

ARTÍCULO ORIGINAL

Ensayo cuantitativo para la determinación de la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa

Ernesto C. González¹, Libertad Díaz², Amarilys Frómata¹,
Darlenis Herrera¹, Adonis Montenegro²

¹ Laboratorio de Tamizaje Neonatal, Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba.

² Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Victoria de Girón, Departamento de Inmunología, La Habana, Cuba.

El presente trabajo describe la estandarización de un ensayo diseñado para cuantificar la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa en muestras de suero humano, el cual se basa en el método de Wolf y colaboradores, que emplea el N-biotinil-p-aminobenzoico (BPABA) como sustrato. Con la adición de detergentes a la solución de nitrito de sodio, se eliminan las burbujas de nitrógeno formadas durante la reacción de diazotación y se mejora la precisión del ensayo. Se observó que la congelación-descongelación de las muestras de suero no afecta la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa. La evaluación de la interferencia de fármacos en el ensayo mostró que con el sulfametoxazol/trimetoprim y la procaína/benzilpenicilina hay desarrollo de color en ausencia del sustrato BPABA. Los valores promedio de actividad hidrolítica de la biotinidasa, obtenidos en un grupo de 205 niños sanos, fue de $7,04 \pm 2,2$ nmol/min/ml. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar la actividad de la enzima por sexo, raza y grupos de edad. Este ensayo se puede emplear en la determinación de la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa en muestras de suero humano y, específicamente, en la confirmación de los casos detectados por los programas de tamizaje neonatal para la deficiencia de biotinidasa.

Palabras clave: deficiencia de biotinidasa, ensayo colorimétrico, tamizaje neonatal.

Quantitative assay to determine the hydrolytic activity of biotinidase

A quantitative assay was standardized to determine the hydrolytic activity of biotinidase in human serum samples. The current Wolf *et al.* assay uses N-biotinyl-p-aminobenzoic acid as substrate. The assay's precision was improved by the addition of detergents to the sodium nitrite solution. This eliminated the formation of nitrogen bubbles during the diazotation reaction. Freezing and thawing of the serum samples did not affect the hydrolytic activity. Farmaco's interference test showed positive results with sulfametoxazol/trimetoprima and procaine/benzylpenicilline. The hydrolytic activity of biotinidase averaged 7.04 ± 2.2 nmol/min/ml in a group of 205 healthy children. No statistically significant differences in enzymatic activity was observed between variables of sex, races and age group. The standardize assay can determine the hydrolytic activity of biotinidase human serum samples and can confirm the positive cases detected by neonatal screening programs for biotinidase deficiency.

Key words: Biotinidase deficiency, colorimetric assay, neonatal screening.

Uno de los errores innatos del metabolismo de la biotina lo constituye la deficiencia de la enzima

biotinidasa. Descrita en la década de los 50, la biotinidasa es la enzima encargada del reciclaje de la biotina obtenida de la degradación de las carboxilasas y de la liberación de la biotina unida a las proteínas de la dieta, llevándolas a una forma biológicamente viable (1,2).

Correspondencia:

Ernesto C. González, Apartado postal 6653, Cubanacán, Playa C, Habana, Cuba.

Recibido: 07/05/01; aceptado: 19/11/01

La deficiencia de biotinidasa es un trastorno metabólico autosómico recesivo que se clasifica en deficiencia total (<10% de actividad hidrolítica) o parcial (10-30%)(3-5). El cuadro clínico y el tiempo de presentación de los síntomas es muy variable (6-10). La sintomatología inicial está relacionada con el sistema nervioso: hipotonía muscular, ataxia y retraso en el desarrollo psicomotor (6,8). También puede observarse pérdida de la audición, atrofia óptica, alopecia, problemas respiratorios, dermatitis, conjuntivitis, infecciones fúngicas e inmunodeficiencias (8). Las manifestaciones bioquímicas más frecuentes son la acidosis cetoláctica y la aciduria orgánica. La descompensación metabólica puede llevar al coma y a la muerte (6). Un diagnóstico temprano en el período neonatal permite una terapia efectiva con biotina (6-8).

