicos, la mayoría procedían de infecciones respiratorias (14 casos de los cuales 9 se confirmaron como neumonía); otras presentaciones clínicas fueron: conjuntivitis (4 casos), vaginitis (2 casos), abscesos (2 casos) y celulitis, infección peritoneal, sepsis y meningitis con un único caso en cada una de ellas. En

niños se aisló en tres casos de la conjuntiva y en dos de la vagina, en adultos solo un aislamiento se recuperó de la conjuntiva (Tabla 16). Ningún paciente falleció a causa de estos episodios clínicos. El tratamiento antibiótico más común que recibieron los pacientes fue cefalosporinas de tercera generación o amoxicilina /ácido clavulánico.

Doce pacientes (46,1%) presentaban patologías de base, y en ocho además se observó mas de un factor de riesgo a la vez. La patología de base mas frecuente fue la hepática, que se presentó en seis casos, seguida de VIH (3 casos) y enfermedades respiratorias (3 casos). En los niños, sólo uno de los diez presentaba patología de base en comparación con 11 de los 16 adultos ( $p= 0,005$ ).

Aunque los aislamientos de Hie procedían de cinco Comunidades Autónomas distintas, 12 cepas (46,15%) fueron aisladas en un Hospital Universitario terciario de la Comunidad Autónoma de Madrid; este hospital cubre una población de 640.000 habitantes y dispone de 1.800 camas. En el período de tiempo correspondiente a este estudio, en la citada institución, se obtuvieron 1.727 aislamientos de *H. influenzae* que fueron enviados al LNRHI, 12 cepas del total fueron identificadas como Hie (0,7%).

En el área de cobertura del citado hospital, la incidencia de infecciones debidas a *H. influenzae*, durante el período de estudio fue de 67,5 casos/100 000 habitantes por año, en comparación con una incidencia de infecciones debidas a Hie de 0,43 casos/100.000 habitantes por año, tasa que osciló desde 0,62 en el año 1999 a 0,47 en 2002. En el resto de los hospitales en los que también se diagnosticaron infecciones por Hie, el número de casos no fue suficiente para hacer estos cálculos con fiabilidad.

**Serotipo f.** El diagnóstico clínico más frecuente de en las infecciones por Hif fue en primer lugar la neumonía, 16 casos, seguida de la sepsis en 9 y la meningitis en 8. Cuatro de 14 pacientes con Hif en el esputo fueron diagnosticados de neumonía, mientras que los 10

restantes tenían como diagnóstico principal reagudizaciones bien de fibrosis quística o bien de bronquitis obstructiva crónica. En algunos de esos casos no hubo evidencia clínica clara de la implicación de la colonización por este microorganismo en las reagudizaciones de estos cuadros, pero tampoco se pudo descartar (Tabla 17).

Siete pacientes (14,3%) fallecieron, todos ellos eran adultos con patología de base muy grave.

Los antibióticos usados con mayor frecuencia en el tratamiento de estas infecciones fueron cefalosporinas de tercera generación y amoxicilina con ácido clavulánico. Treinta y dos pacientes (65,3%) tenían factores predisponentes previos al aislamiento o enfermedades de base; en ocasiones más de uno de ellos (n=13). En la mayoría de los casos los factores de riesgo eran de origen respiratorio (n=10), aunque también se encontraron: infección por VIH (n=8), patología tumoral (n=6), patología hepática y diabetes en 5 casos. Veintiún pacientes (42,8%) presentaban algún tipo de inmuno-deficiencia (infección por VIH, Linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, gammapatía monoclonal IgG, trasplante cardíaco, tratamiento con corticoesteroides y diabetes). El resumen de todos estos datos se muestra en la tabla 16.

Dieciséis cepas de Hif (32,6%) fueron aisladas de un hospital de Madrid con 1.800 camas con una cobertura de 640.000 habitantes. Durante el periodo de estudio se produjeron 2.542 aislamientos clínicos de *H. influenzae* en esta institución y todos se enviaron al LNRH. Dieciséis (0,6%) fueron identificados como Hif. En el área de salud cubierta por este hospital, la incidencia de infección por *H. influenzae* durante este periodo fue de 56,7 casos/100 000 habitantes al año. En comparación, la incidencia de infecciones por Hif fue de 0,40 casos/100.000 habitantes al año. En los siete años completos que incluye el estudio, la incidencia de infección por Hif fue de 0,31 casos/100 000 habitantes en 1996, 0,62/100 000 en 1997, 0,16/100 000 en 1998, 0,47/100 000 en 1999, 0,31/100 000 en 2000, 0,16/100 000 en

## RESULTADOS

2001 y 0,47/100 000 en 2002. En el resto de los hospitales en los que se diagnosticaron infecciones por Hif, al igual que ocurría para Hie, el número de casos fue insuficiente para calcular incidencias.

**Tabla 16.** Características clínicas y microbiológicas de los 26 casos de infección debida a *Haemophilus influenzae* tipo e.

Nº ide.nti.	Sexo	Edad	Muestra	Diagnóstico	Factores predisponentes	Patrón de resistencia	Plásmido
71200	M	4	SR <sup>1</sup>	ITR	Tetralogía de Fallot . Ventilación mecánica.	Sensible	-
2902	M	28	BAS <sup>2</sup>	Neumonía	ADVP	Sensible	-
81101	M	5	Vaginal	Vulvovaginitis	Ninguno	Sensible	-
37700	V	7m	LCR	Meningitis	Ninguno	Sxt	-
44498	M	8	Vaginal	Vaginitis	Ninguno	Sxt	-
5499	V	67	Blood	Neumonía	Ninguno	Sxt	-
87100	V	61	Espuito	ITR	LLC	Sxt	-
9102	V	45	BAS <sup>1</sup>	Neumonía	Cirrosis	Sxt	-
21499	M	5	Conjuntival	Conjuntivitis	Ninguno	Cl-Sxt	-
59900	V	73	Sangre	Sepsis	ND	Cl-Sxt	-
11899	V	74	Espuito	Neumonía	Carcinoma hepatocelular. Hepatitis C	Amp-Sxt	+
51699	V	16	Conjuntival <sup>1</sup>	Conjuntivitis	Ninguno	Amp-Sxt	+
75600	M	4	Conjuntival <sup>3</sup>	Conjuntivitis	Ninguno	Amp-Sxt	-
85300	V	78	Sangre	ITR	Hepatitis C. Cirrosis. EPOC	Amp-Sxt	-
10702	V	Adulto	Conjuntival	Conjuntivitis	Ninguno	Amp-Sxt	-
2102	M	20	Espuito	Pneumonia	Síndrome Down. Asma. Hipotiroidismo	Amp-Sxt	-
2402	V	80	L.ascítico	Peritonitis	Cirrosis. IRC	Amp-Sxt	-
39002	V	Niño	Absceso <sup>4</sup>	Absceso	ND	Amp-Sxt	-
83301	M	56	BAS	ITR	ND	Amp-Sxt	+
9002	M	6	Absceso	Absceso peritonsilar	ND	Amp-Sxt	-
38298	V	46	Sangre	Celulitis	Hepatitis C. Cirrosis. VIH	Amp-Tet-Sxt	+
76199	M	12	SR	Neumonía	Ninguno	Amp-Cl-Sxt	-
87200	V	61	BAL	Neumonía	ND	Amp-Cl-Sxt	-
37699	V	34	Sangre	Neumonía	VIH. Hepatitis C+B	Amp-Tet-Sxt-Clo	+
40898	V	33	Espuito	Neumonía	VIH. ADVP	Amp-Tet-Sxt-Clo	+
83900	M	36	BAS	ITR	Politraumatismos. Traqueostomía	Amp-Cl-Tet-Sxt-Clo	+

BAS: broncoaspirado, BAL: broncoalveolar lavado, LCR: líquido cefaloraquídeo, SR: secreción respiratoria, ITR: infección del tracto respiratorio, ADVP: adicto a drogas vía parenteral, EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, LLC: leucemia linfática crónica, M: mujer, V: varón, Amp: ampicilina, Sxt: cotrimoxazol, Cl: claritromicina, Tet: tetraciclina, Clo: cloramfenicol, ND: no determinado.

<sup>1</sup> Mezclado con *Streptococcus pneumoniae*; <sup>2</sup> Mezclado con *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catharralis*; <sup>3</sup> Mezclado con *Staphylococcus aureus*; <sup>4</sup> Mezclado con *Haemophilus parainfluenzae* y *Fusobacterium spp.*



## RESULTADOS

**Tabla 17.** Características clínicas y microbiológicas de los 49 casos de infección debida a *H. influenzae* tipo f.

Nº	Sexo	Edad	Muestra	Diagnóstico	Factores predisponentes	Plásmid	Perfil de resistencia
31597	V	57	Esputo	Neumonía	Bronquiectasias	-	Sensible
33598	V	74	Sangre	Neumonía	Diabetes	-	Sensible
36001	M	95	Sangre	Neumonía	Ninguno	-	Sensible
39495	V	57	Sangre	Neumonía	Diabetes. Mieloma múltiple	-	Sensible
46799	M	31	LCR	Meningitis	VIH. ADVP	-	Sensible
82897	V	73	Esputo	Bronquitis	Ninguno	-	Sensible
83297	M	Adulto	BAS	ITR?	ND??	-	Sensible
62602	M	45	BAS	Neumonía	VIH, Ca reinoma de cervix	-	Sensible
86400	V	1	<sup>1</sup> Abceso	Celulitis	Inmunodeficiencia congénita	-	Sensible
86600	V	26	<sup>2</sup> Abceso	Absceso	VIH. ADVP. Hepatitis C+B	-	Sensible
87400	V	83	Sangre	Neumonía	EPOC	-	Sensible
1102	M	38	Sangre	Neumonía	Asma	-	Sensible
2502	M	42	Sangre	Sepsis	ND??	-	Sensible
42602	V	30	Sangre	Sepsis	VIH	-	Sensible
8802	M	9	LCR	Meningitis	Ninguno	-	Sensible
16201	M	34	Sangre	Sepsis	VIH	-	Sxt
19699	M	83	Esputo	Neumonía	Diabetes	-	Sxt
24099	V	54	Sangre	Sepsis	Diabetes. Patología hepática	-	Sxt
28297	V	Adulto	Sangre	Sepsis?	ND??	-	Sxt
29599	M	13	Sangre	Neumonía	LLA	-	Sxt
34999	M	76	<sup>3</sup> LCR	Meningitis	Ninguno	-	Sxt
36996	V	55	<sup>3</sup> BAS	Neumonía	EPOC. Carcinoma pulmonar	-	Sxt
42996	M	Adulto	L. ascítico	Peritonitis	ND??	-	Sxt
5801	V	70	Esputo	EPOC	EPOC. Patología coronaria	-	Sxt
63398	M	5	Esputo	FQ	FQ	-	Sxt
70897	V	3	Conjuntival	Conjuntivitis	Ninguno	-	Sxt
72499	M	72	Sangre	Colecistitis. Pancreatitis	Ninguno	-	Sxt
78399	V	5 m	LCR	Meningitis	Ninguno	-	Sxt
82198	M	11	<sup>4</sup> Esputo	Sinusitis	Ninguno	-	Sxt
82698	V	44	BAS	Neumonía	Transplante cardíaco	-	Sxt
89700	V	74	Esputo	EPOC	EPOC. Diabetes. TBC	-	Sxt
17300	M	Adulto	Esputo	ITR??	ND??	-	Cl
8297	M	89	Sangre	Celulitis. Sepsis	Marcapasos	-	Cl
42998	V	70	Esputo	EPOC	EPOC. TBC	-	Sxt-Rif
601	M	36	<sup>3</sup> BAS	Neumonía	VIH. ADVP	-	Cl-Sxt
28701	V	41	Sangre	Neumonía	Hepatitis C. VIH	-	Cl-Sxt
35001	V	2	<sup>5</sup> Esputo	FQ	FQ	-	Cl-Sxt
58697	M	13	<sup>6</sup> Otítico	Otitis	Ninguno	-	Amp-Sxt
23602	V	68	Esputo	TRI??	ND	-	Amp-Sxt
38302	M	4	Sangre	Sepsis??	ND	-	Amp-Sxt
28899	V	40	<sup>7</sup> Esputo	Neumonía	VIH. Hepatitis C. ADVP	+	Amp-Sxt-Clo
48601	M	61	Esputo	Neumonía	Miocardopatía	-	Amp-Cl-Sxt
80600	M	40	<sup>3</sup> CSF	Meningitis	Tumor pituitario. Fístula de LCR	-	Amp-Cl-Sxt
14001	V	11	<sup>2</sup> Esputo	FQ	FQ	+	Amp-Tc-Sxt-Clo
15797	M	74	LCR	Meningitis	Mieloma múltiple. Fracaso renal	+	Amp-Tc-Sxt-Clo
17201	V	91	Sangre	Sepsis	Gammapatía monoclonal Ig G	+	Amp-Tc-Sxt-Clo
50501	M	34	Sangre	Meningitis	Sordo-mudo??	+	Amp-Tc-Sxt-Clo
31802	M	5	Sangre	Sepsis	Ninguno	+	Amp-Tc-Sxt-Clo
5998	V	60	LCR	Meningitis	Patología hepática crónica	+	Amp-Cl-Tc-Sxt-Clo

Leyenda. BAS: broncoaspirado, LCR: líquido cefaloraquídeo, ITR: infección del tracto respiratorio, ADVP: adicto a drogas vía parenteral, EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, LLA: leucemia linfocítica aguda, TBC: tuberculosis, FQ: fibrosis quística, M: mujer, V: varón, Amp: ampicilina, Sxt: cotrimoxazol, Cl: claritromicina, Tet: tetraciclina, Clo: cloramfenicol, Rif: rifampicina, ND: no determinado.

<sup>1</sup> Mezclado con *Streptococcus pyogenes*, <sup>2</sup> Mezclado con *Staphylococcus aureus*, <sup>3</sup> Mezclado con *Streptococcus pneumoniae*, <sup>4</sup> Mezclado con *S. pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*, <sup>5</sup> Mezclado con *Haemophilus parainfluenzae*, <sup>6</sup> Mezclado con *Enterobacter cloacae*, <sup>7</sup> Mezclado con *E. coli*.

### 4.3.2 MICROORGANISMO

#### A) IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

La identificación bacteriana se llevó a cabo según se ha descrito en material y métodos. En 20 pacientes se obtuvieron cultivos puros de *H. influenzae* serotipo e y en los otros 6 mezclados con otros microorganismos (Tabla 16). En base a sus manifestaciones clínicas, todos los casos se consideraron como clínicamente relevantes y fueron tratados con antibióticos, en algunos casos en los que el patógeno se había aislado del tracto respiratorio superior, su implicación clínica no fue posible evidenciarla con plena fiabilidad. En el serotipo f, 25 aislamientos (51%) se recuperaron de sangre (n=18) o líquido cefaloraquídeo (n=7), 19 (38,8%) de muestras respiratorias (14 de esputo y 5 de bronco-aspirados). Dos (4,1%) de abscesos y uno (2%) de conjuntiva, líquido abdominal y exudado ótico. El aislamiento en cultivo único se produjo en 38 casos y concomitante en los 11 casos restantes. Otros microorganismos aislados fueron: *Streptococcus pneumoniae* en 4 casos, *Staphylococcus aureus* en 2 casos y *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Enterobacter cloacae* y *E. coli* en un caso cada uno (Tabla 17).

#### B) RESULTADOS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE LOS AISLAMIENTOS DE *H. influenzae* DE LOS SEROTIPOS e Y f

El método utilizado fue el de referencia de micro-dilución en caldo. Las CMI de las cepas de control estuvieron siempre dentro de los límites recomendados (70).

**Serotipo e.** De los 26 aislados estudiados, 16 (61,5%) eran resistentes a ampicilina (todos ellos productores de  $\beta$ -lactamasa), 21 (80,8%) eran resistentes a

cotrimoxazol. Las cepas de *H. influenzae* serotipo e aisladas en niños de cinco años de edad o menores eran más sensibles a ampicilina y cotrimoxazol que el resto de los grupos de edad. De los 26 aislamientos, 6 eran resistentes a más de uno de los antibióticos ensayados; el 20,1% de cepas fue multirresistente. Los fenotipos más prevalentes de multirresistencia eran la resistencia combinada a ampicilina-claritromicina-cotrimoxazol y ampicilina-tetraciclina-cotrimoxazol-cloramfenicol, que se detectaron en dos aislamientos cada uno, representando el 33,3% de las cepas multirresistentes y un 7,7% del total de aislamientos. De los cuatro pacientes infectados con aislamientos resistentes a ampicilina y tetraciclina, tres eran también resistentes a cloramfenicol y presentaban al menos una patología de base. No hubo diferencias reseñables entre las cifras de resistencia de las cepas de Hie con otro microorganismo simultáneamente y las de aislamiento puro (Tabla 18).

**Tabla 18.** Sensibilidad antimicrobiana de los 26 aislamientos de *H. influenzae* serotipo e

Antibiótico	CMI <sub>50</sub> *	CMI <sub>90</sub> *	Rango*	S (%)	I (%)	R (%)
Ampicilina	>4	>4	0,25->4	10 (38,5)	0	16 (61,5)
Amox-Clav	≤0,5	≤0,5	≤0,5-1	26 (100)	0	0
Cefuroxima	0,5	1	0,5-2	26 (100)	0	0
Cefotaxima	≤0,03	≤0,03	≤0,03-0,06	26(100)	0	0
Cefixima	≤0,25	≤0,25	≤0,25	26(100)	0	0
Cefepime	0,12	0,5	≤0,06-0,5	26(100)	0	0
Meropenem	≤0,12	≤0,12	≤0,12	26(100)	0	0
Claritromicina	4	16	4-16	21 (80,8)	5 (19,2)	0
Levofloxacina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	26(100)	0	0
Ciprofloxacina	≤0,06	≤0,06	≤0,06	26(100)	0	0
Cotrimoxazol	>2	>2	≤0,5->2	3(11,5)	2(7,7)	21 (80,8)
Tetraciclina	0,5	>4	≤0,25->4	22 (84,6)	2 (7,7)	2 (7,7)
Cloramfenicol	≤2	4	≤2->4	23(88,5)	1 (3,8)	2 (7,7)
Rifampicina	≤0,5	1	≤0,5-1	26(100)	0	0

\*Expresados en µg/l.

**Serotipo f.** Los datos de sensibilidad antimicrobiana se muestran en la Tabla 19. De las 49 cepas estudiadas, 12 (24,5%) fueron resistentes a ampicilina (todas ellas productoras de β-lactamasa) y 22 (44,9%) resistentes a cotrimoxazol. La cifras de sensibilidad reducida a claritromicina, tetraciclina, cloramfenicol y rifampicina se situaron en

## RESULTADOS

el 16,3%, 12,2%, 14,3% y 2%, respectivamente. No se encontró resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, cefuroxima, cefotaxima, cefixima, cefepime, meropenem, levofloxacina y ciprofloxacina. En el subgrupo de cepas pertenecientes a infecciones pediátricas, las cifras de resistencia a ampicilina y cotrimoxazol fueron superiores a las obtenidas en adultos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas porque el nº de casos estudiado fue limitado. La resistencia múltiple (disminución de la sensibilidad a tres o más antibióticos) estuvo presente en 9 (18,4%) de los 49 aislamientos, 8 de los cuales tuvieron al menos un factor predisponente. El fenotipo de resistencia más prevalente fue el de resistencia a ampicilina-tetraciclina-cotrimoxazol-cloramfenicol el cual se detectó en 5 cepas, lo que supone el 55,5% de las cepas multirresistentes y el 10,2% de todas las cepas. De los 7 pacientes infectados simultáneamente con otras cepas, todos fueron resistentes a ampicilina y cloramfenicol, 6 fueron además resistentes a tetraciclina.

