

¹Fortino Solórzano-Santos, ²Ma. Guadalupe Miranda-Novales,
²Blanca Leañós-Miranda, ²Laura Alicia Ortiz-Ocampo,
³Gabriela Echaniz-Avilés, ¹Gerardo Palacios-Saucedo,
²Hector Guiscafré-Gallardo

¹Departamento de Infectología
²Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria
³Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas,
 Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud,
 Cuernavaca, Morelos

Autores 1 y 2, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI,
 Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal, México

Haemophilus influenzae, colonización nasofaríngea en niños menores de cinco años

Comunicación con: Fortino Solórzano-Santos
 Fax: (55) 5761 0258
 Correo electrónico: fortino.solorzano@imss.gob.mx;
 solorzanof@terra.com.mx

Resumen

Objetivo: determinar la frecuencia, serotipos, biotipos y susceptibilidad a ocho antimicrobianos en *Haemophilus influenzae* (Hi) aislado de la nasofaringe de niños menores de cinco años de edad.

Métodos: estudio transversal que incluyó a niños de dos meses a cinco años. Se les tomó muestra de exudado nasofaríngeo. Se realizó identificación de los aislamientos, tipificación y susceptibilidad a ocho antimicrobianos.

Resultados: se estudiaron 573 niños. Hubo 88 aislamientos de *Haemophilus influenzae*: en 7/573 (1.2 %) se aisló Hi tipo b (Hib), en 3/573 (0.5 %) Hi tipos a, c, d, f y en 78/573 (13.6 %) Hi no tipificable. En siete niños con Hib, seis habían recibido una o dos dosis de vacuna específica. El biotipo predominante fue el VIII (76.1 %). Todos los aislados fueron sensibles a los antibióticos, excepto un Hib resistente a eritromicina.

Conclusiones: el mayor porcentaje de colonización nasofaríngea fue por Hi no tipificable. La colonización por Hib se presentó en niños que no tenían esquema de vacunación completo.

Palabras clave

Haemophilus influenzae
 vacunas contra *haemophilus*

Summary

Objective: to determine frequency, serotypes, biotypes and susceptibility to eighth antibiotics in *Haemophilus influenzae* nasopharyngeal isolates in children under five year old from Mexico City.

Methods: cross-sectional survey including children two months to five years old. A nasopharyngeal sample was taken. *Haemophilus influenzae* identification, serotyping, biotyping and antimicrobial susceptibility were performed.

Results: a sample of 573 children were included. In 88/573 (15.3 %) *H. influenzae* was isolated, corresponding in 7/573 (1.2 %) to Hib, 3/573 (0.5 %) to Hi a, c, d, f and 78/573 (13.6 %) to Nontypable Hi. Among Hib carriers, 6 had been received only one or two doses of specific vaccine. Biotype VIII (76.1 %) was the predominant. All isolates were susceptible to the antibiotics, but one Hib strain was resistant to erythromycin.

Conclusions: nontypable *Haemophilus influenzae* was predominant. Colonization by Hib in children under 5 years old was low (1.2 %), occurring this in children with an incomplete vaccination schedule.

Key words

Haemophilus influenzae
haemophilus vaccines

Introducción

Haemophilus influenzae es un pequeño cocobacilo gramnegativo. Con base en su antígeno capsular se conocen seis serotipos (del a al f). Las cepas no capsuladas generalmente son no reactivas y se catalogan como no tipificables. Antes del inicio de la vacunación específica, *Haemophilus influenzae* del tipo b era una causa importante de infecciones graves; causaba alrededor de 50 % de los casos de meningitis en menores de cinco años, 14 % de las neumonías e n menores de un año, 11 % de las bacteriemias y celulitis facial, 10 % de los casos

de epiglotitis y entre 30 a 60 % de las infecciones de oído medio, con frecuencias semejantes en México.¹⁻³

Con la vacunación se ha disminuido en forma drástica la frecuencia de casos de infecciones graves por este serotipo, desafortunadamente aun en países en desarrollo donde la vacunación no ha alcanzado una adecuada cobertura, sigue ocupando un lugar preponderante como causa de infecciones en menores de cinco años.⁴ Algunos casos han sido informados en Inglaterra, a pesar del uso generalizado de la vacuna, aparentemente relacionado con el tipo de vacuna combinada que utiliza ese país.⁵