En 1984, se comenzó el primer programa de tamizaje neonatal de la deficiencia de biotinidasa en el estado de Virginia, Estados Unidos (11). Otros países también han desarrollado programas para el tamizaje de la enfermedad como un acto de medicina preventiva (12-21). Se estima que la incidencia mundial de la deficiencia de biotinidasa es de 1:60.000 (4). Su incidencia es baja si se compara con otras patologías conocidas como son el hipotiroidismo congénito (1:4.000) y la fenilcetonuria (1:15.000), pero es similar a otras como la galactosemia (1:60.000).

El presente trabajo describe la estandarización de un ensayo colorimétrico que permite la cuantificación de la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa en muestras de suero humano. La interferencia de los medicamentos de la familia de las sulfonamidas se ha informado en los ensayos para la detección de la deficiencia de biotinidasa que emplean el BPABA como sustrato. Por tanto, es importante evaluar el posible efecto de fármacos de uso común en el período neonatal y en la infancia sobre este tipo de ensayo, para disminuir la posibilidad de falsos resultados (11,22).

Materiales y métodos

Reactivos

El ácido tricloroacético (TCA), el N-biotinil-p-aminobenzoico (B-PABA), el p-amino-benzoico

(PABA), el fosfato de potasio, el nitrito de sodio (NaNO₂), el sulfato de amonio, el N-1-naftiletilendiaminodihidrocloruro (vitamina K-6) y el ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) se obtuvieron de *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A.

Ensayo para determinar la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa en muestras de suero humano

El ensayo se basa en una modificación al método descrito por Wolf *et al.* (23), en la cual se adicionan 25 ml de suero a una mezcla de reacción compuesta por 200 mM del sustrato B-PABA y 4,5 mM de EDTA en solución tampón fosfato de potasio, 47 mM, pH 6,0 para un volumen final de 500 ml. Se empleó una curva de calibración de 5, 10, 20, 40 y 80 mM de PABA y 4,5 mM de EDTA en solución tampón fosfato de potasio, 47 mM, pH 6,0. Se incubó a 37 °C en cámara húmeda para que ocurriera la reacción enzimática. Se detuvo la reacción con 50 ml de una solución fría de TCA (1,84 M). Después de 10 minutos, se centrifugó a 16.000 g; se tomaron 300 ml del sobrenadante y se le añadieron 100 ml de agua destilada. Luego, se adicionaron 40 ml de los siguientes reactivos con intervalos de 3 minutos: nitrito de sodio (14,5 mM), sulfamato de amonio (43,8 mM) y vitamina K-6 (3,86 mM). Se esperaron 10 minutos y se transfirieron 200 ml a placas microELISA. Se midió la densidad óptica a 546 nm, empleando el lector de placas Fluorímetro-Fotómetro PR 521 (Tecnología SUMA, Centro de Inmunoensayo).

La figura 1 muestra el diagrama de la reacción enzima-sustrato, los productos obtenidos y las reacciones que dan lugar a la formación del complejo coloreado.

La actividad enzimática se calculó según la siguiente fórmula:

actividad enzimática = nmoles de PABA producidos/tiempo de incubación/volumen de muestra.

Se determinó si la adición de detergentes a la solución de nitrito de sodio eliminaba las burbujas de nitrógeno formadas durante la reacción de diazotación, las cuales interfieren en la señal obtenida de absorbancia. Se emplearon los

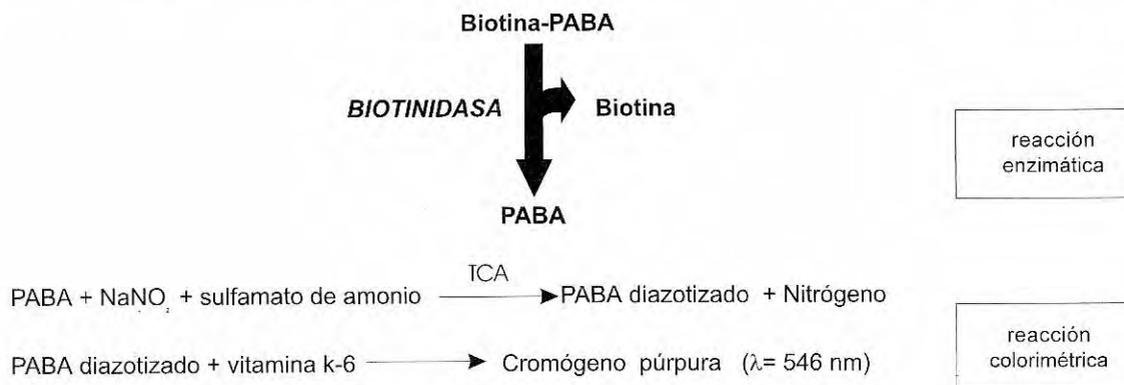


Figura 1. Hidrólisis del sustrato BPABA por la enzima biotinidasa (reacción enzimática) y detección del PABA formado (reacción colorimétrica).