**Tabla 19.** Sensibilidad antimicrobiana de los 49 aislamientos de *H. influenzae* serotipo f.

Antibiótico	CMI <sub>50</sub> *	CMI <sub>90</sub> *	Rango*	S (%)	I (%)	R (%)
Ampicilina	0,5	>4	0,25->4	37 (75,5)	0	12 (24,5)
Amox-Clav	≤0,5	≤0,5	≤0,5-2	49 (100)	0	0
Cefuroxima	1	2	0,25-4	49 (100)	0	0
Cefotaxima	≤0,03	0,06	≤0,03-0,12	49(100)	0	0
Cefixima	≤0,25	≤0,25	≤0,25	49(100)	0	0
Cefepime	0,25	0,5	≤0,06-1	49(100)	0	0
Meropenem	≤0,12	≤0,12	≤0,12-0,5	49(100)	0	0
Claritromicina	8	16	1-16	41 (83,7 )	8 (16,3)	0
Levofloxacina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	49(100)	0	0
Ciprofloxacina	≤0,06	≤0,06	≤0,06	49(100)	0	0
Cotrimoxazol	2	>2	≤0,5->2	17(34,7)	10(24,4)	22 (44,9)
Tetraciclina	≤0,25	>4	≤0,25->4	43 (87,8)	0	6 (12,2)
Cloramfenicol	≤2	4	≤2->4	42(85,7)	3 (6,1)	4 (8,2)
Rifampicina	≤0,5	1	≤0,5->2	48(98)	0	1 (2)

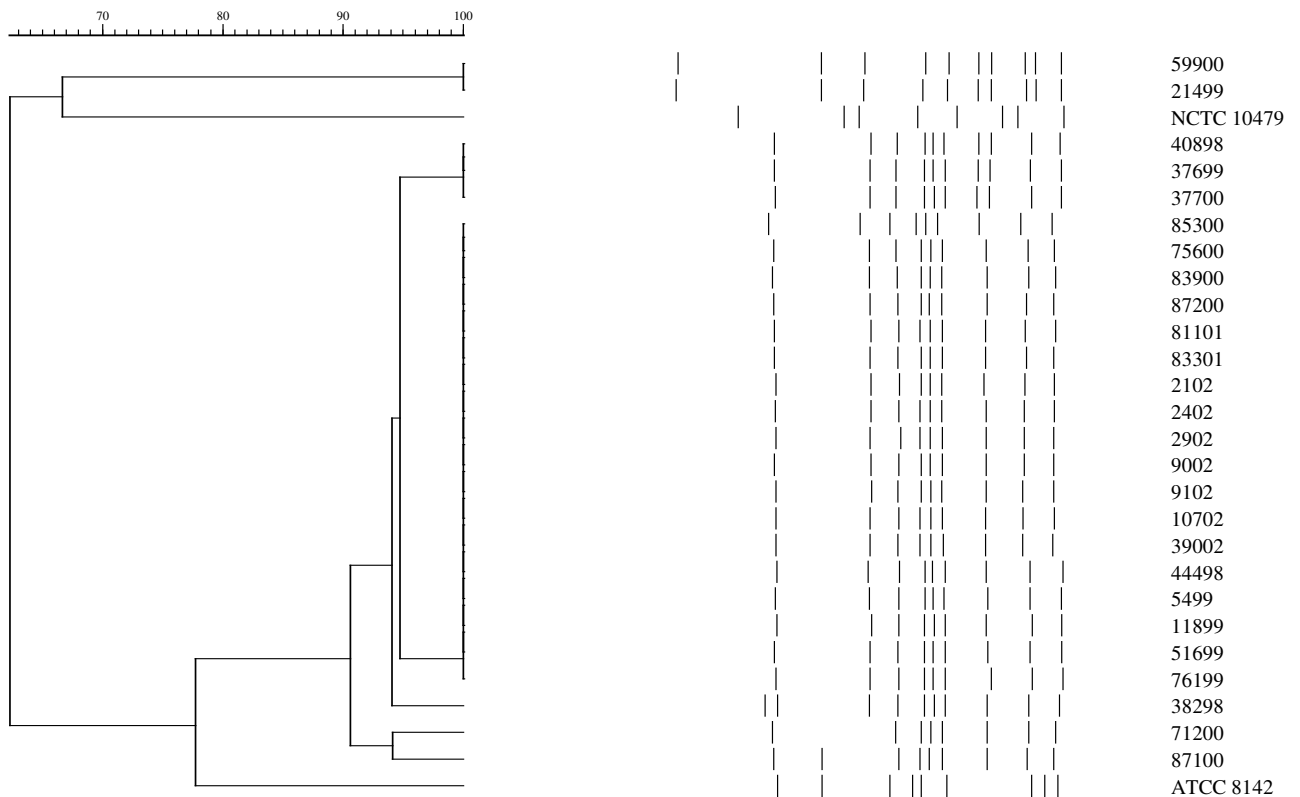
\*Expresados en µg/l

**C) ESTUDIOS MOLECULARES**

**Electroforesis en campo pulsante y análisis de los pulsotipos obtenidos**

**Serotipo e.** El análisis epidemiológico, mediante la técnica de campo pulsante, de las cepas mostró una escasa diversidad clonal, veinticuatro cepas (92,3%) pertenecían a la misma clona. La diversidad genética de los aislamientos de Hie fue menor del 10%, independientemente de su procedencia geográfica, origen clínico o sensibilidad antimicrobiana (Figura 23).

**Figura 23.** Árbol filogenético de las cepas estudiadas de *H. influenzae* serotipo e mediante campo pulsante



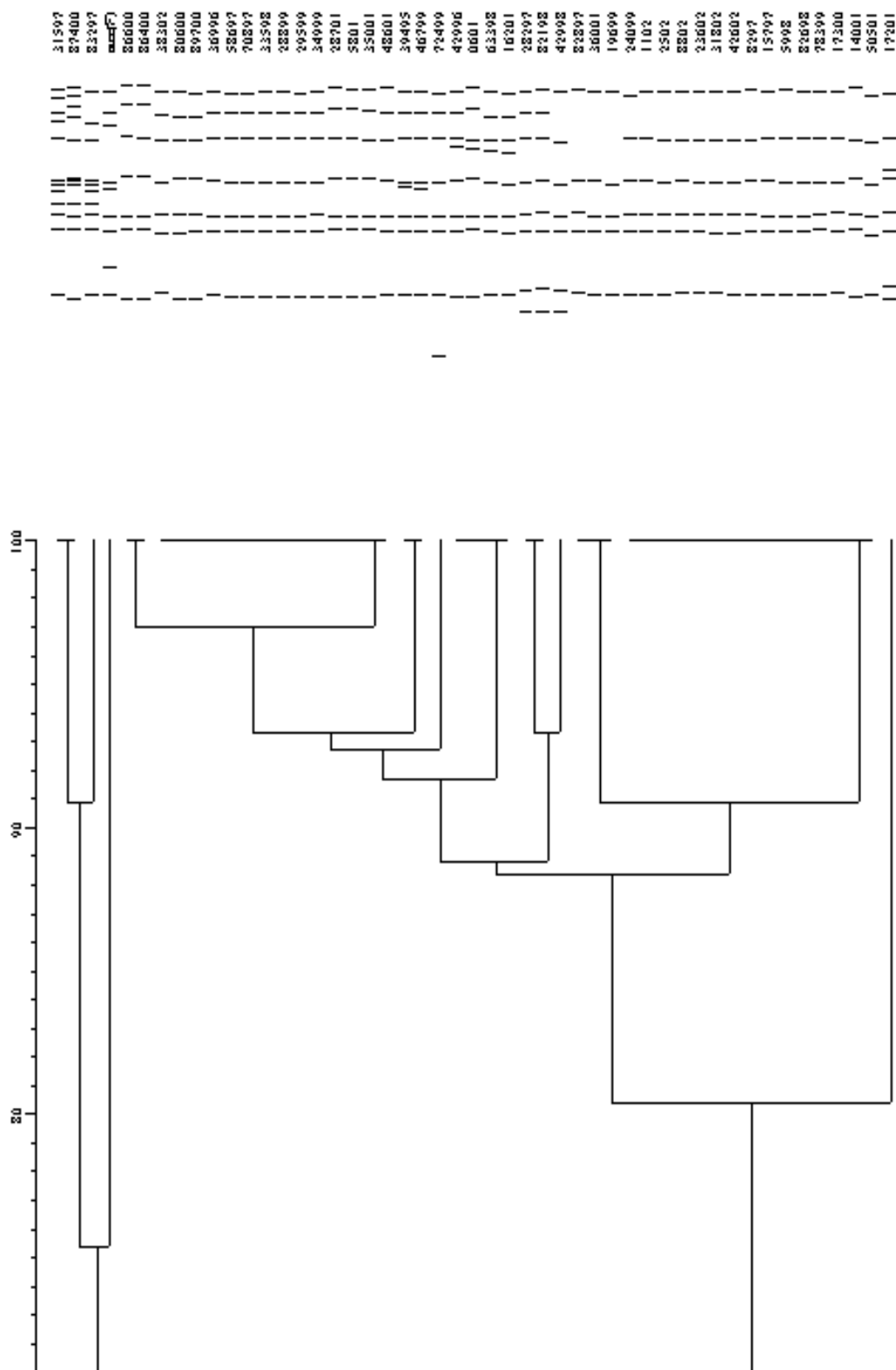
**Serotipo f.** La relación genética entre los 48 Hif y la cepa de referencia de Hif tipo f, se estimó mediante análisis de los patrones generados por PFGE (figura 24), tras la digestión de su ADN por la enzima *SmaI*. Sólo una cepa no fue digerida por la enzima. Las cepas de esta colección de Hif españolas, muestran una variabilidad genética mínima. Cuarenta y cuatro aislamientos (91,6%) presentaron similitudes genéticas superiores al 85% y según los criterios de Tenover (72) podrían considerarse cepas idénticas o altamente relacionadas. Otros criterios como procedencia geográfica, patrones de resistencia antibiótica o significado clínico no influyeron en la distribución de clonas.

### **Detección de Plásmidos Conjugativos**

**Serotipo e.** La presencia de plásmidos conjugativos de gran tamaño, se detectaron mediante PCR en siete cepas (26,9%) del total de los 26 aislamientos de Hie estudiados. Ninguno de los plásmidos detectados se encontraba integrado en el cromosoma bacteriano (75). Las cuatro cepas con fenotipo de resistencia combinado a ampicilina y tetraciclina eran portadoras de plásmidos (Tabla 20). Las cepas sensibles a todos los antimicrobianos, o sólo resistentes a cotrimoxazol no presentaron en ningún caso plásmidos conjugativos.

**Serotipo f.** Se detectaron plásmidos de gran tamaño, mediante PCR, en siete cepas (14,3%) del total de los 49 aislamientos de Hif estudiados. Ninguno de los plásmidos detectados se encontraba integrado en el cromosoma bacteriano (75). Las seis cepas con fenotipo de resistencia combinado a ampicilina, tetraciclina y cloramfenicol eran portadoras de plásmidos (Tabla 21). Las cepas sensibles a todos los antimicrobianos, no presentaron en ningún caso plásmidos conjugativos.

Figura 24. Dendrograma para representar la relación genética de las 49 cepas de *H. influenzae* serotipo fen España (según PFGE).



**Tabla 20.** Distribución de los fenotipos de resistencia antibiótica en 26 *Haemophilus influenzae* tipo e.

Perfil antibiótico	Nº de aislamientos	Nº de aislamientos con plásmidos
Sensible	3	0
Sxt	5	0
Cl-Sxt	2	0
Amp-Sxt	10	3
Amp-Tet-Sxt	1	1
Amp-Sxt-Cl	2	0
Amp-Tet-Sxt-Clo	2	2
Amp-Cl-Tet-Sxt-Clo	1	1

Amp: ampicilina, Sxt: cotrimoxazol, Cl: claritromicina, Rif: rifampicina, Tet: tetraciclina, Clo: cloramfenicol.

**Tabla 21.** Distribución de los fenotipos de resistencia antibiótica en 49 *Haemophilus influenzae* tipo f.

Perfil antibiótico	Nº de aislamientos	Nº de aislamientos con plásmidos
Susceptible	15	0
Sxt	16	0
Cl	2	0
Cl-Sxt	3	0
Rif-Sxt	1	0
Amp-Sxt	3	0
Amp-Sxt-Clo	1	1
Amp-Sxt-Cl	2	0
Amp-Tet-Sxt-Clo	5	5
Amp-Cl-Tet-Sxt-Clo	1	1

Amp: ampicilina, Sxt: cotrimoxazol, Cl: claritromicina, Rif: rifampicina, Tet: tetraciclina, Clo: cloramfenicol.

### **Búsqueda de cepas capsuladas e y f con la delección en el gen capsular bexA**

El control positivo *H. influenzae* tipo b- presentó la delección en el gen *bex A* (IS1016-*bex A*) tras la amplificación con técnica de PCR. Dicha delección se ha asociado al aumento de la virulencia en Hib. Sin embargo, ninguna cepa de *H. influenzae* tipo f (n=49) o tipo e (n=26) estudiadas, la presentó.



### **Análisis epidemiológico mediante la técnica de MLST (Multi-Locus Sequence Typing) de los serotipos e y f.**

Se utilizó esta técnica en comparación con el campo pulsante con dos grupos de cepas (e y f) que con la última técnica aparecían como genéticamente muy similares entre sí. Una vez secuenciados los genes “house-keeping” (ver material y métodos), las secuencias de las cepas de *H. influenzae* e y f de estudio se introdujeron en la base de datos de la web general de *Haemophilus* y se procedió al análisis filogenético de las cepas (83).

En la tabla 22 se recogen los datos de los alelos obtenidos con los 7 genes estudiados. A cada uno se le asignó un nº de alelo, perfil o ST (*Sequence Typing*). Los alelos descritos por primera vez, se encuentran coloreados en color lila, las cepas fenotipo f en verde y fenotipo e en rosa; estos últimos colores se conservan en todas las representaciones. Las cepas se relacionaron entre ellas (Figuras 25 y 26) y con el resto de *H influenzae* introducidos en la base de datos de los distintos serotipos (Figura 27). Los árboles utilizados fueron de tipo UPGMA BURST para ver las variaciones en un locus (SLV ST; del inglés *Single Locus Variation Sequence Typing*), en dos (DLV ST del inglés *Double Locus Variation Sequence Typing*), o en más con el fin de conocer el supuesto origen genético (SAT, Satélite), a partir del cual se han producido variaciones en la secuencia original y la clase de las mismas, mutaciones puntuales o recombinaciones, que en este caso sugieren ser mutaciones puntuales.

Se observó, al igual que con el análisis previo de PFGE, un claro predominio de un patrón de similitud genética y algunas cepas con variaciones pequeñas. No obstante, cepas que mediante PFGE eran genéticamente similares, aparecían como distantes desde el punto de vista filogenético con MLST como ocurre con las cepas: 23602, 5801, 63398 y 8297 del serotipo f y las cepas 5499 y 21499 del serotipo e. Otras, como la 59900 y 87100 del serotipo e, que ya se mostraban diferentes mediante PFGE, también lo hacen por MLST. PFGE

## RESULTADOS

mostraba algunas diferencias genéticas entre las cepas del serotipo f : 31597, 87499, 83297, 17201 que no se apreciaban mediante MLST.

No obstante, ambas técnicas muestran una visión general de la colección estudiada muy similar, mostrando unas cepas genéticamente muy relacionadas con una fuerte estructura clonal.

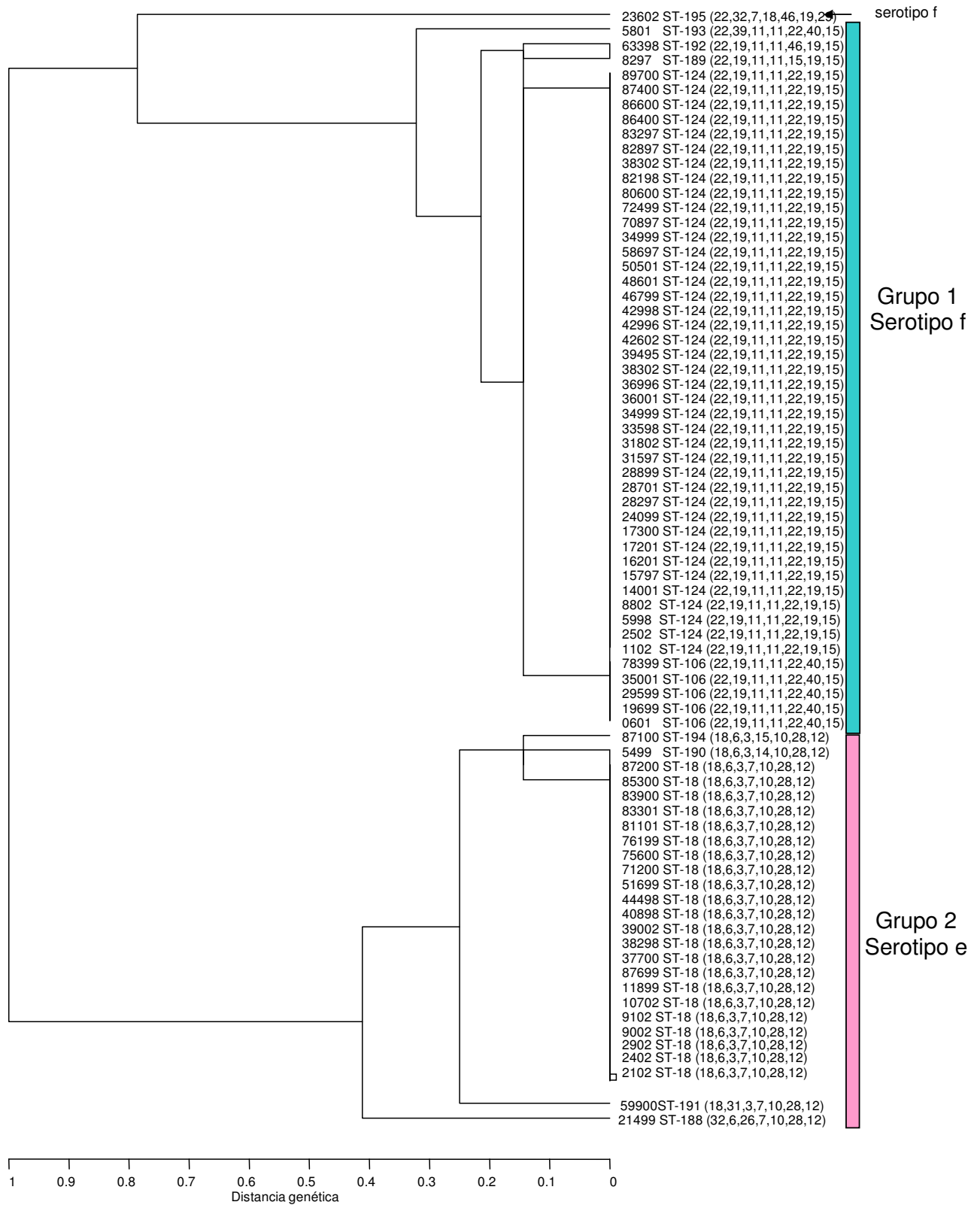
**Tabla 22.** Resumen de los alelos obtenidos en cada uno de los genes “house-keeping” analizados y los patrones ST correspondientes obtenidos con Multi-Locus Sequence Typing (MLST) en las 49 cepas de *H. influenzae* pertenecientes al serotipo f y 24 al serotipo e. En malva se muestran los descritos por primera vez.

Cepa	Serotipo	<i>adh</i>	<i>atpG</i>	<i>frdB</i>	<i>FucK</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>recA</i>	Patrón (ST)
0601	f	22	19	11	11	22	40	15	106
19699	f	22	19	11	11	22	40	15	106
29599	f	22	19	11	11	22	40	15	106
35001	f	22	19	11	11	22	40	15	106
78399	f	22	19	11	11	22	40	15	106
1102	f	22	19	11	11	22	19	15	124
2502	f	22	19	11	11	22	19	15	124
5998	f	22	19	11	11	22	19	15	124
8802	f	22	19	11	11	22	19	15	124
14001	f	22	19	11	11	22	19	15	124
15797	f	22	19	11	11	22	19	15	124
16201	f	22	19	11	11	22	19	15	124
17201	f	22	19	11	11	22	19	15	124
17300	f	22	19	11	11	22	19	15	124
24099	f	22	19	11	11	22	19	15	124
28297	f	22	19	11	11	22	19	15	124
28701	f	22	19	11	11	22	19	15	124
28899	f	22	19	11	11	22	19	15	124
31597	f	22	19	11	11	22	19	15	124
31802	f	22	19	11	11	22	19	15	124
33598	f	22	19	11	11	22	19	15	124
34999	f	22	19	11	11	22	19	15	124
36001	f	22	19	11	11	22	19	15	124
36996	f	22	19	11	11	22	19	15	124
38302	f	22	19	11	11	22	19	15	124
39495	f	22	19	11	11	22	19	15	124
42602	f	22	19	11	11	22	19	15	124
42996	f	22	19	11	11	22	19	15	124
42998	f	22	19	11	11	22	19	15	124
46799	f	22	19	11	11	22	19	15	124
48601	f	22	19	11	11	22	19	15	124
50501	f	22	19	11	11	22	19	15	124