H. influenzae (Hi) puede habitar la faringe y nasofaringe de sujetos sanos. La frecuencia de portadores es variable pero se estima entre 5 y 75 %.⁶⁻⁸ En México se ha encontrado una frecuencia de colonización entre 21 y 30 %. La colonización se inicia en la etapa lactante y la proporción de portadores disminuye en forma inversamente proporcional a la edad.^{9,10}

En niños del valle de México, antes de la aplicación de la vacuna específica, la colonización nasofaríngea por *H. influenzae* tipo *b* (Hib) se reportaba entre 6.4 y 9.2 %.^{9,10} Como resultado de la introducción de la vacuna en 1995 al esquema nacional de vacunación, se ha logrado una disminución del número de niños con enfermedad invasora¹¹ y se espera que haya una disminución importante en el número de portadores nasofaríngeos de *H. influenzae* tipo *b*, sin embargo, se considera que el impacto en la colonización por *Haemophilus influenzae* no tipificables (HiNT) o diferentes al tipo *b* será mínimo a pesar de la vacunación. En el mundo se ha observado un incremento en los casos de infecciones asociadas con HiNT.^{12,13}

En este estudio se determinó la frecuencia de portadores asintomáticos de *Haemophilus influenzae*, así como los biotipos predominantes y su perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos, en una muestra representativa de niños menores de cinco años de edad residentes de la Ciudad de México. Se determinaron los principales factores asociados con la colonización.

Métodos

Estudio transversal en el cual se incluyeron niños de dos meses a cinco años de edad residentes del Distrito Federal, cuyos padres aceptaron la participación en el estudio. Para el cálculo del tamaño muestral representativo de las 16 delegaciones políticas del Distrito Federal, se consideró la información del Consejo Nacional de Población. Se estimó que se requería visitar 1300 viviendas para obtener una muestra de 590 niños. La selección de las viviendas se llevó a partir del marco muestral maestro del Distrito Federal, mediante muestreo probabilístico multietápico. Se realizó una asignación proporcional de las viviendas requeridas por delegación política y se efectuó visita casa por casa.

A cada niño seleccionado se le tomó una muestra de exudado nasofaríngeo con un hisopo de alginato de calcio, el

cual fue depositado en medio de transporte Cary-Blair hasta su llegada al laboratorio clínico. La muestra fue sembrada en gelosa chocolate enriquecida y gelosa sangre de carnero a 5 %, incubándola en atmósfera parcial de CO₂ (5 a 10 %) a 35 °C durante 18 a 24 horas. La identificación de *Haemophilus influenzae* se realizó mediante morfología colonial, observación de hemólisis parcial, requerimientos de factores X y V, tinción de Gram y tipificación con sueros específicos. La biotipificación se realizó con pruebas bioquímicas de producción de ureasa, ornitina descarboxilasa e indol. Se consideraron como no tipificables las cepas que requirieron ambos factores X y V pero que no aglutinaron con suero polivalente.

Se investigaron algunos factores asociados con mayor riesgo de colonización, incluyendo el nivel socioeconómico. Para establecer el índice de nivel socioeconómico se construyeron los indicadores con base en la metodología descrita por Bronfman y colaboradores.¹⁴ En todos los casos se revisaron las cartillas de vacunación para verificar la aplicación de vacuna contra *H. influenzae* tipo *b*.

Se realizó susceptibilidad a ocho antimicrobianos (ampicilina, penicilina, cloranfenicol, amoxicilina-clavulanato, imipenem, eritromicina, vancomicina, trimetoprim/sulfametoxazol y cefotaxima) por el método de dilución en agar de acuerdo con los criterios de la *National Committee for Clinical Laboratory Standards*.¹⁵

Los resultados se muestran mediante estadística descriptiva, prueba de χ^2 y razón de momios con intervalos de 95 % para los factores de riesgo.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Coordinación en Salud Pública. Por las características del estudio solo se requirió consentimiento verbal por parte de los padres.