detergentes no iónicos tween 20 y tritón X-100, los cuales se añadieron a la solución de nitrito de sodio en concentraciones de 0,1 y 0,5%.

Se estableció el tiempo óptimo de incubación del ensayo y se evaluaron los valores promedio de absorbancia obtenidos con los diferentes puntos de la curva de PABA (n=5) y con una muestra de suero humano con actividad normal de biotinidasa (n=5). Los tiempos estudiados fueron 0, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos y se determinó como óptimo el tiempo a partir del cual no variaba la señal obtenida de absorbancia.

Se evaluó la interferencia con la reacción colorimétrica de los siguientes fármacos: sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina, gentamicina, fenobarbital y estreptomycin a concentraciones de 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 mg/ml y de procaína/benzilpenicilina a 188, 375, 750, 1.500 y 3.000 unidades internacionales (UI). Se empleó un suero humano libre de actividad de la enzima biotinidasa al que se le adicionaron los fármacos. En este ensayo, las muestras se incubaron con el tampón fosfato en sustitución del sustrato.

Se estudió la interferencia de fármacos en muestras de niños que estaban recibiendo medicamentos en el momento de la toma de la muestra. Este ensayo se realizó incubando simultáneamente las muestras con tampón fosfato y con la solución sustrato.

Se estudió el efecto de eventos repetidos de congelación-descongelación de las muestras de

suero humano sobre la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa. Las muestras se sometieron a 5 ciclos de congelación a -35°C durante 30 minutos y descongelaciones a temperatura ambiente. Se calculó la actividad enzimática de la biotinidasa para cada uno de los ciclos de congelación-descongelación.

Para la determinación de los coeficientes de variación (CV) intra e interensayo, se evaluaron muestras de actividad conocida de biotinidasa. El CV se definió como la división entre la desviación estándar y el valor promedio de cada muestra, multiplicado por 100.

Se determinaron los porcentajes de recuperación obtenidos para el ensayo al mezclar muestras de suero humano con actividad biotinidasa conocida. El porcentaje de recuperación se definió como la división entre la actividad biotinidasa obtenida y la actividad esperada, multiplicado por 100.

Determinación de la actividad hidrolítica de la biotinidasa en muestras de suero humano

Se emplearon muestras de suero de un grupo de niños (n=205) con edades comprendidas entre 1 y 17 años, a quienes se les habían ordenado ensayos clínicos de rutina. Estas muestras se obtuvieron en el Laboratorio de Bioquímica del Hospital Pediátrico de Centro Habana, Ciudad de La Habana, Cuba. Los niños presentaban enfermedades frecuentes en esta etapa de la vida (influenza, enfermedades diarreicas) cuyos signos clínicos excluyen desórdenes neurológicos y

metabólicos que puedan asociarse con la deficiencia de biotinidasa.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa *Statistics for Windows*, versión 4.5. Para evaluar la influencia del proceso de congelación-descongelación sobre la actividad de la biotinidasa en muestras de suero humano, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. En la comparación de los valores promedios de actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa, obtenidos por sexo, raza y grupos de edad se empleó la prueba t de *Student*. Con ambos datos estadísticos se trabajó para un nivel de significación de $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Evaluación de la adición de detergentes a la solución de nitrito de sodio y determinación del tiempo óptimo de incubación del ensayo

En la figura 2 se muestran los valores promedio de absorbancia obtenidos para cada punto de la curva de PABA al evaluar la adición de los detergentes no iónicos tritón X-100 y tween 20 a la solución de nitrito de sodio, con el objetivo de eliminar las burbujas de nitrógeno formadas durante la reacción de diazotación y que pudieran interferir en la medición de la absorbancia.