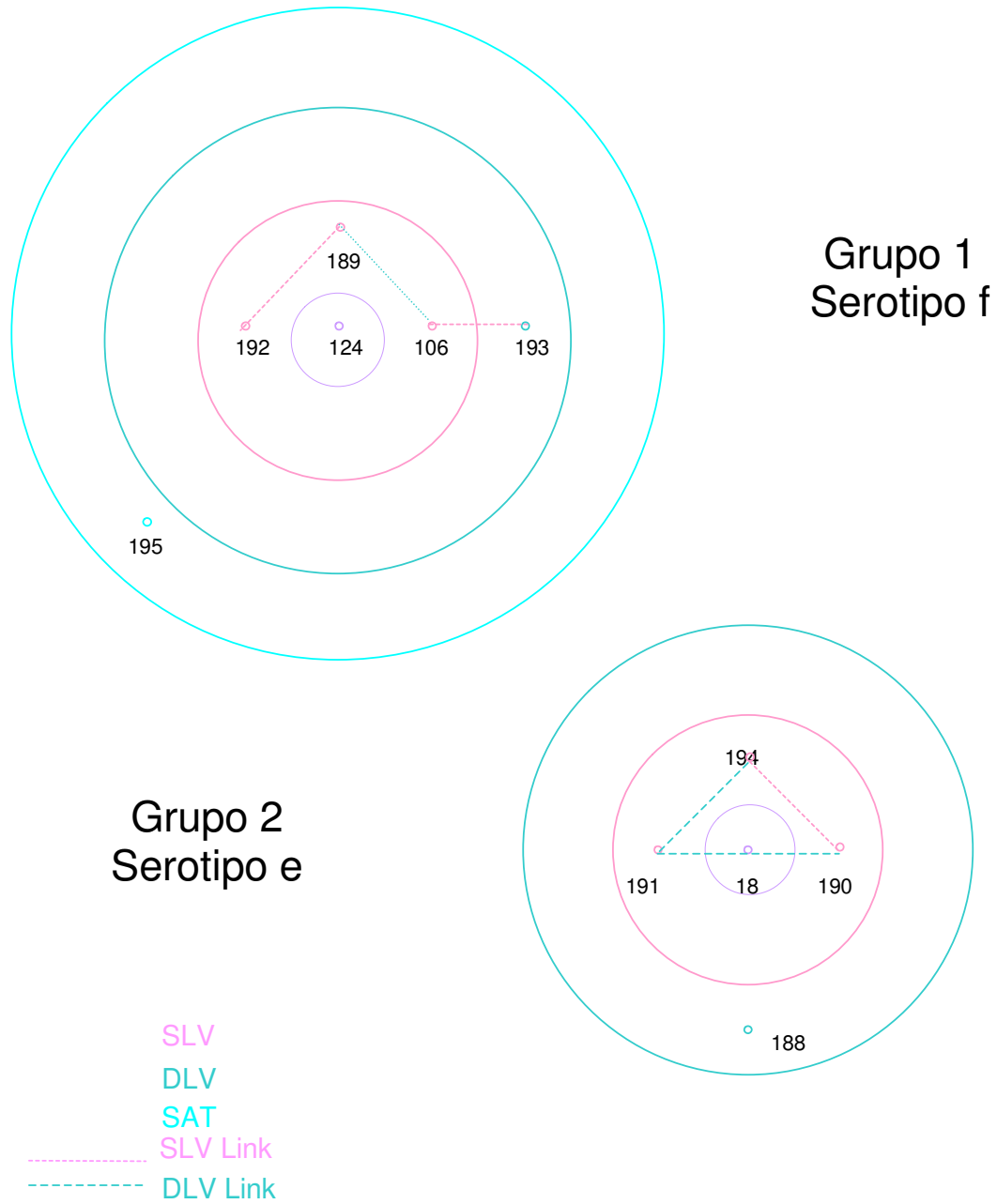
# RESULTADOS

→	58697	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	34999	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	70897	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	72499	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	80600	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	82198	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	38302	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	82897	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	83297	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	86400	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	86600	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	87400	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	89700	f	22	19	11	11	22	19	15	124
→	8297	f	22	19	11	11	15	19	15	189
→	63398	f	22	19	11	11	46	19	15	192
→	5801	f	22	39	11	11	22	40	15	193
→	23602	f	22	32	7	18	46	19	29	195
	2102	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	2402	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	2902	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	9002	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	9102	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	10702	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	11899	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	87699	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	37700	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	38298	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	39002	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	40898	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	44498	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	51699	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	71200	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	75600	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	76199	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	81101	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	83301	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	83900	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	85300	e	18	6	3	7	10	28	12	18
	87200	e	18	6	3	7	10	28	12	18
→	21499	e	32	6	26	7	10	28	12	188
→	5499	e	18	6	3	14	10	28	12	190
→	59900	e	18	31	3	7	10	28	12	191
	87100	e	18	6	3	15	10	28	12	194

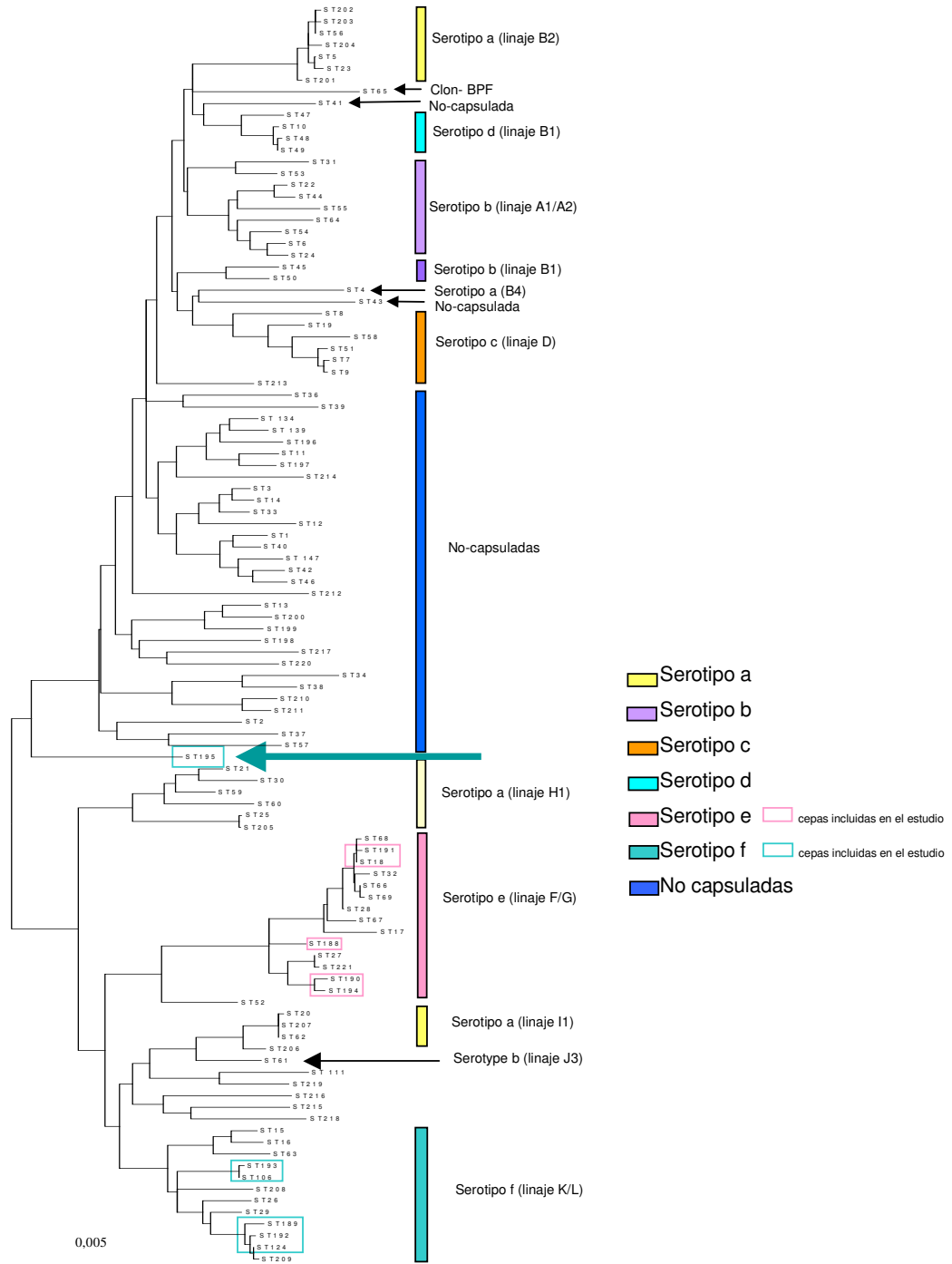
**Figura 25.** Árbol filogenético de las cepas de *H. influenzae* serotipos e y f estudiadas mediante MLST.



**Figura 26.** Diagramas que relacionan las diferencias encontradas entre los patrones o ST de las cepas de *H. influenzae* serotipos e y f mediante MLST.



**Figura 27.** Árbol filogenético de las cepas de *H. influenzae* serotipos e y f estudiadas mediante MLST dentro de la base de datos general de la especie *H. influenzae*.



### 4.4 CONOCER LOS GENES MÁS FRECUENTES, RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A COTRIMOXAZOL, AMPICILINA, CLORAMFENICOL Y TETRACICLINA.

Durante el periodo de tiempo entre 1994 y 2003, en el LNRH, se ha llevado a cabo la vigilancia de la sensibilidad a diversas familias de antibióticos de las cepas de *Haemophilus spp.* recibidas desde la mayor parte de la geografía española (más de 600 cepas anuales).

#### 4.4.1 PACIENTES

##### **A) POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se seleccionó una muestra representativa de pacientes con cepas cuya sensibilidad había sido estudiada con anterioridad.

#### 4.4.2 MICROORGANISMO

##### **A) IDENTIFICACIÓN MICROBIANA**

Se siguió la metodología descrita en los apartados anteriores seleccionando una colección de cepas representativa de todas las colecciones estudiadas. Se tratan de cincuenta y ocho cepas de *H influenzae* de distintos serotipos: catorce b, catorce e, catorce f y dieciséis no tipificables o sin cápsula. Descritas en el material y métodos (3.4.2).

##### **B) RESULTADOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA**

La determinación de la concentración mínima inhibitoria de los distintos antimicrobianos en la totalidad de las cepas de *H. influenzae* había sido estudiada mediante las técnicas de micro-dilución en caldo y los resultados se muestran en cada uno de los apartados y colecciones de cepas estudiadas. En este apartado nos centraremos en el estudio de la sensibilidad y los mecanismos genéticos de la resistencia a cotrimoxazol, trimetoprima y sulfametoxazol. El estudio de rutina de la sensibilidad frente a estos tres antimicrobianos se realizó mediante E-test pero, además, en el caso de trimetoprima, como la tira épsilon

disponible tiene como máximo rango 32 µg/ml, se estudió la sensibilidad de manera complementaria mediante el método de difusión en agar para obtener las CMI's por encima de ese valor. Los resultados se muestran en la tabla 23.

**Tabla 23.** Resultados de la sensibilidad a cotrimoxazol (trimetoprima y sulfametoxazol) de la muestra de cepas de *H. influenzae* seleccionadas para el estudio de determinantes de resistencia. Se encuentran divididas en sensibles y resistentes a cotrimoxazol.

<b>Cepas sensibles (n = 21)</b>					
Antibióticos	MIC <sub>50</sub> *	MIC <sub>90</sub> *	Rango*	S (%)	R (%)
<b>Cotrimoxazol</b>	0,094	0,19	0,023-0,19	100	0
<b>Trimetoprim</b>	0,19	0,25	0,047-0,25	100	0
<b>Sulfametoxazol</b>	64	>1024	4,5->1024	29,3	70,7
<b>Cepas resistentes (n =37)</b>					
Antibióticos	MIC <sub>50</sub> *	MIC <sub>90</sub> *	Rango*	S (%)	R (%)
<b>Cotrimoxazol</b>	16	>32	2->32	0	100
<b>Trimetoprim</b>	2048	2048	256-2048	0	100
<b>Sulfametoxazol</b>	>1024	>1024	16->1024	0	100
<b>Total de cepas (n = 58)</b>					
Antibióticos	MIC <sub>50</sub> *	MIC <sub>90</sub> *	Rango*	S (%)	R (%)
<b>Cotrimoxazol</b>	8	>32	0,023->32	36,2	63,8
<b>Trimetoprim</b>	0,25	2048	0,047-2048	36,2	63,8
<b>Sulfametoxazol</b>	512	>1024	4,5->1024	0	100

\* Expresados en µg/l

### C) CARACTERIZACIÓN DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA

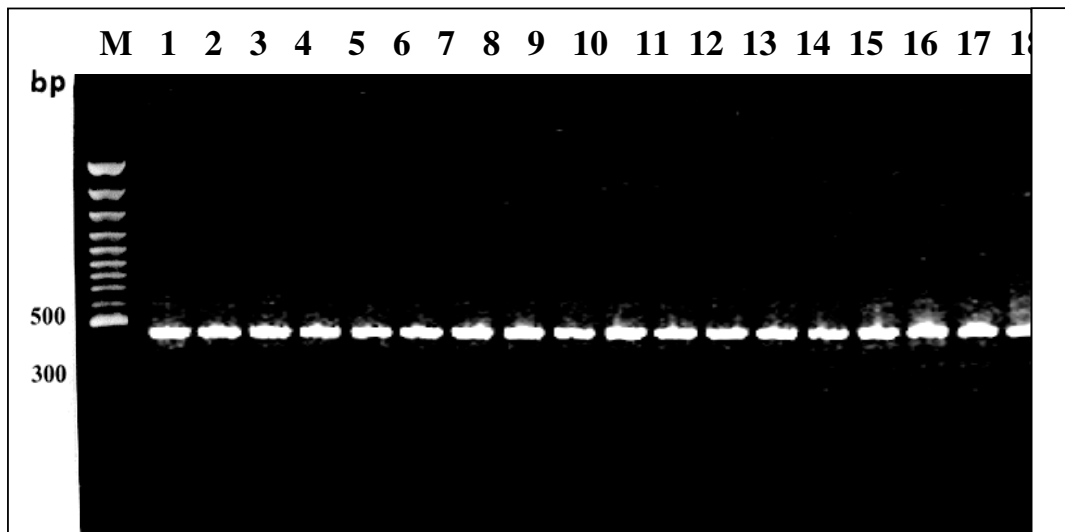
#### Determinación de la resistencia a trimetoprima

##### A) SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA DIHIDROFOLATO REDUCTASA Y SU PROMOTOR

La amplificación mediante PCR de los fragmentos de ADN de las regiones que corresponden al gen de la dihidrofolato reductasa (*folA*) y su promotor, presumiblemente implicados en la resistencia a trimetoprima en *H. influenzae*, produjeron amplicones, que posteriormente se purificaron, secuenciaron y analizaron. La figura 28 muestra una imagen de PCR donde se aprecia el marcador y los fragmentos amplificados de *folA* en 18 cepas.



**Figura 28.** Gel en el que se observa una banda de 483 pb que corresponde al producto de amplificación por PCR del gen *folA*.



Para estudiar el gen *folA* se consideró el fragmento comprendido entre las posiciones 1 a 483 (descritos en *H. influenzae* ATCC 51907 o cepa Rd) (91). Para seleccionar el promotor se consideró el fragmento comprendido entre las posiciones -52 y -1, de la misma cepa de referencia *H. influenzae* ATCC 51907 o cepa Rd; pero al no estar previamente descrito en esta cepa ni en esta especie, se utilizó la homóloga a la descrita en *E. coli* K12 (92).

#### B) ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS PRESENTES EN LAS SECUENCIAS DEL GEN *folA* Y SU PROMOTOR.

Se realizó el análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos del gen *folA* y el promotor entre la cepa estándar *H. influenzae* Rd, sensible a trimetoprima (91) y las otras 57 cepas incluidas en el estudio. Posteriormente se hizo lo mismo entre las proteínas traducidas

del gen *folA* y su promotor. Los cambios en las secuencias de ADN que condujeron a sustituciones aminoacídicas en la secuencia de los genes de *folA* se indican en la tabla 24 y se comentan y relacionan con la resistencia a continuación. Los cambios que no condujeron a cambio aminoacídico en la secuencia del gen *folA* pero constituyen una clara muestra de polimorfismo genético de gran interés y los cambios en su promotor, se comentarán y se describirán exhaustivamente en el siguiente apartado y se relacionarán con la resistencia en la tabla 27.

### **B1. Sustituciones presentes en la enzima dihidrofolato reductasa**

Del total de las 58 cepas secuenciadas, en 7 del grupo de las sensibles y en los 5 controles utilizados (también sensibles a trimetoprima), no se observó ningún cambio aminoacídico en la secuencia de la dihidrofolato reductasa. De las 9 cepas sensibles restantes, 7 tenían 1 cambio y las 2 restantes, 3 y 4 cambios respectivamente (Tabla 24).

En cuanto a las cepas resistentes, todas mostraron entre 1 y 13 sustituciones de aminoácidos. Las posiciones en que se encuentran modificaciones son: Asn 13, Met 21, Gln 66, Leu 67, Glu 71, Ile 74, Phe 79, Ser 81, Asn 84, Ile 95, Lys 107, Leu 113, Thr 118, Glu 132, Glu 135, Lys 143 (Tabla 24). Las sustituciones de unos aminoácidos por otros, siempre fueron las mismas; por ejemplo en la posición 13, la sustitución fue siempre de Asn a Ser ó en la posición 66, Glu a His... siempre el cambio en la secuencia, aunque fuera distinto, originó la misma sustitución de aminoácido para cada posición (Tabla 24).

**Tabla 24 a.** Sustituciones de aminoácidos en el gen *folA* correspondientes a 58 cepas de *H. influenzae* estudiadas, indicando su sensibilidad a cotrimoxazol y trimetoprima (método de dilución en agar).

N° de cepa	CMI (µg/ml)	Sustituciones de aminoácidos en la posición indicada <i>folA</i>																						
		Asn 13	Met 21	Ile	His	Pro	Leu	Glu	Ile	Phe	Leu	Val	Leu	Arg	Asp	Leu	Gln	Phe	Ala	Thr	Glu	Glu	Lys	
SENSIBLES	Coti	TMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 51097 Rd	0,023	0,047	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 49247	0,19	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 8142	0,19	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa MAP	0,125	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa Eagan	0,19	0,094	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo de 7 cepas	0,064-0,125	0,064-0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo de 2 cepas	0,023-0,19	0,047-0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo de 2 cepas	0,064	0,094-0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo de 2 cepas	0-0,064-0,094	0,125-0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8802	0,19	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54013	0,094	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26803	0,064	0,094	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 24 b.** Sustituciones de aminoácidos en el gen *folA* correspondientes a 58 cepas de *H. infusurum* estudiadas indicando su sensibilidad a cotrimoxazol y trimetoprima (método de dilución en agar).

N de cepa	CMI (µg/ml)		Sustituciones de aminoácidos en la posición indicada																								
	Conti	IMP	Asn	Met	Gln	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Phe	Ser	Asn	Ile	Leu	Ile	Leu	Asp	Asp	Leu	Val	Leu	Asp	Leu	Leu	Leu	
Grupo de 6 cepas	>32	2048	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo de 3 cepas	4-16	256-512	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grupo de 2 cepas	>32	2048	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4998	>32	2048	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59900	>32	2048	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8803	>32	2048	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34903	4	256	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42998	>32	2048	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6603	>32	2048	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
53703	>32	2048	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50085	16	512	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
82198	>32	2048	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11598	8	256	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48601	6	512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31798	4	256	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
74700	6	256	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2999	12	512	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
52503	>32	2048	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13803	8	512	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44500	16	512	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56502	4	256	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
87200	12	512	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
53103	>32	2048	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83900	8	512	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40898	>32	2048	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35001	2	256	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
58497	8	256	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5801	16	512	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
54103	6	512	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Algunas sustituciones parecían tener más importancia que otras a la hora de originar resistencia. Concretamente, Leu67 a Pro, Ile74 a Val, Phe79 a Leu, Asn84 a Asp e Ile95 a Leu no parecían relacionarse con la resistencia al aparecer tanto en cepas resistentes pero estar también presentes en cepas sensibles. La sustitución Met 21 a Ile parece relacionarse con la resistencia de alto nivel ya que todas las cepas con CMI >32 µg/ml a cotrimoxazol y 2048 µg/ml a trimetoprima, mostraban esta sustitución no presente en cepas con menores niveles de resistencia.

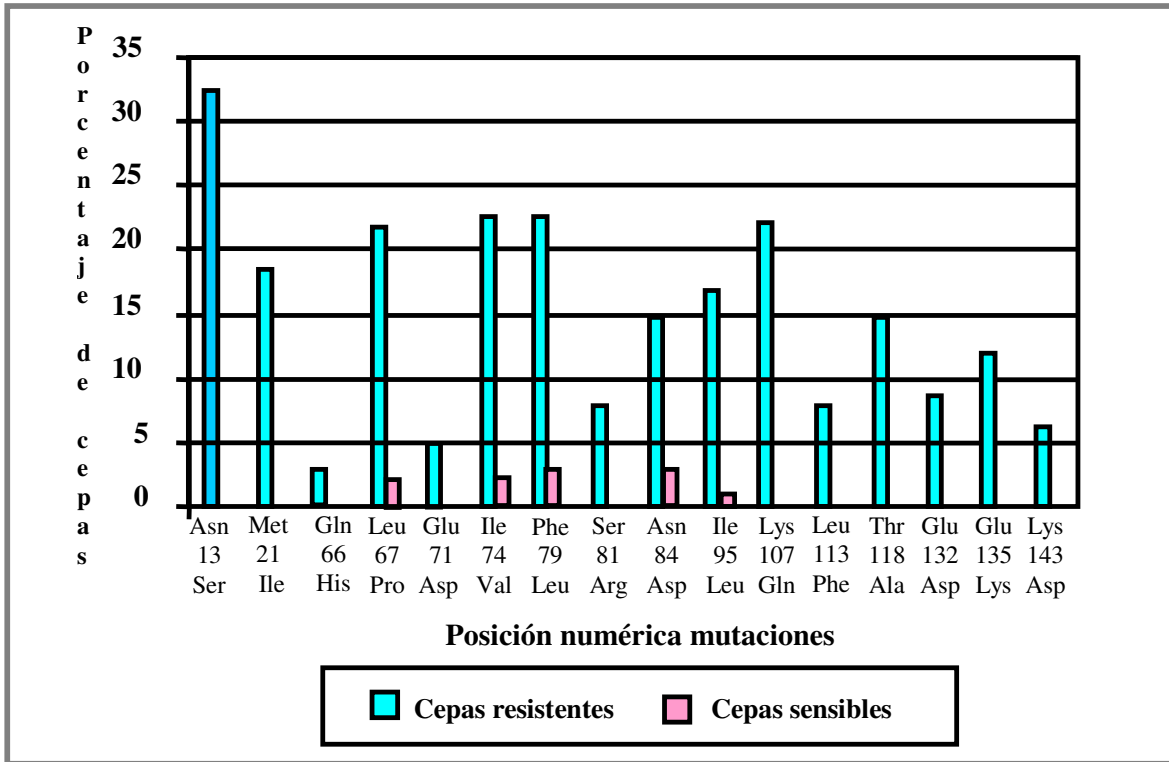
Algunas sustituciones aparecen con mayor frecuencia en las cepas resistentes como es el caso de Lys107 a Gln presente en 21 de 37(56,7%) o como Asn13 a Ser que aparece en 32 de 37 cepas resistentes (86,5%); además, las 5 cepas resistentes sin ese último cambio, tenían la sustitución ya mencionada Met21 a Ile.