Resultados

Se incluyeron 573 menores de cinco años de edad, 47.8 % masculinos y 52.2 % femeninos, 201/573 (35 %) fueron menores de dos años. De acuerdo con su edad se distribuyeron de dos a 11 meses, 13.5 %; de 12 a 23 meses, 21.6 %; de 24 a 35 meses, 15.2 %; de 36 a 47 meses, 19.9 %; de 48 a 60 meses, 29.8 %. Según el índice socioeconómico,¹⁴ en 21 % se consideró bueno, en 46 % regular y en 33 % malo; 79.6 % de los niños tuvo un esquema de vacunación completo para la edad, 56 % asistía a guardería o jardín de niños, factor que se identificó como de riesgo para estar colonizado con *H. influenzae* en comparación con la no asistencia (RM = 2.6, IC 95 % = 1.3-4.3, $p < 0.0001$). Al contrastar la colonización por Hib *versus* no tipificables fue mayor el riesgo de estar colonizado por no tipificables en los niños que asistían a guardería (RM = 3.5, IC 95 % = 2.0-6.1, $p < 0.00001$) y pertenecer a nivel socioeconómico alto (RM = 2.8, IC 95 % = 1.6-4.7, $p = 0.0004$).

Cuadro I Frecuencia de aislamiento de *Haemophilus influenzae* y su distribución de acuerdo con grupo de edad

Grupo de edad en meses (n = 573)	Aislamientos	
	n	%
02-11 (77)	9	12.0
12-23 (124)	11	8.9
24-35 (87)	14	16.1
36-47 (114)	25	22.0
48-60 (171)	29	17.0

Cuadro II Distribución de biotipos de *Haemophilus influenzae* de acuerdo con su serotipo

Serotipo biotipo	b	a, c, f	No tipificable	%
I	1	0	0	1.1
II	2	1	9	3.7
III	0	0	0	0.0
IV	0	0	0	0.0
V	0	0	4	4.5
VI	1	0	2	3.4
VII	0	0	1	1.1
VIII	3	2	62	6.1
Total	7	3	78	100.0

En 88/573 (15.3 %) se aisló *H. influenzae*. En 7/573 (1.2 %) se aisló Hib, en tres (0.5 %) Hi tipos *a, c, d, f* y en 78/573 (13.6 %) HiNT. De los siete niños con Hib, cuatro habían recibido solo una dosis de vacuna específica, dos habían recibido dos dosis y uno no había sido vacunado; dos aislamientos se llevaron a cabo en niños entre los 12 y 23 meses, y cinco en niños de 24 a 60 meses. En los aislamientos de Hi el biotipo predominante fue el VIII (76.1 %) seguido del II (13.7 %) y el V (4.5 %) (cuadros I y II).

Todas las cepas de *Haemophilus influenzae* fueron sensibles a los antibióticos evaluados, excepto una aislada de Hib que fue resistente a eritromicina, ya que requirió 4 mg/L para ser inhibida. En todos los antibióticos la concentración inhibitoria mínima 90 (CMI90) fue menor a 1 mg/L.

Discusión

Considerando el tipo de muestreo y selección de niños, este estudio puede considerarse representativo de la colonización nasofaríngea por *H. influenzae* en niños entre dos meses y cinco años de edad de las 16 delegaciones del Distrito Federal. En los estudios sobre colonización realizados en México en la década de los noventa se encontró una frecuencia entre 20 y 30 % en menores de 15 años,^{7,8} frecuencia menor en el presente estudio, aunque habrá que considerar que el tipo de niños incluidos en los estudios previos fue diferente. En el trabajo informado en 1995 se encontró una colonización por Hib global de 2.7 %, sin embargo, al analizar los menores de cinco años la colonización era de 4.1 %, ⁷ que contrasta con 1.2 % de este estudio.