Los altos valores de absorbancia para la condición en la cual no se adicionó ningún detergente están asociados con las interferencias provocadas por la presencia de las burbujas en la solución. No se observaron grandes diferencias en los valores promedios de absorbancia obtenidos entre todas las condiciones donde se adicionó detergente. Sin embargo, la evaluación visual mostró que sólo se eliminaban completamente las burbujas de nitrógeno en la solución empleando el nitrito de sodio que contenía tritón X-100 al 0,1%. Este detergente en concentraciones entre 0,1 y 0,5% no afectó la actividad de la enzima y ya había sido empleado en el tampón sustrato (24). Con la adición de este detergente a la solución de nitrito de sodio, se mejoraron los valores de absorbancia que se obtienen para el calibrador de concentración de PABA igual a 0. Esto garantiza una mejor separación entre los dos primeros puntos de la

curva de calibración y mejora la precisión del ensayo.

El cuadro 1 muestra los valores de absorbancia obtenidos al incubar a 37 °C la curva de PABA a diferentes tiempos. El tiempo de incubación no afectó los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de la curva de calibración y se obtuvo una buena correlación (0,999) entre todos los tiempos estudiados.

Se evaluó el efecto del tiempo de incubación sobre los valores promedio de absorbancia obtenidos con una muestra de suero humano con actividad normal de biotinidasa. Los resultados se pueden observar en la figura 3.

A partir de los 60 minutos de incubación de las muestras con la solución sustrato, se obtuvieron valores de absorbancia que no variaron con el tiempo de incubación. Estos valores de absorbancia se encuentran en una zona media de la curva de PABA lo cual nos permite hacer una buena discriminación entre las muestras de individuos afectados con la enfermedad e individuos con actividad normal de biotinidasa.

A partir de estos resultados, se decidió emplear en el ensayo un tiempo de incubación de 60 minutos. La absorbancia se pudo medir en el lector fluorímetro-fotómetro PR 521, 10 minutos después del desarrollo de color y se observó que esta señal era estable durante dos horas si se mantenían las placas protegidas de la luz.

Precisión y exactitud

En el cuadro 2 se muestran los coeficientes de variación (CV) intra e interensayo. En ambos casos se evaluaron muestras de actividad de biotinidasa conocida y que abarcaban un amplio intervalo de la curva de calibración del ensayo. En todos los casos, los coeficientes de variación fueron inferiores al 10%.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para el ensayo al mezclar muestras de suero humano con actividad de biotinidasa conocida, fueron de $98,3 \pm 7,5\%$ y los porcentajes individuales oscilaron entre 94 y 108%.

Los resultados anteriores nos permiten plantear que el ensayo es preciso y exacto dentro de un

intervalo que garantiza poder diferenciar poblaciones con diferentes valores de actividad de la enzima biotinidasa.

Determinación del límite de detección

El límite de detección del ensayo se definió como el valor promedio de absorbancia del calibrador 0 de la curva de calibración más tres desviaciones estándar. La actividad mínima detectable fue de 0,64 nmol/min/ml. Este valor de actividad nos permite utilizar el ensayo para evaluar la actividad de la enzima biotinidasa en poblaciones normales

y clasificar la deficiencia en total o parcial. La deficiencia total se informa para valores de actividad inferiores a 0,7 nmol/min/ml y la deficiencia parcial en un rango de actividad entre 0,7 y 2,1 nmol/min/ml. Los heterocigóticos obligados muestran una actividad enzimática entre 2,2 y 5,2 nmol/min/ml (24).

Pruebas de interferencia

En ausencia de sustrato no hubo interferencia en las muestras de suero a las que se le adicionaron las diferentes concentraciones (0-10 mg/ml) de

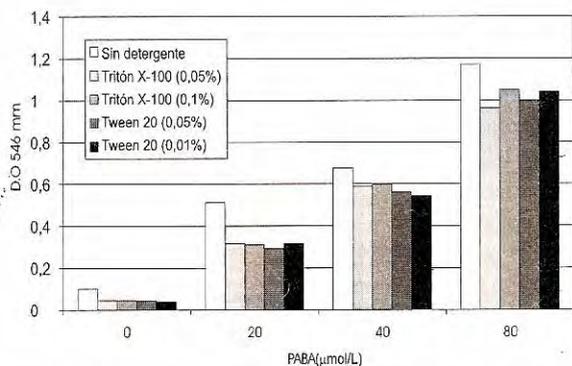


Figura 2. Comparación de los valores promedio de absorbancia (n=5) obtenidos para los puntos de la curva de PABA al emplear detergentes en la solución de nitrito de sodio.