Las sustituciones restantes presentaron frecuencias menores con cifras del 40,5% para Thr118 a Ala, 29,7% para Glu135 a Lys, 24,3% para Glu132 a Asp, 21,6% para Leu113 a Phe, 16,2% para Ser81 a Arg y Lys143 a Glu , 10,8% para Glu71 a Asp y 8% para Gln66 a His. Todos los cambios descritos estuvieron asociados con la resistencia ( $p < 0,0001$ ).

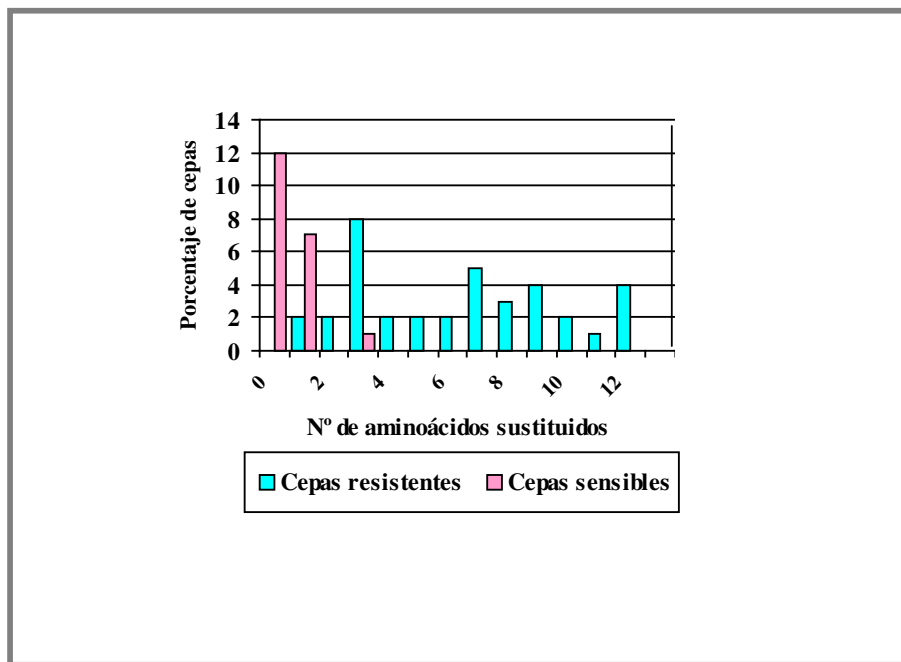
Las figuras 29 y 30 junto a la tabla 24, resumen estas consideraciones.

RESULTADOS

**Figura 29.** Relación de los cambios aminoacídicos identificados en el gen *fol A* y su frecuencia en cepas sensibles y resistentes a trimetoprima.(en oscuro las de alta frecuencia y en claro las demás). En abscisas se indica el aminoácido original descrito en la cepa de referencia Rd, la posición numérica del aminoácido que cambia y el nuevo por el que ha sido sustituido.



**Figura 30.** Distribución de las cepas de estudio en función del número de cambios aminoacídicos encontrados en *fol A*. En abscisas se representa el número de cambios.



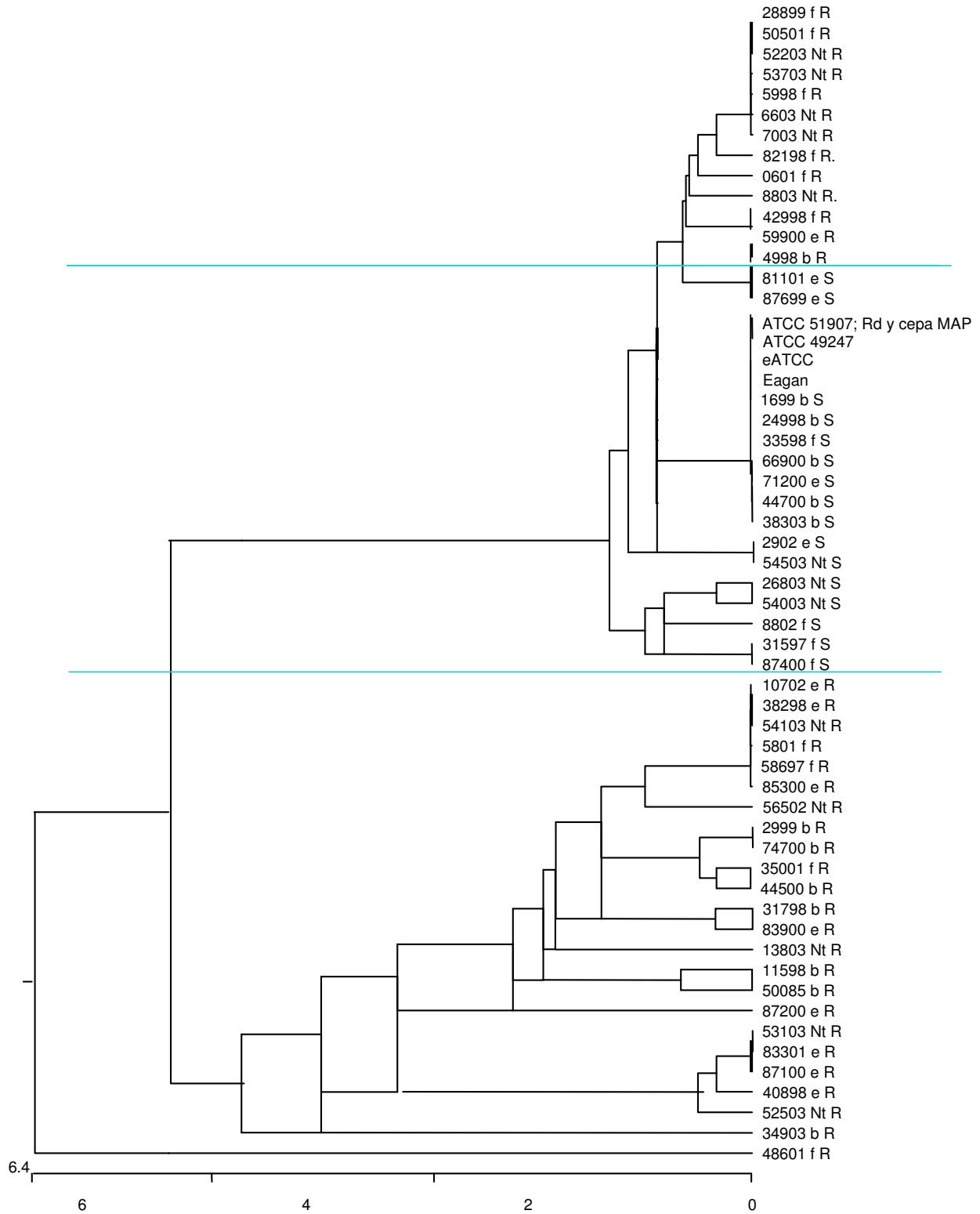
Para representar gráficamente las relaciones genéticas entre los alelos encontrados, se estimaron las distancias entre todas las posibles parejas de secuencias de aminoácidos y se obtuvo una matriz de distancias. La distancia genética se mide en función del número de aminoácidos sustituidos entre dos secuencias, luego se construye el árbol filogenético mediante un algoritmo de agregación.

Para determinar la fidelidad del árbol se aplicó el método estadístico *Bootstrap*. Este método construye el árbol consenso a partir de 500 árboles obtenidos reorganizando las distintas secuencias (Figura 31). En esta figura se observa la clara existencia de dos grupos: uno formado por cepas resistentes únicamente y el otro por cepas sensibles y un subgrupo de resistentes con pocos cambios de aminoácidos. Estos subgrupos, aunque próximos, no se mezclan entre sí y las cepas sensibles están separadas de las resistentes. Probablemente la proximidad entre las cepas del último grupo, se debe a que los árboles están contruidos sin eliminar las sustituciones presentes tanto en las cepas sensibles como en las resistentes no implicadas aparentemente en la resistencia. Si las eliminásemos, la separación entre cepas sensibles y resistentes sería completa. También se observa la independencia de las cepas en su estructura respecto de la presencia o no de cápsula y del serotipo al que pertenezcan.

### **B2. Análisis de la diversidad de las secuencias del gen *folA* y su promotor**

Los aminoácidos que constituyen la enzima dihidrofolato reductasa eran frecuentemente codificadas por codones distintos a los descritos en la cepa ATCC 51079 Rd. Estas diferencias se producían en un único nucleótido del triplete, denominándose SNP (“single nucleotide polymorphisms”) y en sólo en 3 posiciones a dos nucleótidos del triplete, denominándose DNP (“Double nucleotide polymorphisms”). Del primer grupo, algunas de ellas no originaban cambios en la estructura proteica de esta enzima esencial en el metabolismo bacteriano, por lo que se denominan **mutaciones silentes** o también

**Figura 31.** Árbol filogenético de la distribución de los cambios de aminoácidos en las 58 cepas de *H. influenzae* estudiadas.





“synonymous SNPs” (sSNPs) (93), otras diferencias de este mismo grupo y todas las del grupo DNP, sí generaban un cambio en la estructura proteica a las que denominaremos **mutaciones no silentes** que en su mayoría, como hemos visto en el apartado anterior, se asociaban a resistencia a trimetoprima.

Al analizar el porcentaje de variabilidad debido a mutaciones silentes del gen *folA* estudiado y su promotor en comparación con la cepa 51097 Rd (91), se observó que todos ellos presentaban una variabilidad similar en torno al 80% (referida en número de posiciones variables por cada 100 pb), como se indica en la Tabla 25 .

**Tabla 25.** Número de sitios polimórficos y porcentaje de variabilidad en gen estudiado, *fol A* y su promotor.

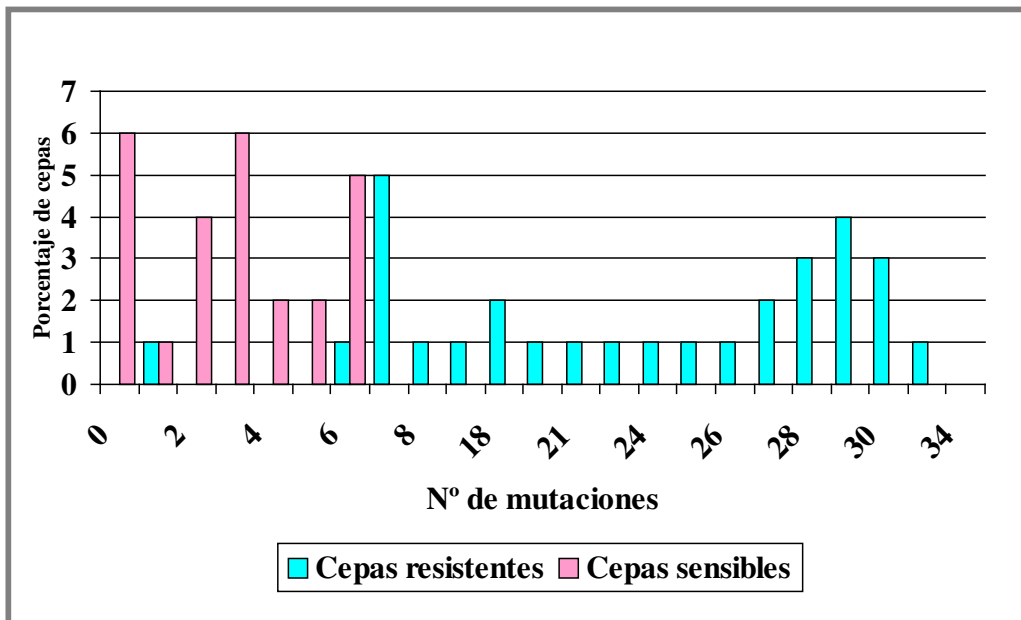
Gen	Tamaño (pb)	N° de sitios polimórficos		% de variabilidad (100 pb)	
		Silentes	No silentes	Silentes	No silentes
<i>fol A</i>	483	41	19	8,5	3,9
Promotor	52	4			

En lo que se refiere a la frecuencia de aparición de los citados SNPs, la mayor parte eran de baja frecuencia (Tabla 26). Para el gen *folA*, y su promotor los polimorfismos de alta y de media se distribuyen principalmente en el grupo de cepas resistentes (Figuras 32 y 33).

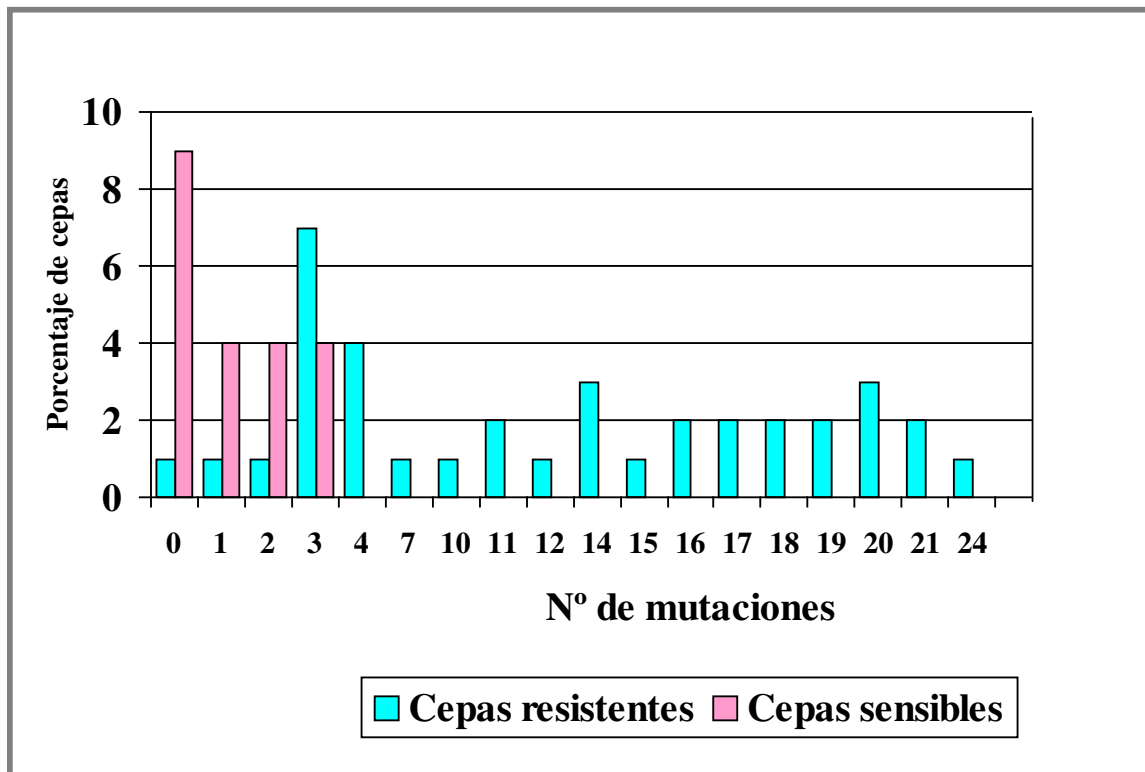
**Tabla 26 .** Frecuencia de aparición de los diferentes polimorfismos silentes detectados en el gen secuenciado *fol A* y los polimorfismos, en general, de su promotor.

Gen	Frecuencia de aparición de los polimorfismos (N° de SNPs)			
	Baja (<25%)	Media (25% -50%)	Alta (50% -75%)	Muy alta (≥75%)
Promotor	3	1	0	0
<i>folA</i>	25	14	1	0

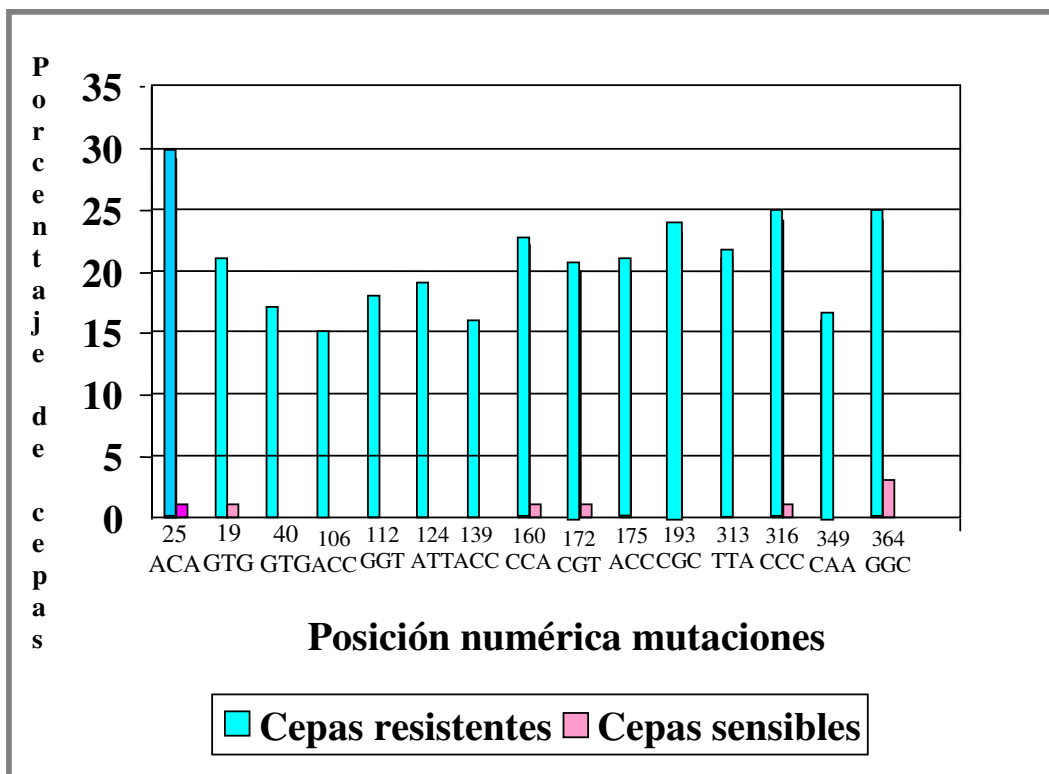
**Figura 32.** Distribución del número de polimorfismos silentes y no silentes encontrados en *fol A*. En abscisas se representa el número de polimorfismos.



**Figura 33.** Distribución de las cepas de estudio en función del número de sSNPs encontrados en *fol A*. En abscisas se representa el número sSNPs.



**Figura 34.** Relación de los polimorfismos de frecuencia alta, en oscuro y media, en claro; identificados en el gen *fol A* y la contribución a cada uno de ellos de las cepas de los 2 grupos. En abscisas se indica la posición numérica del nucleótido que cambia y el codón en que se encuentra.



El número de polimorfismos acumulados por cepa para *folA* oscilaba entre 0 y 7 en las cepas sensibles y 1 a 34 en las resistentes. En la Figuras 33 y 34 se representa la distribución de cepas del estudio en función del número total de sSNPs encontrados al analizar sus secuencias en cada uno de los genes estudiados. Los sSNPs se acumulaban de 0 a 3 en las cepas sensibles y de 0 a 24 en las resistentes.

Al analizar los polimorfismos en general en los fragmentos secuenciados de cada cepa, el número de alelos distintos para *fol A* fue de 47 de 58 cepas, con 60 posiciones polimórficas, mientras para los sSNPs, el número de alelos fue de 40, con 41 posiciones polimórficas. El grado de similitud genética entre los distintos alelos de cada gen así como su frecuencia de aparición se muestra en la tabla 27 y la figura 34. En azul oscuro se muestran

las mutaciones encontradas con alta frecuencia y en claro las de frecuencia media. En la figura 34 sólo se muestran estos 2 grupos. Respecto al resto de posiciones polimórficas encontradas (de baja frecuencia) fueron: 76 CCT con 10 cepas resistentes, 79 GCA con 4 resistentes, 88 GCT con 15 resistentes, 100 CAG con 3 sensibles, 109 ACT con 3 resistentes, 118 CCT con 9 resistentes, 130 GGG con 4 resistentes, 157 CGT con 10 resistentes, 214 con 5 resistentes, 217 GTG con 3 resistentes, 247 GTC con 4 resistentes y 1 sensible, 274 ATT con 2 resistentes, 280 TTG con 5 resistentes, 289 GGG con 6 sensibles, 292 GGA con 1 sensible, 301TTC con 1 resistente, 322 GCA con 5 resistentes, 325 GAT con 5 resistentes, 334 TAC con 8 resistentes, 370 GAT con 1 resistente, 385 TTG con 3 resistentes, 388 AAT con 1 resistente, 412 TTT con 1 resistente, 415 GAT con 7 resistentes y 1 sensible, 424 CGT con 4 sensibles y 1 resistente y 430 GCG con 2 sensibles y 2 resistentes. Más mutaciones en las cepas resistentes como lo que ya hemos descrito y 2 posiciones: 289 y 292 en dónde sólo aparecen cepas sensibles.

En cuanto al promotor de *folA*, no presentó cambios en ninguna de las cepas sensibles ni en los controles y sí presentó cambios en todas y cada una de las cepas resistentes. Estos cambios, siempre SNP y sólo 4, fueron mutaciones puntuales en posiciones, siempre las mismas y de la misma base por la misma base: T-3 a C, G-19 a T, T-40 a C y A-48 a C. Las mutaciones G-19 y T-40C respecto de A-48C parecen ser mutuamente excluyentes; si aparecen las 2 primeras, no aparece la otra y viceversa. La mutación A-48C aparece en el 73% de los casos (27 de 37 cepas resistentes) y las mutaciones G-19T y T-40C y en el 27% restante (10 de 37 cepas resistentes). La mutación G-19T aparece sólo si aparece T-40C y viceversa.