Cabe resaltar que hay una disminución importante en los portadores de Hib, lo cual es esperado dada la cobertura actual con la vacuna específica; los niños de esta muestra, en los que se recuperó el Hib, no tenían un esquema completo de vacunación. En un análisis realizado con muestras serológicas de la

encuesta nacional en salud y nutrición de 2006, con una cobertura de 92 % de vacunación entre los encuestados, se encontró seroprotección en 95.3 % de los menores de cinco años.¹⁶ En un estudio reciente realizado en Argentina en niños que han recibido un esquema completo de vacunación se encontró una colonización por Hib de solo 0.06 %.¹⁷

Es importante resaltar que en la ciudad de México predominaron los aislamientos de *Haemophilus* no tipificables, detectándose como principales factores de riesgo la asistencia a guardería y el mejor nivel socioeconómico, que nos asemeja a otros países desarrollados y contrasta con la persistencia de Hib en países en desarrollo.¹⁸ Dadas las condiciones actuales en que hay una disminución de la colonización por Hib, es de esperar que incremente la frecuencia de casos de infecciones de vías respiratorias altas y bajas por HiNT.¹⁹⁻²¹ Estudios recientes han mostrado que los niños con bronquiectasias tienen mayor frecuencia de infecciones asociadas con este microorganismo.²² Conforme los resultados de este estudio, los HiNT fueron altamente sensibles a los betalactámicos, por lo que de considerarse como agentes causales de infecciones respiratorias agudas, la decisión de prescribir un betalactámico estaría plenamente justificada. Sin embargo, deberá vigilarse la susceptibilidad a antimicrobianos en los aislados de procesos invasivos, ya que, como se conoce en otros agentes patógenos, los aislados que colonizan la nasofaringe tienen mayor susceptibilidad en comparación con lo reportado en cepas invasivas.

La caracterización de los biotipos ha sido utilizada con fines epidemiológicos, refiriéndose un mayor porcentaje de resistencia a antimicrobianos en cepas del biotipo I y del serotipo *b* y una mayor producción de betalactamasas por los biotipos IV y V.¹⁸ En la muestra del presente estudio hubo un predominio del biotipo VIII, lo cual explica la baja resistencia encontrada a los antimicrobianos evaluados.

Recientemente se ha introducido a México una nueva vacuna contra 10 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* conjugada a la proteína *D* de *Haemophilus influenzae*, que además de la cobertura de infecciones por *S. pneumoniae* la hace una vacuna promisoriosa para la prevención, al mismo tiempo que de otitis media aguda por HiNT.²³ Debido a la pobre información microbiológica en cuanto a la participación de HiNT en infecciones invasivas por HiNT en México, la eficacia de la vacuna en México deberá ser evaluada en forma específica.

Se requiere una vigilancia continua para conocer el posible incremento de infecciones por HiNT, ya que su presencia en niños mexicanos ha sido evidenciada por Villaseñor desde hace más de 10 años²⁰ en casos de otitis media aguda. Sumado a lo anterior, los resultados de este estudio pueden tomarse como base para estudios posteriores donde se pueda evaluar el posible impacto de la vacuna conjugada 10 valente sobre la colonización nasofaríngea en población de niños mexicanos.