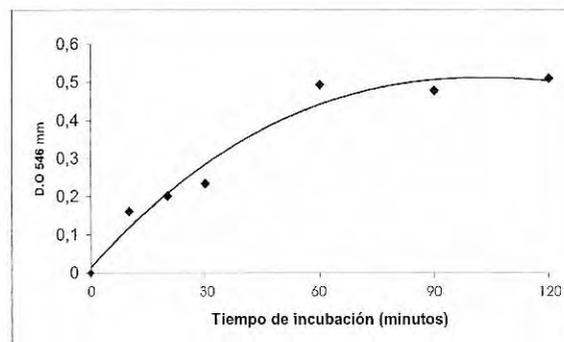


Figura 3. Efecto del tiempo de incubación sobre los valores de absorbancia en una muestra de suero humano con actividad normal de la enzima biotinidasa.

Cuadro 1. Valores promedio de absorbancia de la curva de PABA a diferentes tiempos de incubación.

Curva (μmol/ml)	Tiempo (min)							CV
	0	10	20	30	60	90	120	
0	0,049	0,045	0,048	0,047	0,045	0,046	0,046	3,2
5	0,110	0,099	0,103	0,108	0,110	0,106	0,102	4,0
10	0,176	0,160	0,175	0,171	0,169	0,177	0,178	3,7
20	0,272	0,296	0,307	0,298	0,297	0,308	0,310	4,3
40	0,541	0,537	0,554	0,562	0,560	0,544	0,560	1,8
80	0,980	0,941	0,985	0,982	1,014	0,983	0,961	2,3

CV: coeficiente de variación para cada punto de la curva

Cuadro 2. Precisión del ensayo.

Actividad enzimática (nmol/min/ml)	Desviación estándar	CV intraensayo (n=20)	Actividad enzimática (nmol/min/ml)	Desviación estándar	CV interensayo (n=10)
2,61	0,20	7,7	4,1	0,31	7,5
5,71	0,29	5,1	6,0	0,31	5,9
10,12	0,67	6,6	8,5	0,70	7,8

ampicilina, gentamicina, fenobarbital y estreptomyciná. Los valores de absorbancia obtenidos fueron similares al valor del calibrador 0 del ensayo, que fue de 0,09. Los sueros que contenían sulfametoxasol/trimetoprim y procaína/benzilpenicilina sí interfirieron en el ensayo. Estos resultados se muestran en el cuadro 3. El valor de absorbancia del calibrador de 80 μ M de la curva de calibración de PABA fue de 1,25. Con el sulfametoxasol/trimetoprim, para todas las concentraciones estudiadas, los valores de absorbancia fueron superiores al valor del calibrador de 80 μ M de PABA. En el caso de la procaína/benzilpenicilina, los valores de absorbancia disminuyeron a partir de 750 UI, aunque todavía a la concentración de 188 UI esos valores de absorbancia interfirieron en el ensayo.

Entre las muestras provenientes del Hospital Pediátrico de Centro Habana se encontraron 5 niños que estaban en tratamiento con sulfametoxasol/trimetoprim. En el cuadro 4 se observan los valores de absorbancia y de actividad enzimática calculada para esas muestras, antes y después de corregida la posible interferencia con el fármaco. Esta corrección se realizó teniendo en cuenta la absorbancia obtenida con las muestras en ausencia de sustrato. En las muestras

1, 2 y 3 se observó la interferencia del fármaco, lo que hace que en todos los casos la actividad real de la enzima sea mucho menor. Al ser corregida la actividad enzimática en las muestras 2 y 3 pudimos observar que los niños que presentaban una actividad de biotinidasa por encima del valor promedio de la población (7,1 nmol/min/ml), realmente clasificaban dentro del grupo de heterocigóticos obligados (24). Las muestras 4 y 5 no mostraron señales de interferencia, pues los valores de absorbancia obtenidos en ausencia de sustrato son similares a los del calibrador 0 de la curva de PABA (0,045). La ausencia de interferencia en las dos últimas muestras puede deberse a que, en el momento de la toma de la muestra, el fármaco ya había sido metabolizado por el organismo. No se pudieron precisar en ninguno de los casos las dosis y el tiempo de tratamiento.