Por último mencionar que la sustitución de bases T-3C del promotor, se produjo en 17 de las 37 cepas resistentes (40,8%) pero en todos los casos conjuntamente con la A-48C y ninguna vez con G-19T y T-40C, por lo que parecen relacionadas. Estos datos también se muestran en la tabla 27.

Para representar gráficamente las relaciones genéticas entre los alelos encontrados, se obtuvo un árbol filogenético o dendograma. Para ello es necesario estimar las distancias entre todas las posibles parejas de secuencias y obtener una matriz de distancias. La distancia genética se mide en función del número de nucleótidos sustituidos entre dos secuencias, luego se construye el árbol filogenético aplicando un algoritmo de agregación.

Para determinar la fidelidad del árbol se aplicó el método estadístico “Bootstrap”. Este método construye el árbol consenso a partir de 500 árboles obtenidos reorganizando las distintas secuencias (igual que se hizo con las cadenas de aminoácidos), figura 35. Todas las cepas sensibles se agruparon por encima de la línea y todas las resistentes por debajo excepto una, que no tenía mutaciones silentes. Aquí también se observa la independencia de las cepas en su estructura respecto de la presencia o no de cápsula y del serotipo al que pertenezcan.

### C) OBTENCIÓN DE MUTANTES *IN VITRO* RESISTENTES A TRIMETOPRIMA DE *H. influenzae*.

A partir de la cepas Rd y MAP se obtuvieron mutantes isogénicos *in vitro*. El experimento de mutación “*in vitro*” se llevó a cabo por duplicado, la cepa que se sometió a presión selectiva con trimetoprima fue la cepa Rd y la MAP (Tabla 24), la frecuencia de mutación obtenida fue de aproximadamente  $7 \times 10^{-12}$  ufc/ml en ambos casos.

RESULTADOS

**Figura 35.** Arbol filogenético de la distribución de los sSNPs en las 58 cepas de cepas salvajes de *H. influenzae* estudiadas.





La descripción de los mutantes obtenidos se muestra en las Tablas 28 (polimorfismos no silentes o con cambios de aminoácido) y 29 (polimorfismos silentes, sin cambio de aminoácido). Dado el bajo número de mutantes obtenido en ambos experimentos (21 en el primero y 23 en el segundo, respectivamente), se secuenciaron el gen *folA* y su promotor en todos ellos.

La nomenclatura utilizada fue asignar letras de la **a** a la **v** en los mutantes derivados de la cepa Rd (en rojo en figuras y tablas) y de la **a'** a la **s'** en los derivados de la cepa MAP (en azul en figuras y tablas).

La cepa Rd sometida a presión selectiva con trimetoprima adquirió un elevado nivel de resistencia (CMI: 256 µg/ml) en un solo paso, en todos los casos y la MAP análogamente de 512 µg/ml. Sin embargo, del total de las 44 cepas mutantes analizadas, se obtuvieron 8 patrones diferentes entre sí, aunque iguales a los que ya se habían encontrado en cepas salvajes. No apareció ningún patrón nuevo (Tablas 28 y 29). Tampoco se obtuvo ningún mutante con CMI > 1024 µg/ml, ni con la mutación Met 21 a Ile aparentemente responsable de la citada CMI.

Por último, se incluyeron las cepas mutantes en los dendogramas construidos de cepas salvajes tanto basándonos en la cadena de aminoácidos (Figura 36), como en la secuencia de ADN (Figura 37) con el fin de comparar la agrupación de las cepas salvajes y la de los mutantes y buscar analogías en las distribuciones.

En estos dendogramas de las figuras 36 y 37, al igual que en las tablas 28 y 29, puede observarse que todas las cepas mutantes se agrupan con aquellas cepas salvajes a las que son idénticas, sin modificar las estructuras (ver figuras 31 y 35). Los cambios conseguidos mediante la mutación “in vitro” parecen reproducir los que se producen “in vivo”

**Tabla 28.** Sustituciones de aminoácidos en el gen *folA* correspondientes a las 44 cepas de *H. influenzae* mutantes de la cepa Rd (rojo) y de la cepa MAP (azul) indicando su sensibilidad a trimetoprima (método de dilución en agar).

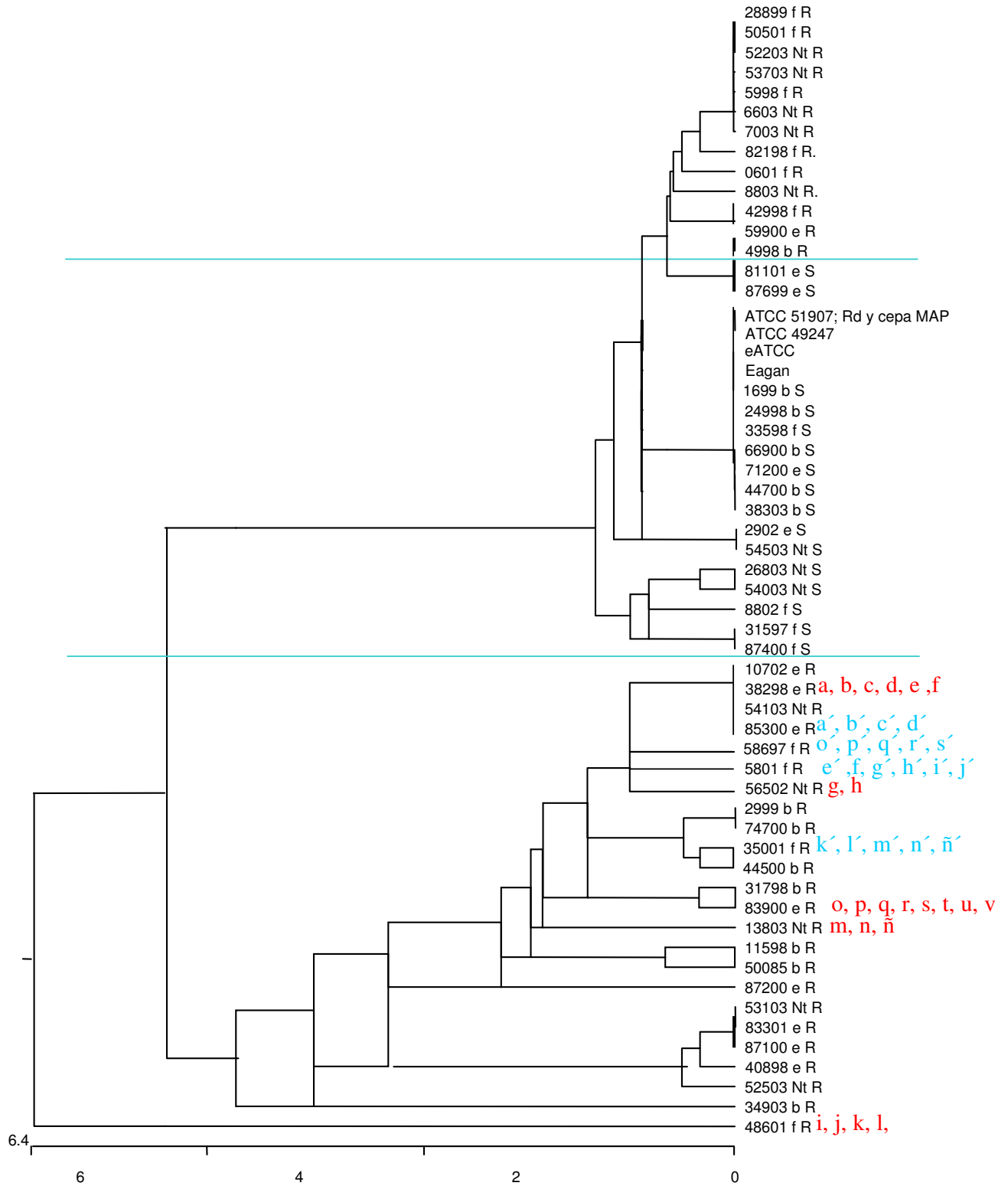
Nº de cepa	CMI (H <sub>2</sub> O/2ml)	Sustituciones de aminoácidos en la posición indicada															
		Asn	Met	Glu	Leu	Leu	Glu	Ile	Phe	Ser	Asn	Ile	Lys	Leu	Thr	Glu	Lys
RESISTENTES	TMP	13	21	66	67	71	74	79	81	84	95	107	113	118	132	135	143
		Ser	Ile	His	Pro	Asp	Val	Leu	Arg	Asp	Leu	Glu	Phe	Ala	Asp	Lys	Glu
a, b, c, d, e, f, a', b', c', d'	256-512	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
g, h	256	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
i, j, k, l	256	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
m, n, ñ	256	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
o, p, r, s, t, u, v	256	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
e', f', g', h', i', j'	512	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
k', l', m', n', ñ'	512	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
o', p', q', r', s'	512	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

**Tabla 29.** Mutaciones, encontradas en el gen *folA* y su promotor, correspondientes a 44 cepas de *H. influenzae* mutantes indicando su sensibilidad a trimetoprima (método de dilución en agar).

Nº de cepa	Promotor	Mutaciones en la posición indicada																				
		A	I	G	I	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A					
RESISTENTES	TMP	-48	-40	-19	3	19	25	40	104	112	124	139	140	172	175	193	313	314	349	344	Obs	
		C	C	I	C	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	da
																						ba
																						Fr
a, b, c, d, e, f, a', b', c', d'	256-512	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
g, h	256	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
i, j, k, l	512	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m, n, ñ	512	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
o, p, r, s, t, u, v	512	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
e', f', g', h', i', j'	512	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
k', l', m', n', ñ'	256	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
o', p', q', r', s'	256	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

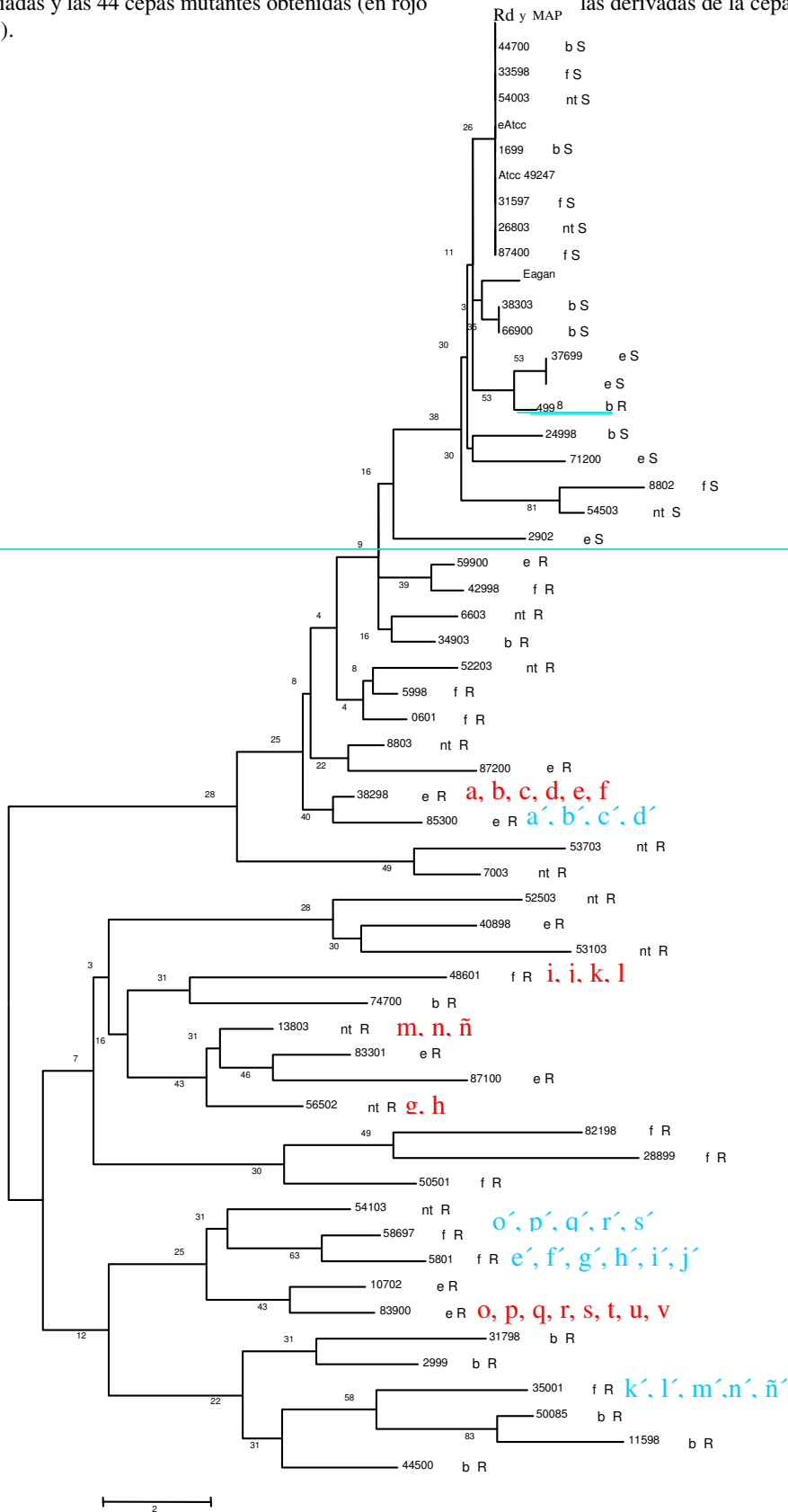
RESULTADOS

**Figura 36.** Árbol filogenético de la distribución de los cambios de aminoácidos en las 58 cepas salvajes de *H. influenzae* estudiadas y las 44 cepas mutantes obtenidas (en rojo las derivadas de la cepa Rd y en azul de la cepa MAP).



RESULTADOS

**Figura 37.** Árbol filogenético de la distribución de los sSNPs en las 58 cepas salvajes de *H. influenzae* estudiadas y las 44 cepas mutantes obtenidas (en rojo MAP) las derivadas de la cepa Rd y en azul de la cepa MAP).



### **Determinación de la resistencia a otros antibióticos**

Los resultados se resumen en la tabla 30.

#### A) DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A SULFAMETOXAZOL

Basándonos en lo descrito previamente en la literatura (85), mediante técnica de PCR (ver apartado 3.1.2) se determinó la presencia o no de un plásmido portador de la resistencia a este antibiótico (*sul2*).

Todas las cepas estudiadas resistentes a cotrimoxazol y sulfametoxazol, n=31, mostraron la presencia de este determinante de resistencia.

Además, en 15 cepas todas ellas con CMI's superiores a 1024 µg/ml, se amplificó el gen de la dihidrofolato sintetasa. Las secuencias obtenidas en todos los casos fueron idénticas a la secuencia utilizada de referencia perteneciente a la cepa ATCC 51907 o cepa Rd (91).

#### B) DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A AMPICILINA

Como se describe en material y métodos, se llevó a cabo la amplificación de los genes *tem1* por PCR (86). En todas las cepas resistentes a ampicilina (n =28) se amplificó el gen de la enzima TEM-1 mientras que ello no ocurrió en ninguna cepa sensible a este antibiótico.

#### C) DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A CLORAMFENICOL

En ninguna de las cepas sensibles estudiadas (n=40) se amplificó por PCR ninguno de los genes *cat* ensayados para determinar la presencia de las cloranfenicol-acetil-transferasas (CAT) (87,88), causantes habitualmente de la resistencia a este antibiótico en esta especie bacteriana. Por el contrario, en todas las cepas con sensibilidad disminuida a cloramfenicol (n=18) se amplificó el gen *cat* tipo II.

#### D) DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A TETRACICLINA

Como se menciona en material y métodos, se llevó a cabo la detección de los genes

## RESULTADOS

*tet* más frecuentemente aislados en *H. influenzae* mediante PCR (89,90). Dichos genes están implicados en la producción de resistencia a este antibiótico principalmente a través de 2 mecanismos: protección ribosómica (*tetM*, *tetO*) o eflujo o achique (*tetM2*, *tetR*, *tetK*, *tetB*). En la totalidad de las cepas resistentes a tetraciclina (n=12) amplificó el gen de la bomba de achique *tetB* en exclusiva. Ninguna cepa sensible presentó ningún mecanismo de resistencia de los estudiados.

**Tabla 30.** Genes de resistencia antibiótica encontrados en la colección representativa de 58 cepas de *H. influenzae* estudiadas.

Genes de resistencia	Cepas Sensibles		Cepas resistentes	
	N <sup>a</sup> cepas	Gen + (%)	N <sup>a</sup> cepas	Gen + (%)
<b>Sulfametoxazol</b>	19		39	
Plásmido <i>sul2</i>		0 (0)		39 (100)
<b>Ampicilina</b>	30		28	
<i>tem</i>		0 (0)		28 (100)
<b>Cloramfenicol</b>	40		18	
<i>cat I</i>		0 (0)		0 (0)
<i>cat II</i>		0 (0)		18 (100)
<i>cat III</i>		0 (0)		0 (0)
<b>Tetraciclina</b>	46		12	
<i>tetM</i>		0 (0)		0 (0)
<i>tetO</i>		0 (0)		0 (0)
<i>tetM2</i>		0 (0)		0 (0)
<i>tetR</i>		0 (0)		0 (0)
<i>tetK</i>		0 (0)		0 (0)
<i>tetB</i>		0 (0)		12 (100)

## **DISCUSIÓN**

### 5. DISCUSIÓN (Organizada por objetivos)

#### 5.1 CONOCER LA INCIDENCIA DE *H. influenzae* CAUSANTE DE ENFERMEDAD INVASIVA TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA CONJUGADA DE HIB EN LA CAM.

Tanto la incidencia de la enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* serotipo b como el número de portadores en niños pequeños han disminuido de manera drástica en los países occidentales. Esta disminución se debe a la implantación de programas activos de vacunación (9-11,94-96). A pesar de su elevada eficacia, se han descrito casos de fallos vacunales, es decir, aparición de enfermedad invasiva (meningitis y/o septicemia) por Hib en niños correctamente vacunados. Por otro lado, la información disponible acerca de la epidemiología de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* después de la vacunación generalizada es escasa.

En la CAM el programa de vacunación con la vacuna conjugada contra Hib de la población infantil comenzó en 1998, aunque las vacunas conjugadas estuvieron disponibles para uso privado al menos dos años antes. La incidencia de la enfermedad invasiva por *H. influenzae* en la CAM se estimó en 20 casos/100.000 habitantes de 4 años o menores de edad en 1994 (66). En comparación con los datos obtenidos en esta tesis, su incidencia en este grupo de edad disminuyó al menos en un 75%.

Falla et al (68) comunicaron que el 57% de sus cepas no serotificables de *H. influenzae* procedentes de niños vacunados fueron deficientes en cápsula (fenotipo b<sup>-</sup>), es decir cepas invasivas que, debido a una mutación, no expresaban los antígenos capsulares del tipo b pero que conservaban la estructura genética de Hib. Se ha sugerido (68) que el aumento de la circulación de cepas b<sup>-</sup> sería consecuencia de la vacunación masiva; sin embargo, en esta tesis no se confirman estos resultados en niños de la CAM utilizando una metodología similar.



La mayoría de estudios internacionales sobre el tipo de cepas invasivas de *H. influenzae* en la época pre-vacunal demostraron que más del 80% de los casos fueron causados por Hib (94,97-99). Así, en un estudio realizado en el Reino Unido, las cepas de Hib representaron el 84% de todas las invasivas, mientras que solo el 1% pertenecieron a otros tipos capsulares (99). En un estudio reciente de Brasil, Hib representó el 97,8% de sus cepas invasivas seguido por cepas no capsuladas (1,5%) y el las del serotipo a (0,5%) (98).

Los estudios epidemiológicos realizados después de la vacunación generalizada contra Hib, muestran cambios epidemiológicos muy importantes en la distribución de cepas de *H. influenzae* (64,99). Según datos de esta tesis, las infecciones invasivas por Hib constituyeron el 16,5% de las infecciones invasivas por *H. influenzae* en la CAM, una proporción similar a la de otro estudio español realizado en Cataluña (64); los datos de ambos estudios se obtuvieron después de la vacunación generalizada con vacunas conjugadas. En el Reino Unido se observó que, después de la introducción de la vacuna en el calendario de vacunación rutinaria en la población infantil, se produjo una reducción equivalente a 16 veces en la proporción de casos anuales de la enfermedad invasiva por Hib en niños de menos de 5 años de edad (99).

En esta tesis encontramos que 9 de las 24 cepas capsuladas de la CAM no eran Hib sino Hif (6 cepas) y Hie (3 cepas). En USA, tras la disminución de casos por Hib, se han publicado algunos estudios en los que se advierte del posible incremento de casos por otros serotipos como el e y sobre todo el f (19,44). Así, la proporción de casos de enfermedad invasiva por Hif aumentó desde el 1% en 1989 hasta el 17% en 1994 en USA (19). Otro estudio español mostró una incidencia por Hif del 3% (64). En comparación, en esta tesis observamos que la proporción de Hif fue del 6,6%. Nuestra experiencia sugiere que las infecciones causadas por los serotipos e y f en España no han aumentado después de las campañas de vacunación contra Hib (ver discusión del tercer objetivo más adelante).

Otro patógeno susceptible de incrementar su frecuencia tras la vacunación contra Hib sería *H. influenzae* no capsulado. La proporción de *H. influenzae* no capsulados en el Reino Unido aumentó desde el 10% en la era pre-vacunal (1990-1991) hasta el 60% in la post-vacunal (1995-1996) (99). En otro estudio realizado en Cataluña, 77 de las 154 cepas invasivas (72,7%) aisladas después de la vacunación, fueron no capsuladas (64). En esta tesis, las cepas invasivas no capsuladas fueron también las más frecuentes en la CAM con una proporción del 73,6%. Sin embargo todo apunta a que el aumento de su proporción relativa es consecuencia de la disminución de Hib, no del aumento real del número de casos invasivos por *H. influenzae* no capsulado.