Referencias

- Berman S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. *Rev Infect Dis* 1991;13 (Suppl 6):S454-S62.
- Janai H, Stutman HR, Marks MI. Invasive *Haemophilus influenzae* type B infections: a continuing challenge. *Am J Infect Control* 1990;18(3):160-166.
- Games EJ, Solórzano SF, López PJ, Alvarez HL, Ramírez CF. Etiología de la meningococcal purulenta en pediatría. Implicaciones terapéuticas. *Gac Med Mex* 1991; 127(4):315-320.
- Yaro S, Lourd M, Naccro B, Njanpop-Lafourcade BM, Ouedraogo MS, Traore Y, et al. The epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in Burkina Faso. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25(5):415-419.
- Johnson NG, Ruggier JU, Balfour GF, Lee YC, Liddy H, Irving D, et al. *Haemophilus influenzae* type b reemergence after combination immunization. *Emerg Infect Dis* 2006;12 (6):937-941.
- van der Veen EL, Rovers MM, Leverstein-van Hall MA, Sander EA, Scilder AG. Influence of sampling technique on detection of potential pathogens in the nasopharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132(7):752-755. Disponible en <http://archotol.ama-assn.org/cgi/content/full/132/7/752>
- Aniansson G, Alm B, Anderson B, Larson P, Nysten O, Petersen H, et al. Nasopharyngeal colonization during the first year of life. *J Infect Dis* 1992;165(Suppl 1):S38-S42.
- Dabernat H, Plisson-Sauné MA, Delmas C, Séguy M, Faucon G, Péliissier R, Carsenti H, et al. *Haemophilus influenzae* carriage in children attending French day care centers: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1664-1672. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC153885/?tool=pubmed>
- Miranda NMG, Solórzano SF, Velázquez AR, Leaños MB, Villasis KMA, Guiscafré GH. Características de los aislamientos de *Haemophilus influenzae* de portadores asintomáticos en edad pediátrica y su relación con resistencia a antimicrobianos. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1995;52(3):148-153.
- Villaseñor-Sierra A, Herrera-Basto E, Vázquez Salazar P, Arroyo-Moreno JA, Santos Preciado JI. Prevalence of *Haemophilus influenzae* carrier state in children in Ciudad Nezahualcoyotl, State of Mexico, Mexico. *Salud Pública Mex* 1996;38(2):87-93.
- Franco-Paredes C, Lammoglia L, Hernández I, Santos-Preciado JI. Epidemiology and outcomes of bacterial meningitis in Mexican children: 10-year experience (1993-2003). *Int J Infect Dis*. 2008;12(4):380-386. Epub 2008 Feb 20.
- Campos J, Hernando M, Román F et al. Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against H. influenzae type b. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2):524-529. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC344522/?tool=pubmed>
- Murphy TF, Faden H, Bakaletz LO, Kyd JM, Forsgren A, Campos J, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a pathogen in children. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28 (1):43-48.
- Bronfman M, Guiscafré H, Castro V, Castro R, Gutiérrez G. La medición de la desigualdad. Una estrategia metodológica para el análisis de las características socioeconómicas de la muestra. *Arch Invest Med* 1988;19(4):351-360. Disponible en <http://blog.psico.edu.uy/escueladeverano2011/files/2011/02/La-medic%C3%B3n-de-la-desigualdad.pdf>
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: Approved Standard. Fifth edition. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000. NCCLS document M7-A5.
- Rodríguez RS, Mascarenas C, Conde-González CJ, Inostroza J, Villanueva S, Velázquez ME, et al. Serological protection induced by *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Mexican children: Is a booster dose of the vaccine needed? *Clin Vaccine Immunol* 2010;17(10):1639-1641. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2953005/?tool=pubmed>
- Romanin V, Chiavetta L, Salvay MC, Chiolo MJ, Regueira M, Barrios A, et al. Vacuna anti-*Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) en el Calendario Nacional de Argentina: portación nasofaríngea de Hib tras ocho años de su introducción. *Arch Pediatr Urug* 2009;80(1):51-59. Disponible en <http://www.scielo.edu.uy/pdf/adp/v80n1/v80n1a11.pdf>
- Sekhar S, Chakraborti A, Kumar R. *Haemophilus influenzae* colonization and its risk factors in children aged <2 years in northern India. *Epidemiol Infect* 2009;137(2):156-160.
- De Maria FT, Lim FJ, Barnisham J, Agers WL, Bick GH. Biotypes of serologically nontypable *Haemophilus influenzae* isolated from the middle ear and nasopharynx of patients with otitis media with effusion. *J Clin Microbiol* 1984;20 (6):1102-1104. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC271526/?tool=pubmed>
- Villaseñor-Sierra A, Santos JI. Outer membrane protein profiles of paired nasopharyngeal and middle ear isolates of nontypable *Haemophilus influenzae* from Mexican children with acute otitis media. *Clin Infect Dis* 1999;28(2):267-273.
- Dabernat H, Plisson-Saune MA, Delmas C, Seguy M, Faucon G, Pelissier R, et al. *Haemophilus influenzae* carriage in children attending French day care centers: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1664-1672.
- Hare KM, Grimwood K, Leach AJ, Smith-Vaughan H, Torzillo PJ, Morris PS, et al. Respiratory bacterial pathogens in the nasopharynx and lower airways of Australian indigenous children with bronchiectasis. *J Pediatr* 2010;157(6): 1001-1005.
- Dinleyici EC, Yargic ZA. Pneumococcal conjugated vaccine: PHiD-CV. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7 (9):1063-1074.