Se conocía de la interferencia producida por los medicamentos pertenecientes a la familia de las sulfonamidas (11,22). En el caso de la procaína/benzilpenicilina la interferencia se debe al grupo 4-aminobenzoico en la estructura de la procaína. En ambos medicamentos, la interferencia está asociada con la similitud estructural del fármaco con el PABA. La presencia de grupos aminos

Cuadro 3. Valores promedio de absorbancia obtenidos con los sueros a los que se les adicionaron los medicamentos sulfametoxasol/trimetoprim y procaína/benzilpenicilina.

Sulfametoxasol/trimetoprim (mg/ml)	Absorbancia (546 nm) n=5	Procaína/benzilpenicilina UI	Absorbancia (546 nm) n=5
10,0	3,00	3.000	2,88
5,0	2,99	1.500	1,81
2,5	2,25	750	0,66
1,25	2,18	375	0,64
0,625	1,53	188	0,27

Cuadro 4. Interferencia del sulfametoxasol/trimetoprim en la determinación de la actividad de biotinidasa en muestras de niños.

Muestras	Absorbancia total	Actividad enzimática total (nmol/min/ml)	Absorbancia sin sustrato	Absorbancia corregida	Actividad enzimática corregida (nmol/min/ml)
1	0,55	13,4	0,18	0,37	8,58
2	0,46	10,6	0,26	0,20	3,90
3	0,42	10,0	0,24	0,18	3,39
4	0,37	8,6	0,05	0,32	7,70
5	0,28	6,1	0,03	0,25	5,44

primarios en la estructura aromática de estos fármacos contribuye a la formación del complejo coloreado aún en ausencia de la enzima biotinidasa. Los estudios que se han realizado no han analizado las condiciones farmacológicas de biodisponibilidad y degradación del medicamento (11,22), lo que no descarta la posibilidad de que algunos de sus metabolitos puedan generar otros interferentes.

Los fármacos evaluados son de uso común en el período neonatal y en la infancia en general, por lo que estos estudios de interferencia son un elemento muy importante a tener en cuenta al emplear este ensayo, ya que la presencia de ciertos fármacos puede ser una fuente de falsos negativos y, en aquellos casos en que se obtengan valores de absorbancia muy altos, se debe sospechar la presencia de interferentes. De hecho, se recomienda realizar las dos determinaciones simultáneamente (en ausencia y presencia de sustrato) para descartar posibles interferencias (11,22).

Efecto de la congelación-descongelación sobre la actividad enzimática

El cuadro 5 muestra los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la congelación-descongelación sobre la actividad enzimática de la biotinidasa en cinco muestras de suero humano. El proceso de congelación-descongelación no afectó significativamente la actividad de la enzima biotinidasa.

En este trabajo nos referimos a la actividad hidrolítica de la enzima, pues es la única función que se puede medir con el ensayo. Por tanto, no podemos afirmar que las otras funciones de la enzima biotinidasa, por ejemplo, la actividad biotinitransferasa (24), no se vean afectadas por el proceso de congelación-descongelación. Hay que señalar que este estudio se realizó con muestras recientes, por lo que sería interesante evaluar este efecto con muestras conservadas por largos períodos a diferentes temperaturas.

Determinación de la actividad de la enzima biotinidasa en muestras de suero humano

El valor promedio de actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa obtenido al evaluar un grupo

Cuadro 5. Efecto de la congelación-descongelación de las muestras de suero humano sobre la actividad de la biotinidasa; para el análisis estadístico se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple.