En esta tesis, cerca de una por cada cuatro cepas de *H. influenzae* de la CAM fue resistente a ampicilina debido a la producción de  $\beta$ -lactamasa. Esta proporción es similar a la encontrada por el grupo español para la vigilancia de los patógenos respiratorios en 1.730 cepas de origen respiratorio aisladas en España en el periodo 1998-1999 (100). En un estudio cooperativo europeo (*The Alexander Project*) las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa constituyeron cerca del 12% en el periodo 1997-1998, aunque con marcadas variaciones geográficas (101).

Hemos observado que, entre las cepas de la CAM, las capsuladas fueron significativamente más resistentes a la ampicilina, tetraciclina y cloramfenicol que las cepas no capsuladas. De este modo, las cepas más resistentes serían también las más virulentas. Esto podría explicar por qué la resistencia a ampicilina fue más frecuente en los niños y en los aislamientos de sangre y LCR ya que en ellos la proporción de cepas capsuladas era mayor. En un estudio español anterior, se observó la producción de  $\beta$ -lactamasa en el 50% de las cepas invasivas de Hib (61), una proporción similar al 45,8% encontrada en las cepas capsuladas de nuestro estudio en la CAM, aunque sólo el 62,5% de las mismas fueron b, siendo el resto de los serotipos e y f.

Observamos una frecuencia elevada de la resistencia a ampicilina, tetraciclina, cloramfenicol y cotrimoxazol en cepas invasivas de *Haemophilus influenzae* en un contexto general de descenso del consumo de antibióticos en la misma comunidad de procedencia de las cepas. Así, desde 1996 a 2000, el consumo de tetraciclina y cotrimoxazol disminuyó desde 0,70 a 0,58 y desde 0,71 a 0,43 DDD/1000 habitantes/día, respectivamente; el consumo de cloramfenicol fue indetectable en los últimos años (tabla 13 y figura 14). En otro estudio (79), la disminución del consumo general de tetraciclinas y cotrimoxazol en España entre 1985 y 2000 fue del 75% y del 88%, respectivamente.

Ello sugiere que la proporción de cepas resistentes a los antibióticos puede incrementarse rápidamente en una población determinada mientras que su descenso es mucho más lento cuando se reduce el consumo de antibióticos (102). Además, en áreas con elevadas tasas de resistencias, la reducción de la presión de antibióticos podría tener incluso un efecto todavía más lento (102), especialmente en presencia de resistencia simultánea a múltiples antibióticos (103,104). Existen varias explicaciones para este fenómeno: la posibilidad de resistencia a diferentes clases de antibióticos y la co-selección de las mismas cuando se utiliza uno de ellos (102,105) y la reserva de mecanismos genéticos de resistencia en especies de la flora comensal y el intercambio de éstos con las especies patógenas (106,107)

La adquisición de plásmidos conjugativos de alto peso molecular en Hib constituye el principal mecanismo de resistencia a ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina en este patógeno (3,108). Nuestros resultados confirman la fuerte asociación existente entre la resistencia individual y múltiple a estos antibióticos y la presencia de plásmidos conjugativos de elevado peso molecular (tabla 12 y figura 12). Sin embargo, la resistencia a trimetoprima y claritromicina en *H. influenzae* están relacionados con mecanismos cromosómicos de resistencia y no con la presencia de plásmidos (3). En este estudio, en ninguna de las 25 cepas de la CAM con sensibilidad disminuida a claritromicina y en las 21 cepas no sensibles a

trimetoprima, como marcadores únicos de resistencia, se detectó la presencia de plásmidos. Además, en este estudio, el hallazgo de plásmidos conjugativos de elevado peso molecular detectados por PCR fue común tanto en cepas resistentes de *H. influenzae* capsuladas como no capsuladas.

En resumen, en este objetivo de la tesis llevamos a cabo un estudio comunitario para estimar el significado clínico y epidemiológico de *Haemophilus influenzae* procedente de muestras estériles, después de la vacunación masiva en niños con la vacuna conjugada contra Hib en la CAM. Para ello recogimos datos acerca del diagnóstico clínico y las características microbiológicas de las cepas, incluyendo su epidemiología molecular, la resistencia a diversos antibióticos y la tendencia general del consumo de antibióticos en la misma comunidad.

### 5.2 ESTUDIAR LAS CARACTERÍSTICAS DE HIB CAUSANTE DE FALLOS VACUNALES TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA CONJUGADA POR HIB EN 2 COLECCIONES DE CEPAS: ESPAÑOLA (CNM) Y DE REINO UNIDO (PHLS).

#### **España**

En la era pos-vacunal de Hib, el desarrollo de estrategias para el conocimiento del serotipo de *H. influenzae* en los casos de enfermedad invasiva es fundamental en salud pública para vigilar el proceso de eliminación de Hib, para determinar el posible incremento de otros tipos capsulados o de cepas no capsuladas y para supervisar la aparición de casos de fallos vacunales verdaderos (9,23). Las campañas de vacunación extensivas con vacunas conjugadas frente a Hib fueron introducidas en USA en 1990 y en Reino Unido y Holanda en 1992 obteniendo como resultado la casi eliminación de la enfermedad invasiva por Hib. No obstante la enfermedad invasiva por Hib en los países en vías de desarrollo sigue constituyendo un

grave problema de salud debido a la limitación de sus recursos para adquirir la vacuna conjugada (10).

En los últimos años se ha informado del resurgir de casos de enfermedad invasiva por Hib en niños bien vacunados en USA (Alaska), Holanda y Reino Unido (9,26,30,109). En el Reino Unido las tasas de incidencia de enfermedad invasiva por Hib por 100.000 niños menores de 5 años, se han incrementado desde 0,63 en 1998 a 1,8 en 2000, sobre todo en niños correctamente vacunados según el programa oficial de vacunación en este país (24).

En España los programas de vacunación con vacunas conjugadas frente a enfermedad invasiva por Hib se introdujeron más tarde que en otros países occidentales. Por ese motivo, España, por encontrarse en una fase preliminar al resto, podría tener frecuencias de enfermedad inferiores (42,43).

El serotipificado mediante aglutinación con antisueros específicos policlonales, es la técnica de uso más extendido para el tipado capsular de cepas invasivas de *H. influenzae* en laboratorios clínicos; no obstante este método puede producir resultados falsos negativos y positivos (9), con evidentes repercusiones epidemiológicas. Por ello fueron desarrolladas técnicas de amplificación mediante PCR basadas en la estructura genética de la cápsula (68). En esta tesis se utilizó el método de genotipificación capsular de Falla et al. para detectar y clasificar correctamente las cepas de enfermedad invasiva sospechosas de producir fallos vacunales verdaderos (68). El estudio se completó mediante la aplicación de dos técnicas de epidemiología molecular adicionales, PFGE y análisis de la estructura del gen *cap b*.

Sólo uno de los cinco pacientes previamente vacunados y con enfermedad invasiva por Hib desarrolló una respuesta inmune suficientemente protectora con anticuerpos anti-RPR. Esta falta de respuesta inmune sugiere que los fallos vacunales se deben esencialmente a la incapacidad del huésped para desarrollar una respuesta inmune protectora tras la administración de la vacuna, como ya indicaban otros estudios (24,110). En nuestros pacientes

con fallo vacunal, no encontramos asociaciones geográficas o temporales entre ellos, ni tampoco entre los tipos de vacuna ni lotes administrados en cada caso.

Excepto en un caso de fallo vacunal (paciente portador de VIH aunque no había desarrollado SIDA), no se encontraron factores predisponentes en los 4 casos de niños con enfermedad invasiva por Hib al igual que no los habían encontrado otros autores (22,29). La efectividad de la vacuna conjugada de Hib puede estar reducida en niños con alta prevalencia de infección por VIH, según Madhi et al (111) cuyos tres casos de niños infectados por VIH que desarrollaron enfermedad invasiva por Hib, no tenían títulos suficientes de anticuerpos protectores (1,0 µg/ml o superiores). El paciente infectado por VIH y por Hib invasivo estudiado por nosotros, sí que desarrolló niveles protectores de anticuerpos, aunque no se pueden excluir otros factores inmunológicos desconocidos en el momento de registrar este dato.

La definición de fallo vacunal que hemos utilizado es la propuesta por el Grupo de Vacunas de la Universidad de Oxford (Drs. R. Moxon y P. Heath) que toma en consideración el paso de un lapso de tiempo suficiente entre la vacunación y la enfermedad invasiva por Hib (22); otros casos de enfermedad invasiva por Hib en niños parcialmente vacunados o vacunados muy recientemente no cumplirían la definición para considerarse fallos vacunales verdaderos y por ello no han sido incluidos en el estudio.

Previamente se había demostrado escasa diversidad genética en la estructura genética que codifica la producción de cápsula de Hib (*cap b*) mediante técnicas de genotipificado u otras técnicas epidemiológicas (112,113). Van Alphen et al. (114) analizaron 16 supuestos casos de fallos vacunales, de ellos 7 estaban correctamente vacunados (fallos vacunales verdaderos) mediante métodos fenotípicos. Todas las cepas pertenecían a una clona pre-vacunal común de Hib. Además, cuando los estudiaron fenotípicamente mediante genotipificado capsular, tampoco encontraron diferencias en la distribución de los genotipos de *cap b* (68).

La re-emergencia de la tos ferina se ha asociado a un notable cambio en la estructura de la población de *B. pertussis* atribuida a una adaptación a la vacuna (115). Siguiendo esta línea de pensamiento, en esta tesis formulamos la hipótesis de trabajo de que un hecho similar podría ocurrir en el caso de la vacuna conjugada de Hib, seguramente menos probable en España porque en este país aún es reciente la vacunación extendida con vacunas conjugadas frente Hib. Los experimentos posteriores de análisis de la estructura poblacional de Hib causantes de fallos vacunales en comparación con los controles apropiados, fueron diseñados con el fin de someter a prueba la hipótesis señalada.

En la corta casuística de los pacientes con fallo vacunal estudiados en España en esta tesis, el único caso sugestivo que apoyaría la hipótesis fue el del paciente con nº de cepa 2999 que presentaba niveles protectores de anticuerpos anti-RPR de 2,29 µg/ml y que por PFGE mostraba una distancia genética de 0,62 respecto de la clona mayoritaria. Cuando el estudio se realizó mediante el análisis de la cápsula *cap b*, la distancia genética obtenida fue de 0,75, también superior al del resto de cepas Hib. Esta aparente divergencia genética de la cepa Hib 2999 contrastaba con resultados de otros estudios previos realizados con 71 cepas invasivas de Hib españolas recogidas en los años 80, ya que todas pertenecían al mismo patrón de proteínas de membrana externa y al mismo patrón de RFLP, con 3 tipos electroforéticos (ETs), uno de ellos (ET 12,5) con 69 aislamientos (97,2%) (113).

### **Reino Unido**

Ante el preocupante incremento de casos de fallos vacunales de Hib en Reino Unido, propusimos un estudio en colaboración con autores ingleses (Dras. Mary Slack y Mary Ramsay) a realizar en nuestro laboratorio y con el fin de documentar mejor la hipótesis de trabajo arriba mencionada. Para ello se realizó un muestreo de cepas invasivas de Hib en este país, representativo de las cepas circulantes tanto en la era pre- como pos-vacunal. El hecho

de que Hib es altamente clonal según la mayoría de estudios poblacionales limita las posibilidades técnicas de demostrar diversidad genética entre las cepas.

Uno de los hallazgos centrales de esta tesis en el apartado que nos ocupa es que, al contrario que en el caso de la tos ferina antes mencionado, el incremento del número de casos de enfermedad invasiva por Hib en Reino Unido no se debe a la emergencia de un nuevo genotipo “resistente” a la vacuna conjugada sino que los mismos genotipos circulantes de la era pre-vacunal, son la causa de los fallos vacunales. Aunque encontramos un “cluster”, el tipo IV, específico de los fallos vacunales verdaderos de Hib (tabla15), ello se debe interpretar con precaución, ya que este “cluster” sólo tiene 4 cepas (1,1%) altamente relacionadas, pero no idénticas y aisladas en diferentes zonas geográficas del Reino Unido, lo cual sugiere que esta asociación es poco consistente y puede haber ocurrido por casualidad. El “cluster” tipo I obtenido con el programa Fingerprinting II, contiene la gran mayoría de las cepas de Hib estudiadas, tanto de casos de fallo vacunal verdadero como de controles; el tipo II, con sólo 16 aislamientos, está genéticamente muy próximo al tipo I, de hecho el análisis Manova no era capaz de diferenciar de forma estadísticamente significativa ambos grupos.

En definitiva, los datos experimentales nos llevan a rechazar la hipótesis propuesta.

Aunque las causas de los fallos vacunales parecen distintas en Reino Unido y Holanda, un estudio reciente respecto a la diversidad genética de cepas invasivas de Hib en Holanda, usando dos técnicas de epidemiología molecular (MLST y MLVA, *multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*), ha obtenido algunos resultados similares a los nuestros (116). Los autores informaban del aumento en la diversidad genética de Hib en Holanda después de la introducción de la vacuna conjugada en ese país. En el estudio de las cepas de Reino Unido hemos encontrado también un incremento de la diversidad genética, sobre todo en el último periodo analizado tras la vacunación, 2000-2003 (figura 19). Pero en el caso del reino Unido, parece deberse al incremento en la diversidad genética de los aislamientos pertenecientes a



adultos y no a los de niños con fallo vacunal verdadero de Hib, por lo que este hallazgo es probablemente independiente de los fallos vacunales por Hib.

Así pues, los datos aportados sugieren que después de la presión selectiva ejercida por la vacunación extensiva en el Reino Unido desde 1992, no se ha modificado sustancialmente la estructura poblacional de Hib en ese país.

El poder discriminativo de la técnica de PFGE en esta parte del trabajo de tesis, fue elevado, 78% en Hib productores de fallo vacunal verdadero y 81% en los controles, según el índice de discriminación de Simpson. Es incluso más alto que el informado en otros trabajos respecto a otras técnicas de epidemiología molecular: MLVA (75,9%) y MLST (41,4%) (116). PFGE tiene limitaciones potenciales conocidas como, por ejemplo, que bandas del mismo tamaño pueden o no corresponder al mismo fragmento de ADN y un cambio en una posición de corte de la enzima de restricción, puede originar cambios en más de una banda. Considerando estas y otras limitaciones, se ha propuesto el método de MLST para el análisis genotípico de numerosas especies bacterianas incluyendo *H. influenzae* (83), aunque ambas técnicas (PFGE y MLST) no se han comparado directamente en el caso de Hib, nuestra experiencia en el estudio de 77 cepas de Hie y Hif mediante ambas técnicas (ver resultados y discusión en el objetivo 3), mostraba que la distribución poblacional de ambos patógenos es altamente clonal y prácticamente idéntica por ambas técnicas.

Según los datos presentados en esta tesis, la explicación del reciente aumento de las infecciones invasivas en Reino Unido por Hib no se debe a un cambio en la estructura poblacional de las cepas causales (117), por lo que deben buscarse otros motivos. Según Trotter et al. (26), el uso de la combinación de la vacuna de Hib con el componente acelular de *B. pertussis* (DTaP-Hib) ha sido el principal factor que ha contribuido a ese incremento de casos de Hib invasivo observado en el Reino Unido de 1998 a 2003, teoría compartida por otros autores (13). Las vacunas conjugadas reducirían su inmunogenicidad al combinarse con

DTaP en comparación con DTwP (33); este efecto es, además, dosis-dependiente (118) y más intenso cuando se adoptan programas de vacunación del tipo seguido por Reino Unido que no incluía dosis de recuerdo en el 2º año de vida (119).

El Departamento de Salud Pública de Reino Unido, en respuesta al rápido incremento de enfermedad invasiva por Hib en 2003 acentuada por las combinaciones con DTaP-Hib, desarrolló una campaña de “catch-up” administrando una dosis de recuerdo a todos los niños entre 6 meses y 4 años (120). Esta campaña ha resultado un éxito y el número de casos de fallo vacunal en ese rango de edad ha descendido hasta casi desaparecer.

### 5.3 CONOCER LA INCIDENCIA Y LA IMPORTANCIA CLÍNICA DE OTROS SEROTIPOS CAPSULADOS DE *H. influenzae* DISTINTOS DEL SEROTIPO B EN LA POBLACIÓN GENERAL TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA CONJUGADA DE HIB EN ESPAÑA.

La información disponible en la literatura acerca de las infecciones debidas a *H. influenzae* serotipos e y f se resume en la descripción de algunos casos clínicos esporádicos de meningitis, neumonía, artritis séptica y bacteriemia (19, 44, 46-59,121). Recientemente se han descrito en Italia cinco casos de enfermedad invasiva por *H. influenzae* serotipo e en adultos, todos ellos eran sensibles a ampicilina, cloramfenicol, tetraciclina y cotrimoxazol (60).

La administración generalizada de la vacuna de Hib, a partir de los años 90, ha modificado la epidemiología de Hib y de *H. influenzae* en su conjunto. Como se ha mencionado en el apartado 5.1 de la discusión, diversos autores han sugerido que el descenso en la tasa de infecciones debidas a Hib podría generar el aumento de infecciones debidas a otros serotipos como parece ser el caso en neumococo. En concreto, en Estados Unidos se observó un aumento en la incidencia de los serotipos e y f, sobre todo éste último (19,44). La frecuencia de enfermedad invasiva debida a Hif aumentó de 0,5 casos por 1.000.000 de habitantes en

1989 (1%) a 1,9 casos por 1.000.000 en 1994 (17%) (44). Un aumento tan aparente no se ha descrito para el serotipo e (19,44).

En este apartado de la tesis se muestra que, según la casuística recogida en España, la epidemiología y la presentación clínica de las infecciones debidas a Hie y Hif son distintas a las de las infecciones invasivas clásicas producidas por Hib. Para el serotipo e, sólo un pequeño porcentaje de casos del 19,2% se producía en niños menores de cinco años, la mayoría de los casos procedían de pacientes adultos que habitualmente presentaban alguna patología de base (tabla 16). Algo similar ocurrió para el serotipo f ya que sólo un pequeño porcentaje de casos de infección por este serotipo del 14,3% ocurrió en niños menores de cinco años, la mayoría de los casos se produjo en pacientes adultos que habitualmente presentaban alguna patología de base (tabla 17).

Así pues los datos aquí presentados no sustentan la hipótesis de que Hie y Hif sustituyan al serotipo b tras la vacunación. Hie y Hif ya que se trataría más bien de patógenos oportunistas que causan infecciones en pacientes con patologías de base graves, como enfermedades respiratorias o hepáticas, o pacientes inmunodeprimidos, a diferencia de Hib que causa infecciones invasivas primarias en niños pequeños (9). De todas maneras, y de forma ocasional, tanto el serotipo e como el f pueden causar infecciones primarias graves como meningitis en niños (3 de 4 casos, Tabla 16) y cuyo cuadro clínico es muy similar al causado por Hib. En el caso del serotipo f, las infecciones del tracto respiratorio son la forma clínica más frecuentemente encontrada en esta tesis; la meningitis se diagnosticó principalmente en adultos, 75%, y en pacientes con factores predisponentes, 62,5% (tabla 17).

En este tesis no hemos amplificado por PCR la delección en IS1016-*bexA*, asociada a la virulencia de Hib, en ninguna de las cepas de Hie y Hif, al contrario de lo ocurrido en el serotipo a (77).

Tal y como se describía en estudios previos (61,97,100,122), los datos de sensibilidad antimicrobiana muestran una alta prevalencia de la resistencia a ampicilina en la colección estudiada (61,5% para Hie y 75,5% para Hif). Esta tasa es mas de dos veces mayor que la que se halló en uno de los últimos trabajos de Grupo Español de seguimiento de Patógenos Respiratorios, en el que se incluyeron un total de 1,730 aislamientos de *H. influenzae* españoles recopilados en el período 1998-1999 (100). En un estudio previo, se detectó la producción de  $\beta$ -lactamasa en un 50% de los aislamientos de Hib en España (61). En el presente trabajo, veintiuno de los veintiséis aislamientos de Hie estudiados, eran resistentes a cotrimoxazol, lo que muestra una prevalencia de esta resistencia entre las más elevadas descritas en las cepas capsuladas (123). Es importante recordar que el consumo de antibióticos en España se encuentra entre los mas altos de los países europeos, aunque con un descenso muy marcado del consumo de cotrimoxazol (62).

La adquisición de plásmidos conjugativos de gran tamaño en Hib es la base genética de la resistencia combinada en estas cepas a ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina (3,108). En el presente trabajo se detectó la presencia de este tipo de plásmidos en 8 de los aislamientos de Hie y 7 de los aislamientos de Hif resistentes a antibióticos, de los cuales 3 Hie y 6 Hif presentaban un perfil de resistencia cruzada a ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina. Estos serotipos parecen pues compartir la presencia de plásmidos conjugativos con Hib en el que inicialmente se describieron.

En lo que se refiere a la epidemiología molecular de Hie, se observa la amplia diseminación en España de una clona muy dominante tanto por PFGE como por MLST. Ésta incluye el 92,3% de los aislamientos y es capaz de producir tanto enfermedad invasiva como no invasiva, aislamientos sensibles y resistentes a antimicrobianos y aislamientos precedentes de adultos y de niños. En un estudio reciente en el que se caracteriza la epidemiología

molecular de diez aislamientos de *H. influenzae* serotipo e, también se encuentran con una escasa diversidad genética (124).

También la epidemiología molecular de Hif, tanto por PFGE como por MLST, en España y en el período de tiempo estudiado, se observa la diseminación en todo el país de una clona muy dominante. Ésta incluye casi el 92% de los aislamientos españoles asociados tanto a enfermedad invasiva como no invasiva, aislamientos sensibles y resistentes a antimicrobianos y aislamientos precedentes de adultos y también de niños.

En cuanto a lo que se refiere a la epidemiología molecular de Hie y Hif estudiada mediante MLST, se describen en esta tesis por vez primera, 4 alelos del serotipo f, uno de ellos el mayoritario, y 2 del serotipo e.

Aunque tanto PFGE como MLST muestran una estructura poblacional muy similar, con cepas genéticamente muy relacionadas y, por tanto, con una fuerte estructura clonal, se observaron variaciones pequeñas entre ellas. Así, cuatro cepas de Hie y 2 de Hif que, mediante PFGE eran genéticamente similares, tenían diferentes perfiles alélicos con MLST y otras 4 de Hif, que se mostraban diferentes mediante PFGE, tenían el mismo perfil alélico con MLST. No obstante esas diferencias parecen de importancia menor, ya que las cepas diferentes de la clona común de Hie e Hif, lo eran por ambas técnicas.

En resumen, en este objetivo de la tesis se han estudiado 26 cepas de Hie y 49 de Hif, todas las recibidas en LNRH, durante 4 años y medio mediante vigilancia activa. La mayoría de ellas pertenecen a adultos con algún factor predisponente grave. Las poblaciones bacterianas españolas de cepas Hie y Hif presentan variaciones genéticas muy limitadas.

### 5.4 CONOCER LOS GENES MÁS FRECUENTES, RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A COTRIMOXAZOL, AMPICILINA, CLORAMFENICOL Y TETRACICLINA.

En el estudio de los principales genes de resistencia antibiótica, objeto de estudio en este apartado, la colección de cepas estudiada, representativa del gran grupo total de cepas de *H. influenzae*, muestra que el “pool” de genes plasmídicos circulantes en cepas de *H. influenzae* españolas está muy conservado e incluye los genes *tem1*, *tetB*, *catII* y *sul2*, tanto en cepas capsuladas de diferentes serotipos como en no capsuladas, comunes también en otras especies.

Por el contrario, los mecanismos de resistencia a trimetoprima obtenidos en esta tesis, demuestran una indudable originalidad y especificidad de *H. influenzae* en comparación con otros gram negativos. En un estudio previo con un número limitado de cepas, se sugería que Fola, la enzima dihidrofolato reductasa, es la diana primaria para la adquisición de resistencia a trimetoprima en *H. influenzae*, tanto para la hiperproducción de la enzima constitutiva como para la producción de una enzima modificada (84).

Fola es una enzima común en la naturaleza imprescindible para el metabolismo del ácido fólico y de secuencia bastante conservada (125-7). Se han descrito cambios en la secuencia en bacterias gram positivas tales como *S. aureus* (128) y *S. pneumoniae* (129) relacionados siempre con la resistencia en el tratamiento antibiótico con trimetoprima. Estos cambios de aminoácidos no han sido en ningún caso tan numerosos como los encontrados para *H. influenzae* en esta tesis y en ningún caso afectaban al promotor de *folA* (84, 125-6). Un único cambio de aminoácido originó cepas resistentes en *S. aureus* (128) y *S. pneumoniae* (129). En bacterias gram negativas como *Pasteurella multocida* (126-7,130), *E. coli* (126-7,131-2) u otros microorganismos gram negativos (126-7,133), la resistencia a trimetoprima se ha informado como transmisible (126-7,130-133), mediante integrones, plásmidos o “cassettes” de genes cuya nomenclatura los denomina *dfrA1* hasta 22, que parece ser el último descrito hasta

---

el momento (133). Son variables en su contenido, disposición y combinación con otros genes de resistencia a otros antibióticos tales como aminoglucósidos, sulfonamidas, estreptomicina o quinolonas (133).

El hecho de que la resistencia a trimetoprima en *H. influenzae* sea cromosómica y se aprecien tantos cambios en la proteína Fola (84, 126-7), siendo también una bacteria gram negativa, es pues inusual.

Cambios en la secuencia de Fola también se han informado en parásitos como *Plasmodium vivax* aunque en relación con la resistencia a pimimetamina, con sustituciones en tres aminoácidos (134) y en líneas celulares como HT para la valoración de los cambios mutagénicos capaces de producir el antineoplásico metotrexato (135), ambos fármacos relacionados directamente con la enzima y la inhibición del metabolismo del ácido fólico.

Estos cambios de aminoácidos en Fola pueden originar la modificación de aminoácidos hidrofóbicos, polares o neutros en la secuencia que originan cambios conformacionales importantes para el funcionamiento enzimático (136), por lo que el estudio a nivel de secuencia de la proteína es fundamental.

En el presente estudio se muestran los cambios de aminoácidos en Fola de una amplia colección de 58 cepas de *H. influenzae* capsulado y no capsulado con distintos niveles de sensibilidad a trimetoprima. Las posiciones en que se encuentran modificaciones son: Asn 13, Met 21, Gln 66, Leu 67, Glu 71, Ile 74, Phe 79, Ser 81, Asn 84, Ile 95, Lys 107, Leu 113, Thr 118, Glu 132, Glu 135, Lys 143. Siempre se produjo el mismo tipo de sustitución de aminoácidos; por ejemplo en la posición 13, la sustitución fue siempre de Asn a Ser; en la posición 66, Glu a His... es decir, que siempre el cambio en la secuencia, aunque fuera distinto, originó la misma sustitución de aminoácido para cada posición (Tabla 24). Estos cambios habían sido descritos previamente en la literatura pero sin relacionarlos claramente con la resistencia, aunque en colecciones menos numerosas de cepas (84).

Observamos que algunas sustituciones parecían asociarse a la resistencia a trimetoprima y otras no. Concretamente, Leu67 a Pro, Ile74 a Val, Phe79 a Leu, Asn84 a Asp e Ile95 a Leu no parecían relacionarse con la resistencia al aparecer tanto en cepas resistentes como en sensibles. Por el contrario, la sustitución Met 21 a Ile parece relacionarse con la resistencia de alto nivel, como se explica en los resultados. El resto de mutaciones, como son Lys107 a Gln presente en 21 de 37 cepas resistentes (56,7%); Asn13 a Ser que aparece en 32 de 37 cepas resistentes (86,5%); Thr118 a Ala (40,5%), Glu135 a Lys (29,7%), Glu132 a Asp (24,3%), Leu113 a Phe (21,6%), Ser81 a Arg y Lys143 a Glu (16,2%), Glu71 a Asp (10,8%) y Gln66 a His (8%), estuvieron asociadas con cepas resistentes en todos los casos ( $p < 0,0001$ ).

Las figuras 29 y 30 junto a la tabla 24, resumen estas consideraciones.

Las cepas clasificadas en función del número de sustituciones de aminoácidos se separan claramente en dos grupos, uno con pocos cambios de aminoácidos formado por cepas sensibles fundamentalmente, y otro por cepas con muchos cambios formado en su totalidad por cepas resistentes. La figura 31 ilustra esta conclusión.

La mutación “in vitro” mediante presión selectiva con trimetoprima se realizó con dos cepas de referencia sensibles a trimetoprima con el fin de observar si reproducían los modelos de resistencia encontrados en las cepas salvajes. El análisis de los mutantes obtenidos mostró que, tanto en los obtenidos de la cepa MAP, como los obtenidos de la cepa Rd, reprodujeron “in vitro” las mutaciones observadas en cepas salvajes. De un sólo paso adquirieron niveles de 512 y 256  $\mu\text{g/ml}$  de CMI respectivamente, reproduciendo patrones de mutaciones que ya se habían encontrado en las cepas salvajes. No se reprodujeron “in vitro” los altos niveles de resistencia de  $>1028 \mu\text{g/ml}$  ni la mutación Met 21, responsable, al parecer, de la misma; tal vez se necesita un segundo paso para lograrlo. La tabla 28 y la figura 36 muestran estos hallazgos.



La diversidad bacteriana, la evolución y la filogenia pueden ser estudiadas a distintos niveles, entre especies diferentes o entre aislamientos pertenecientes a una misma especie, mediante técnicas basadas en el análisis de las secuencias nucleotídicas de diferentes tipos de genes. La información aportada por genes codificantes y no codificantes de proteínas (rRNA), es distinta, ya que los primeros tienen que asegurar la funcionalidad de la proteína que se codifica.

Los genes analizados en este objetivo, al igual que las proteínas a las que dan lugar, son genes altamente conservados (constitutivos) y codificantes de proteínas implicadas en la supervivencia, adaptación y fisiología celular (137, 138). Según el análisis de las secuencias en el gen *folA* y su promotor, el número de polimorfismos acumulados por cepa para *folA* era mucho menor en las cepas sensibles (rango 0-7) que en las resistentes (rango 1-34) como muestra la figura 32. En las Figuras 33 y 34 se representa la misma distribución pero en función del número total de sSNPs, que fueron de 0 a 3 en las cepas sensibles y de 0 a 24 en las resistentes. El número de alelos distintos para *folA* fue de 47 de 58 cepas, con 60 posiciones polimórficas, mientras para los sSNPs, el número de alelos fue de 40, con 41 posiciones polimórficas. El grado de similitud genética entre los distintos alelos de cada gen, así como su frecuencia de aparición, se muestran en la tabla 27 y la figura 34. Estos datos parecen sugerir que las cepas resistentes a trimetoprima presentan una mayor variabilidad genética no sólo en las posiciones que se traducen a cambios asociados a la resistencia, sino en otras posiciones de nucleótidos que no se traducen (sSNPs) y poseerían por tanto una mayor heterogeneidad genética.

La secuencia del promotor de *folA*, no presentó cambios en ninguna de las cepas sensibles ni en los controles y sí presentó cambios en todas y cada una de las cepas resistentes. Ello sugiere que parece fundamental su íntegra conservación para mantener la sensibilidad de las cepas. Los cambios encontrados en el promotor fueron 4, y consistieron en mutaciones

puntuales siempre en las mismas posiciones y de la misma base por la misma base, como se describe en los resultados, y algunas además mutuamente excluyentes (tabla 27).

Por último mencionar que la sustitución de bases T-3C del promotor, se produjo en 17 de las 37 cepas resistentes (40,8%), en todos los casos conjuntamente con la A-48C y en ninguna ocasión con G-19T y T-40C, por lo que parecen relacionadas. Estos datos también se muestran en la tabla 27.

En la representación gráfica de las relaciones genéticas entre los alelos encontrados, se observan una clara división entre las cepas sensibles y las resistentes a trimetoprima, todas las cepas sensibles se agruparon en un gran “cluster” por encima de la línea horizontal dibujada y todas las resistentes en otro gran “cluster” por debajo excepto una, que no tenía mutaciones silentes.

Al igual que en los dendogramas construidos con las secuencias proteicas, aquí también se observa que la representación gráfica es independiente de que las cepas sean cápsuladas o no, lo cual sugiere que las mutaciones asociadas a la resistencia ocurren por igual en las cepas capsuladas y no capsuladas.

La presencia de distintos SNPs, la diferente combinación de los mismos y su mayor o menor acumulación en las cepas estudiadas, hace del análisis de la divergencia de los nucleótidos de estos genes una opción más para en el estudio de una población de este organismo con fines de tipificación, de evolución y/o de filogenia. Los SNPs podrían actuar como “un marcador” filogenético, lo cual sugiere que podría ser interesante la inclusión de estos genes en estudios de MLST (*multilocus sequence typing*) aplicados a *H. influenzae*, debido a su variabilidad génica (83).

Nuevamente el análisis de los sSNPs obtenidos “in vitro” sugiere que en *H. influenzae*, tanto en los obtenidos de la cepa MAP, como los obtenidos de la cepa Rd, reprodujeron “in vitro” lo observado en las cepas salvajes. La tabla 29 y la figura 37 muestran estos hallazgos.

En lo que se refiere a los antibióticos sulfametoxazol, ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina,, independientemente de que las cepas sean, capsuladas o no, de cualquier procedencia geográfica, cualquier edad del paciente, o cualquier origen clínico, los genes encontrados en la colección de estudio son siempre los mismos, son transferibles y de localización plasmídica. Para sulfametoxazol no se encontraron cambios de aminoácidos en la enzima dihidrofolato sintetasa, también imprescindible en el metabolismo del ácido fólico y diana de la sulfamida, ni en la secuencia del gen *folP*, en ninguna cepa (85). Así pues, todos los cambios encontrados para explicar la resistencia a sulfametoxazol fue la adquisición del gen plasmídico *sul2*; en el caso de la resistencia a ampicilina fue *tem*, para cloramfenicol, *cat II* y para tetraciclina, *tetB*. Además, todos estos genes estuvieron presentes en todas las cepas estudiadas resistentes a los antibióticos respectivos y en ninguna de las cepas sensibles a los mismos.

Los estudios previos acerca del “pool” de genes de resistencia circulantes en *H. influenzae* han sido parciales. Así, algunos investigan sólo genes de resistencia implicados en un número limitado de antibióticos (84,87), en otros no de forma exclusiva porque incluyen otras especies bacterianas (89,90), o bien no incluyen *H. influenzae* (88, 126-133). En esta tesis se estudian por primera vez los genes de resistencia de 5 familias de antibióticos (trimetoprima, sulfametoxazol, ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina) simultáneamente en una colección variada de 58 *H. influenzae* con resultados concluyentes: por un lado, la gran variabilidad en la secuencia del gen de *folA* cromosómico implicado en la resistencia a trimetoprima y su promotor y, por otro lado, la homogeneidad en los genes de resistencia plasmídicos de las otras 4 familias de antibióticos; *sul2* en sulfametoxazol, *tem1* para ampicilina, *cat II* para cloramfenicol y *tetB* para tetraciclina.

## **CONCLUSIONES**

### 6. CONCLUSIONES

1. La mayor incidencia de la enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* en la época posterior a la vacunación extensiva contra *Haemophilus influenzae* serotipo b en la población pediátrica, ocurre en las edades extremas de la vida; es decir, en los niños menores de 1 año y en los adultos mayores de 70 años los cuales presentan factores de riesgo predisponentes en cerca del 75% de los casos, sobre todo enfermedades respiratorias y alteraciones de la inmunidad.
2. Cerca de las tres cuartas partes de los aislamientos causantes de enfermedad invasiva son *Haemophilus influenzae* no capsulados y la cuarta parte restante son capsuladas de los serogrupos b, e y f. Las cepas presentan tasas de resistencia elevadas a antibióticos a pesar de que su uso ha disminuido notablemente en la comunidad, como es el caso del cloramfenicol, la tetraciclina y el cotrimoxazol. Las cepas capsuladas y por tanto más virulentas son significativamente más resistentes que las no capsuladas.
3. La adquisición de plásmidos conjugativos de elevado peso molecular es frecuente tanto en cepas resistentes de *Haemophilus influenzae* capsuladas como en las no capsuladas, existiendo una fuerte asociación entre la resistencia individual y múltiple a estos antibióticos y la presencia de los plásmidos.
4. En España, la mayoría de casos pediátricos de fallos vacunales de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* serotipo b son consecuencia de la incapacidad del huésped para desarrollar anticuerpos protectores y no de la aparición de nuevos genotipos del microorganismo que escapan a la acción de la vacuna.

## CONCLUSIONES

---

5. El importante y rápido incremento del número de casos de enfermedad invasiva causada por *Haemophilus influenzae* serotipo b en niños del Reino Unido vacunados con la vacuna conjugada, se debe a los mismos genotipos circulantes antes de la implementación de la vacunación generalizada en dicho país. La vacunación extensiva en el Reino Unido desde 1992 no parece haber modificado la estructura poblacional de *Haemophilus influenzae* serotipo b en dicho país de modo que las causas del aumento de casos de fallo vacunal deberían atribuirse a otros factores posiblemente relacionados con el huésped.
6. No hay evidencias de que las infecciones causadas por otros serotipos de *Haemophilus influenzae* en España, sobre todo los serotipos e y f, así como las cepas no capsuladas, hayan aumentado después de las campañas de vacunación generalizada en la población pediátrica. Además, los aislamientos de *Haemophilus influenzae* serotipos e y f en España muestran elevadas tasas de resistencia a diversos antibióticos por separado, sobre todo a ampicilina y cotrimoxazol y de resistencia múltiple.
7. *Haemophilus influenzae* serotipo e y *Haemophilus influenzae* serotipo f causan en España sobre todo infecciones oportunistas en adultos con importantes factores de riesgo predisponentes como son enfermedades respiratorias y depresión de la inmunidad, aunque ocasionalmente también producen casos de meningitis y septicemia en niños.
8. El estudio de la epidemiología molecular de *Haemophilus influenzae* serotipos e y f en España según dos técnicas diferentes de epidemiología molecular, electroforesis en campo pulsante (PFGE) y secuenciación de genes “housekeeping” (MLST),

## CONCLUSIONES

---

demuestra la diseminación en todo el país de una clona muy predominante de cada uno de los dos serotipos independientemente del origen clínico y geográfico o de la resistencia a los antibióticos de las cepas.

9. La resistencia a trimetoprima en cepas de *Haemophilus influenzae* españolas es de naturaleza cromosómica y se debe a mutaciones puntuales en la secuencia del gen de *folA* y a cambios de la proteína de la dihidrofolato reductasa, así como en el promotor de dicho gen, con independencia de su origen clínico, procedencia geográfica y producción o no de cápsula. Además las cepas de *Haemophilus influenzae* resistentes a trimetoprima presentan una proporción superior de SNPs que las cepas sensibles, sugiriendo que aquéllas son genéticamente más heterogéneas.
10. La resistencia a ampicilina, a cloramfenicol, a tetraciclina y sulfamertoxazol es de naturaleza plasmídica en cepas de *Haemophilus influenzae* españolas y se debe a los genes *temI*, *cat II*, *tetB* y *sul2*, respectivamente, en todas las cepas de la colección de cepas estudiada, independientemente de su origen clínico, procedencia geográfica y producción o no de cápsula.

## **BIBLIOGRAFÍA**





## BIBLIOGRAFÍA

---

9. Centers Diseases Control. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases The Pink Book. Course Textbook, 8th Edition 2nd Printing (January 2005) and Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children- United States 1998-2000. MMWR 2002; 51: 234-7.
10. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21<sup>st</sup> century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 302-317.
11. Barbour ML, Mayon-White RT, Coles C, Crook DW, Moxon ER. The impact of conjugate vaccines on carriage of *Haemophilus influenzae* type b. J Infect Dis 1995; 171: 93-8.
12. Campos J, Aracil B, Román F, Pérez-Vázquez M. and the Spanish collaborative group for Hib vaccine failures. Molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b isolated from clinical cases of conjugate-vaccine failures in children. J Clin Microbiol 2003; 41:3915-8.
13. McVernon J, Andrews N, Slack M P E, and Ramsay M E. Risk of vaccine failure after *Haemophilus influenzae* type b (Hib) combination vaccines with acellular pertussis. Lancet 2003; 361:1521-3.
14. Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría. Calendario vacunal de la Asociación Española de Pediatría 2003. An Pediatr 2003;58:257-62.
15. Campos J, Hernando M, Román F, Pérez-Vázquez M., Aracil, B., Oteo, J. Lázaro, E, Abajo F de. and the Group for *Haemophilus* Infections of the Autonomous Community of Madrid, Spain. Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. J Clin Microbiol 2004; 42:524-9.

## BIBLIOGRAFÍA

---

16. Beni C, Cayla JA, Jansa JM, Maldonado R, Panella H, Rajmil L, Villalbi JR. Enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* tipo b y enfermedad meningocócica: incidencia y características en Barcelona, 1994-1995. *Med Clin (Barc)*. 1999; 112:1-4.
17. Diez-Domingo J, Pereiro I, Morant A, Gimeno C, San-Martin M, Gonzalez A; Group for the Study of Invasive Diseases. Impact of non-routine vaccination on the incidence of invasive *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease: experience in the autonomous region of Valencia, Spain. *J Infect*. 2001; 42:257-60.
18. Campos J, García-Tornell S, and Gairi J M. Multiply resistant *Haemophilus influenzae* type b causing meningitis: comparative clinical and laboratory study. *J Pediatr* 1986; 108:897-902.
19. Urwin G, Krohn JA, Deaver-Robinson K, Wenger JD, Farley MM, and the *Haemophilus influenzae* Study Group. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the *H. influenzae* serotype b vaccine era. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 1069-76.
20. Campos, J., Román, F., Pérez-Vázquez, M, Aracil, B., Oteo, J., Cercenado, E. Antibiotic resistance and clinical significance of *Haemophilus influenzae* type f. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52: 961-6.
21. Campos J, Román F, Pérez-Vázquez M, Aracil, B. et al. Infections due to *Haemophilus influenzae* type e: Microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Infect Dis* 2003; 37(6):841-5.
22. Heath PT, Booy R, Griffiths H, Clutterbuck E, Azzopardi HJ, Slack MPE, Fogarty J, Moloney AC, Moxon ER. Clinical and immunological risk factors associated with

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in childhood. Clinical Infectious Diseases 2000; 31: 973-80.
23. Heath P T, Booy R, Griffiths H, Clutterbuck E, Azzopardi H, Slack, M P E, et al. Clinical and immunological risk factors associated with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine failure in childhood. Clin Infec Dis 2000;31:972-80.
  24. Heath P T, Booy R, Azzopardi H, Slack, M P E, Bowen-Morris J, Griffiths H, et al. Antibody concentration and clinical protection after Hib conjugate vaccination in the United Kingdom. JAMA 2000; 284:2334-40.
  25. Pushparajah K, Ramnarayan P, Maniyar A, Paget R, and Britto J. Continued threat of *Haemophilus influenzae* type B disease in the U.K. Lancet 2003; 361:90.
  26. Trotter C L, Ramsay M E, and Slack M P E. Rising incidence of *Haemophilus influenzae* type b disease in England and Wales indicates a need for a second catch-up vaccination campaign. Comm. Dis. Public Health 2003; 6:55-8.
  27. Garner D, and Weston V. Effectiveness of vaccination for *Haemophilus influenzae* type b. Lancet 2003; 361:395-6.
  28. Steinhoff M, and Goldblatt D. Conjugate Hib vaccines. Lancet 2003; 361:360-1.
  29. McVernon J, and Heath P. Re-inforcement of Hib immunisation required. Comm Dis Public Health 2003; 6:2.
  30. Rijkers G T, Vermeer-de Bondt P, Spanjaard L, Breukels M A, and Sanders E A M Return of *Haemophilus influenzae* type b infections. Lancet 2003; 361:1563-4.
  31. Trotter C L, McVernon J, Andrews N J, Burrage, M., and Ramsay, M E. Antibody to *Haemophilus influenzae* type b after routine and catch-up vaccination. Lancet 2003;361:1523-4.

## BIBLIOGRAFÍA

---

32. Eskola J, Ölander R, Hovi T, Litmanen L, Peltola S, Käyhty. Randomised trial of the effect of co-administration with acellular pertussis DTP vaccine on immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Lancet* 1996; 348: 1688-92.
33. Bell F, Heath P, Shackley F, MacLennan J, Shearstone N, Diggle L, Griffiths H, Moxon R, Finn A. Effect of combination with an acellular pertussis, diphtheria, tetanus vaccine on antibody response to Hib vaccine (PRP-T). *Vaccine* 1998; 16: 637-42.
34. Heath P T, and Ramsay M E *Haemophilus influenzae* type b vaccine-booster campaign. *BMJ* 2003; 326:1158-9.
35. Dagan R, Eskola J, Leclerc C, Leroy O. Reduced response to multiple vaccines sharing common protein epitopes that are administered simultaneously to infants. *Infect Immun* 1998; 66: 2093-8.
36. Decker MD. Principles of pediatric combination vaccines and practical issues related to use in clinical practice. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: S10-8.
37. Andre FE. Development and clinical application of new polyvalent combined paediatric vaccines. *Vaccine* 1999; 17: 1620-7.
38. Peltola, H, Salo, E, Saxén, H. Incidence of *Haemophilus influenzae* type b meningitis during 18 years of vaccine use: observational study using routine hospital data. *BMJ* 2004;
39. Scheifele, D, Halperin, S, Law, B, King, A, for the Canadian Pediatric Society/Health Canada Immunization Monitoring Program, Active (IMPACT). Invasive *Haemophilus influenzae* type b infections in vaccinated and unvaccinated children in Canada, 2001-2003. *CAMJ* 2005; 172:53-6.
40. Greeberg D P, and Feldman S. Vaccine interchangeability. *Clin Pediatr* 2003;42:93-99.

## BIBLIOGRAFÍA

---

41. Ramsay ME, McVernon J, Andrews NJ, Slack MP. Estimating *Haemophilus influenzae* type b vaccine effectiveness in England and Wales by use of the screening method. *J Infect Dis* 2003; 188 (15 agosto) (en prensa).
42. Aracil, B., Campos, J. Reciente incremento de los fallos vacunales por *Haemophilus influenzae* serotipo B. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21(7):383-5.
43. Campos, J. Aracil, B. ¿ Regreso de la infección por *Haemophilus influenzae* b?. *Ann Pediatr*.2003;59(5):425-8.
44. Waggoner-Fountain LA, Hendley JO, Cody EJ, Perriello VA, Donowitz LG. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1322-4.
45. LaClaire LL, Tondella MLC, Beall DS et al. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 393-6.
46. Buck LL, Douglas GW. Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type e. *J Clin Microbiol* 1976; 4: 381.
47. Marshall GS, McGowan KL. *Haemophilus influenzae* type e (biotype IV) meningitis. *Am J Dis Child* 1989; 143: 9-10.
48. Gómez-Garcés JL, Amor E, Cuberes R, Alós JI, Cogollos R, Pérez A. Bacteremia and biliary infection caused by *Haemophilus influenzae* type e in an adult. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 382-3.
49. Controni G, Rodriguez WJ, Chang MJ. Meningitis caused by *Haemophilus influenzae* type e, biotype 4. *South Med J* 1982; 75: 8.

## BIBLIOGRAFÍA

---

50. Shishido H, Matsumoto K. Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type e biotype 4. J Clin Microbiol 1979; 10: 926-7.
51. Cawthern TH, Marraro RV, McCleskey FK. Bacteremia associated with *Haemophilus influenzae* type e biotype 4. J Clin Microbiol 1978; 7: 1-2.
52. Schlossberg D, Crist AE. Meningitis and septicemia due to *Haemophilus influenzae* serotype e, biotype IV. Diagn Microbiol Infect Dis 1985; 3: 73-5.
53. Wu TC, Ferguson RP, Gabel RL. Pneumonia caused by *Haemophilus influenzae* serotype e. Am J Med Technol 1982; 48: 617-9.
54. Pincus DR, Robson JM. Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type f. J Paediatr Child Health 1998; 34: 95-6.
55. Ratka A, Erramousque J. Intramuscular ceftriaxone in the treatment of childhood meningitis due to *Haemophilus influenzae* type f. Ann Pharmacother 2001; 35: 36-40.
56. González M, del Pino A, García FJ, Calbo F, Obando I, Campos J et al. Meningitis due to *Haemophilus influenzae* type f. An Esp Pediatr 2000; 53: 369-71.
57. Greene GR. Meningitis due to *Haemophilus influenzae* other than type b: case report and review. Pediatrics 1978; 62: 1021-5.
58. Klein BL, Boxerbaum B, Aronoff SC. *Haemophilus influenzae* type f meningitis in an adolescent. Pediatr Emerg Care 1985; 1: 145-6.
59. Glatman-Freedman A, Litman N. Septic arthritis caused by an unusual type of *Haemophilus influenzae*. J Infect 1996; 32: 143-5.
60. Cerquetti M, Ciofi degli Atti ML, Cardines R et al. Invasive type e *Haemophilus influenzae* disease in Italy. Emerg Infect Dis 2003; 9: 258-61.

## BIBLIOGRAFÍA

---

61. Campos J, García-Tornell S, Sanfeliu I. Susceptibility studies of multiply resistant *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric patients and contacts. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 706-9.
62. Carss O, Mölstad S, Melander A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet* 2002; 357: 1851-3.
63. Villó Sirerol, N, Blanco González, JE, Sevilla Ramos, P, Vegas Muñoz, E, García Herrero, MA, Álvarez Coca, J, Romanyck, J. Enfermedad invasiva por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* serotipo b. Estudio retrospectivo de 12 años. *Ann Ped* 2004; 61:150-5.
64. Domínguez, A, Bou, R, Carmona, G, Latorre, C, Pineda, V, Sanchez, F, Salleras, L, and The working group on invasive disease caused by *Haemophilus influenzae*. Invasive disease caused by *Haemophilus influenzae*: the sensitivity of statutory reporting. *Ann Epidemiol* 2004; 14:31-5.
65. Latorre, C, Pineda, C, Juncosa, T, Muñoz, C, Domínguez, A, Bou, R, Fontanal, D, Sanfeliu, I, Pon, I, Margall, N, Sánchez, F, Pericas R, Lobera E, for the H. influenzae invasive disease working group. *Haemophilus influenzae* meningitis in Catalonia, Spain: epidemiology and bacteriologic characteristics. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6:279.
66. Centro Nacional de Epidemiología. Estudio de incidencia de enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* en España. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 1997.
67. Innis, MA, Myambo, KB, Gelfand, DH and Brow, MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 9436-40.



## BIBLIOGRAFÍA

---

68. Falla TJ, Crook DW, Anderson EC, et al. Characterization of capsular genes in *Haemophilus influenzae* type b vaccine recipients. *J Infect Dis* 1995; 171: 1075-6.
69. Kilian, M, Sorensen, I, and Frederiksen, W. Biochemical characteristics of 130 recent isolates from *Haemophilus influenzae* meningitis. *J Clin Microbiol.* 1979; 9: 409–12.
70. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth Informational Supplement, vol. 22, number 1. Approved Standard M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2002.
71. Lee, JJ, and Smith, HO. Sizing of the *Haemophilus influenzae* Rd genome by pulsed-field agarose gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 1988; 170:4402–5.
72. Tenover, FC, Arbeit, RD, Goering,RV, Mickelsen, PA, Murray, BA Persing, DH, Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:2233-9.
73. Hunter, PR and Gaston, MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988; 6:2465-6.
74. Millemann, Y, Lesage, MC, Chaslus-Dancla , E, Lafont, JP. Value of Plasmid Profiling, Ribotyping, and Detection of IS200 for Tracing Avian Isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:173-9.
75. Nei, M and Li, WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76:5269-73.
76. Leaves NI, Dimopoulou I, Hayes I, et al. Epidemiological studies of large plasmids in *Haemophilus*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 599-604.

## BIBLIOGRAFÍA

---

77. Leaves NI, Falla TJ, Crook DWM. The elucidation of novel capsular genotypes of *Haemophilus influenzae* type b with the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 1995; 43: 120-4.
78. Ruiz-Bremon A, Ruiz-Tovar M, Pérez-Gorricho B, Díaz de Torres P, López-Rodríguez R. Non-hospital consumption of antibiotics in Spain:1987-1997. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 395-400.
79. Lázaro E, Madurga M, de Abajo FJ. Evolución del consumo de antibióticos en España, 1985-2000. *Med Clin* 2002; 118, 561-8.
80. Kayhty H, Peltola H, Karanko V et al. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1983; 147: 1100.
81. Musser JM, Kroll JS, Granoff DM, Moxon ER, Brodeur BR, Campos J et al. Global genetic structure and molecular epidemiology of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 75-111.
82. Kroll JS, Ely S, Moxon ER. Capsular typing of *Haemophilus influenzae* with a DNA probe. *Molecular and Cellular Probes* 1991; 5: 375-9.
83. Meats, E, Feil, FJ, Stringer, S, Cody, A, Goldstein, R, Kroll, JS, Popovic T and Spratt, BG. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1623-1636.
84. Groot, R, Sluijter, M, de Bruyn, A, Campos, J, Goessens WHF, Smith, AL, and Hermans, PWM. Genetic characterization of trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob agents Chemother* 1996; 40:2131-6.

## BIBLIOGRAFÍA

---

85. Enne, VI, King, A, Livermore, DM, and Hall, LMC. Sulfonamide resistance in *Haemophilus influenzae* mediated by acquisition of *sul2* or a short insertion in chromosomal *folP*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1999; 43:1523-4.
86. Farrell, DJ, Morrissey, I, Bakker, S, Buckridge, S, and Felmingham, D. Global distribution of TEM-1 and ROB-1  $\beta$ -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2005;
87. Azemun, P, Stull, T, Roberts, M, Smith AL. Rapid detection of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981 August; 20(2): 168–170.
88. Vassort-Bruneau, C, Lesage-Descauses, MC, Martel, JL, Lafont, JP, and Chaslus-Dancla, E. CAT III chloramphenicol resistance in *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from calves. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:205-13.
89. Ng, LK, Martín, I, Alfa, M and Mulvey, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes* 2001; 15:209-15.
90. Levy, S, McMurry, L, Barbosa, T, Butdett, V, Courvalin, P, Hillen, W, Roberts, MC, Rood, JI, and Taylor, DE. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1999; 43:1523-4.
91. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995, 28; 269 (5223):496-512.
92. Blattner, F.R., Plunkett, G. III, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A.,

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Goeden,M.A., Rose,D.J., Mau,B. and Shao,Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997; 277 (5331): 1453-1474.
93. Michele Cargill, M., Altshuler, D, Ireland, J, Sklar, P, Ardlie, K, Patil, N, Lane, C R, Lim, E P, Kalyanaraman, N, Nemesh, J, Ziaugra, L, Friedland, L, Rolfe, A, Warrington, J, Lipshutz, R, Daley, J Q & Lander, E S. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics*. 1999; 22: 231 – 238.
94. Gratten M, Baker J, Shann F, Cerega G, Montgomery J, Kajoi M, Lupiwa T. Non-type b *Haemophilus influenzae* meningitis. *Lancet* 1985; 1: 1343-1344.
95. Barbour ML. Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 176-82.
96. Madore, DV. Impact of immunization on *Haemophilus influenzae* type b disease. *Infec Agent Dis* 1996; 5:8-20.
97. De Andrade, AL., Brandileone, MC., Di Fabio, RD., Oliveira, RM, Silva, SA., and Baiocchi, SS. *Haemophilus influenzae* resistance in Latin-América: systematic review of surveillance data. *Microb Drug Resist* 2001; 7:403-11.
98. Zanella RC, Casagrande ST, Bokermann S, Almeida SCG, Cristina M, Brandileone C. Characterization of *Haemophilus influenzae* isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 1999. *Microbial Drug Resistance*. 1999; 8: 67-72.
99. Slack MPE, Azzopardi HJ, Hargreaves RM, Ramsay ME. Enhanced surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England, 1990 to 1996: impact of conjugate vaccines. *Pediatrics Infectious Diseases Journal* 1998; 17: S204-S207.

## BIBLIOGRAFÍA

---

100. Marco F, García de Lomas J, García-Rey C, et al. Antimicrobial susceptibilities of 1,730 *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Spain in 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3226-8.
101. Schito GC, Debbia EA, Marchese AJ. The evolving threat of antibiotic resistance in Europe: new data from the Alexander Project. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 3-9.
102. Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LCM. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 2001; 357: 1325-8.
103. Austin DJ, Kristinsson KG, Anderson RM. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; USA 96: 1152-6.
104. Levin BR, Lipsitch M, Perrot V, et al. The population genetics of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (Suppl.1): S9-16.
105. Arason VA, Kristinsson KG, Sigurdsson JA, Stefansdottir G, Molstad S, Gudmunsson S. Do antimicrobials increase the carriage rate of penicillin resistant pneumococci in children? Cross sectional prevalence study. *BMJ* 1996; 313: 387-91.
106. Aracil B, Miñambres M, Oteo J, Gómez-Garcés JL, Alós JI. High prevalence of erythromycin-resistant and clindamycin-susceptible (M-phenotype) viridans group streptococci from pharyngeal samples: a reservoir of *mef* genes in commensal bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48, 592-4.
107. Scott KP, Melville CM, Barbosa TM, Flint HJ. Occurrence of the new tetracycline resistance gene *tet* (W) in bacteria from the human gut. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 775-7.g

## BIBLIOGRAFÍA

---

108. Levy J, Verhaegen G, De Mol P, Couturier M, Dekegel D, Butzler JP. Molecular characterization of resistance plasmids in epidemiologically unrelated strains of multiresistant *Haemophilus influenzae*. J Bacteriol 1993; 138: 584-97.
109. Lucher, LA, Reeves, M, Hennessy, T, Levine, OS, Popovic, T, Rosenstein, N and Parkinson, AJ. Reemergence, in southwestern Alaska, of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease due to strains indistinguishable from those isolated from vaccinated children. J Infect Dis 2002; 186:958-65.
110. Breukels MA, Spanjaard L, Sanders LAM, Rijkers GT. Immunological characterization of conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure in infants. Clin Infect Dis 2001; 32: 1700-5.
111. Madhi SA, Petersen K, Khoosal M, Huebner RE, Mbelle N, Mothupi R, Saloojee H, Crewe-Brown H, Klugman KP. Reduced effectiveness of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in children with a high prevalence of human immunodeficiency virus type 1 infection. Pediatr Infect Dis 2002; 21: 315-21.
112. Allan I, Loeb MR, Moxon ER. Limited genetic diversity of *Haemophilus influenzae* (type b). Microbial Pathogenesis 1987; 2: 139-45.
113. Musser JM, Kroll JS, Granoff DM, Moxon ER, Brodeur BR, Campos J et al. Global genetic structure and molecular epidemiology of encapsulated *Haemophilus influenzae*. Rev Infect Dis 1990; 12: 75-111.
114. Van Alphen L, Takala AK, Broek LG, Dankert J, Eskola J. Changes in the distribution of *Haemophilus influenzae* type b clones associated with widespread infant vaccination in Finland. J Infect Dis 1992; 166: 1340-5.

## BIBLIOGRAFÍA

---

115. Mooi FR, van Loo HM, King AJ. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: A cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis* 2001; 7 Suppl 3:526-528.
116. Schouls LM, van der Ende, A, van de Pol, I, Schot, C, Spanjaard, L, Vauterin, P, Wilderbeek, D and Witteveen, S. Increase in genetic diversity of *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) strains after introduction of Hib vaccination in The Netherlands. *J Clin Microbiol*, 2005; 43:2741-9.
117. Aracil, B., Slack, M., Pérez-Vázquez, M., Román, F, Ramsay, M. and, Campos, J. Molecular epidemiology of *Haemophilus Influenzae* type B causing vaccine failures in the United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2005; en prensa.
118. Daum RS, Zenko CE, Given GZ, Ballanco GA, Parikh H, Germino K. Magnitude of interference after diphtheria-tetanus toxoids –acellular pertussis /*Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide-tetanus vaccination is related to the number of doses administered. *J Infect Dis* 2001; 184: 1293-9.
119. Vidor E, Hoffenbach A, Fletcher MA *Haemophilus influenzae* type b vaccine: reconstitution of lyophilised PRP-T vaccine with a pertussis –containing paediatric combination vaccine, or a change in the primary series immunisation schedule may modify the serum anti-PRP antibody response. *Current Medical Research Opinion*. 2001; 17 197-209.
120. Chief Medical Officer, Chief Nursing Officer, Chief Pharmaceutical Officer. Planned Hib vaccination catch-up campaign, PL/CMO/2003/1 2-17-2003.  
<http://www.doh.gov.uk/cmo/letters/cmo0301.htm>

## BIBLIOGRAFÍA

---

121. Heath PT, Booy R, Azzopardi HJ, et al. Non-type b *Haemophilus influenzae* disease: Clinical and epidemiological characteristics in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 300-5.
122. Jones ME, Karlowsky JA, Blosser-Middleton R, Critchley IA, Thornsberry C, Sahn DF. Apparent plateau in beta-lactamase production among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catharralis* in the United States: results of the LIBRA Surveillance initiative. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 119-23.
123. Invasive Bacterial Infections Surveillance (IBIS) Group of the International Clinical Epidemiology Network. Are *Haemophilus influenzae* infections a significant problem in India? A prospective study and review. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 949-57.
124. Omikunle A, Takahashi, S, Ogilvie CL et al. Limited genetic diversity of recent invasive isolates of non-serotype b encapsulated *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1264-70.
125. Barrow, EW, Bourne, PC, and Barrow, WW. Functional cloning of *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase and confirmation of natural resistance to trimethoprim. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4643-9.
126. Sköld, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* 2001; 32:261-73.
127. Huovinen, P. Resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1608-1614.
128. Dale, GE, Broger, C, D' Arcy, C, Hartman PG, DeHoogt, R, Jolidon, S, Kompis, I, Labhardt, AM, Langen, H, Locher, H, Page, MGP, Stüber, D, Then, DL, Wipf, B, and Oefner, C. A single amino acid substitution in *Staphylococcus aureus* dihydrofolate reductase determines trimethoprim resistance. *J Mol Biol* 1997; 14:266:23-30.



## BIBLIOGRAFÍA

---

129. A conservative amino acid mutation in the chromosome-encoded dihydrofolate reductase confers trimethoprim resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1998; 178:700-6.
130. Kehrenberg, C. and Schwarz, S. *drfA20*, a novel trimethoprim resistance gene from *Pasteurella multocida*. 2005; 49:414-7.
131. Yu, HS, Lee, JC, Kang, HI, Ro, DW, Chung, JY, Jeong, YS, Tae, SH, Choi, CH, Lee, EY, Seol, SY, Lee, YC and Cho DK. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5429-33.
132. Smith,D.R., Rood,J.I., Bird,P.I., Sneddon,M.K., Calvo,J.M. and Morrison,J.F. Amplification and modification of dihydrofolate reductase in *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of fol genes from mutationally altered plasmids. J. Biol. Chem 1982; 257: 9043-9048 (1982).
133. Grape, M, Farra, A., Kronval, G and. Sundström, L. Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 185-92.
134. Pécoulas, PE, Tahar, R, Ouatas, T, Mazabraud, A and Basco, LK. Sequence variations in the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and their relationship with pyrimethamine resistance. Mol Biochem Parasitol 1998; 92:265-73.
135. Morales C, Ribas M, Aiza G, Peinado MA. Genetic determinants of methotrexate responsiveness and resistance in colon cancer cells. Oncogene 2005; 24:6842-7.

## BIBLIOGRAFÍA

---

136. Schmitzer AR, Lepine F, Pelletier JN. Combinatorial exploration of the catalytic site of a drug-resistant dihydrofolate reductase: creating alternative functional configurations. *Protein Eng Des Sel* 2004; 17:809-19.
137. Singh, KV, Reves, RR, Pickering, LK and Murray BE. Identification by DNA sequence analysis of a new plasmid-encoded trimethoprim resistance gene in fecal *Escherichia coli* isolates from children in day-care centers. *Antimicrob Agents Chemother* 1992 ; 36: 1720–1726.
138. Woese, CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987; 51: 221–271.

## **ARTÍCULOS PUBLICADOS**