Actividad enzimática (nmol/min/ml)	Descongelaciones					p
	1	2	3	4	5	
6,831	7,662	7,119	7,198	7,825	7,881	0,07
5,731	6,450	5,925	6,631	5,650	6,756	0,27
7,037	7,938	7,413	8,288	8,913	7,800	0,10
5,631	6,869	6,313	5,756	6,381	6,788	0,11
6,163	7,356	6,856	7,662	7,006	7,813	0,19

de niños (n=205), con un promedio de edad de $6,5 \pm 4,2$ años, fue de $7,04 \pm 2,2$ nmol/min/ml. Este resultado es similar a lo informado para otras poblaciones con actividad normal de la enzima (25,26).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedios de actividad de la enzima al realizar el estudio por sexo ($p=0,33$) y raza ($p=0,38$). La deficiencia de biotinidasa ha sido descrita en distintas poblaciones y no se ha determinado la existencia de una mayor frecuencia de aparición por sexo o raza.

En el cuadro 6 se pueden observar los valores de actividad enzimática obtenidos para tres grupos de edad diferentes. El valor medio de actividad de biotinidasa obtenido para el grupo 1 fue ligeramente mayor que en el resto de los grupos; sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas al realizar la prueba t de Student entre los grupos 1 y 2 ($p=0,11$), los grupos 1 y 3 ($p=0,21$) y los grupos 2 y 3 ($p=0,94$).

Se ha informado que los niveles de actividad de biotinidasa en recién nacidos es entre 50 y 70% inferior al valor promedio de la población adulta (22); pero los niveles de actividad en adultos se alcanzan al mes de nacidos (27). Esto coincide con nuestros resultados, en los cuales el valor medio de actividad de biotinidasa por grupos de edad es similar a lo informado para la población adulta. Los valores de actividad enzimática obtenidos con las muestras 2 y 3 (cuadro 4), que los define como heterocigóticos obligados, hablan de la necesidad de realizar estudios que permitan evaluar la frecuencia de portadores de genes para

Cuadro 6. Estudio de la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa por grupos de edad ; para el análisis estadístico se empleó la prueba t de *Student*.

Grupos	Edad (años)	n	Actividad enzimática (nmol/min/ml)
1	1-5	95	7,27 ± 2,13
2	6-10	69	6,75 ± 2,06
3	11-17	41	6,78 ± 2,09

Datos expresados: media ± D.E.

la deficiencia de biotinidasa en la población cubana. Estimados internacionales obtenidos de los programas de tamizaje neonatal muestran una frecuencia de portadores de 1 por cada 123 individuos (28).

La incidencia de la deficiencia de biotinidasa en muchos países es desconocida. Según los resultados de los programas de tamizaje neonatal, la incidencia de la deficiencia total es aproximadamente de 1 en 110.000 y, teniendo en cuenta los casos de deficiencia parcial, se estima una incidencia mundial de 1 en 60.000 (4). El diagnóstico temprano de esta enfermedad mediante los programas de tamizaje neonatal, así como una efectiva suplementación oral con biotina libre, previene la aparición de síntomas.

Este ensayo colorimétrico cuantitativo que emplea como sustrato el B-PABA tiene la ventaja de emplear pequeños volúmenes de muestra (25 ml de suero) sin que se afecte la precisión y exactitud (29,30) y puede utilizarse dentro de los programas de tamizaje neonatal para la confirmación y clasificación de los casos en que se sospeche la deficiencia de biotinidasa. Además, puede emplearse en la realización de estudios familiares y en el análisis de individuos que presenten algunos de los síntomas de la enfermedad.

Referencias

1. Nyhan WL. Inborn errors of biotin metabolism. Arch Dermatol 1987;123:1696-8.
2. Thomas RW, Peterson WH. The enzymatic degradation of soluble bound biotin. J Biol Chem 1954;210:569-79.
3. Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. Clin Chim Acta 1983; 131:273-81.
4. Wolf B. Disorders of biotin metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p.3151-80.
5. Pomponio RJ, Hymes J, Reynolds TR, Meyers GA, Fleischhauer K, Buck GA, et al. Mutations in the human biotinidase gene that cause profound biotinidase deficiency in symptomatic children: molecular, biochemical, and clinical analyses. Pediatr Res 1997;42:840-8.
6. Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL, Parker WD, et al. Phenotypic variation in biotinidase deficiency. J Pediatr 1983;103:233-7.
7. Wolf B, Heard GS, Jefferson LG, Proud VK, Nance WE, Weissbecker KA. Clinical findings in four children with biotinidase deficiency detected through a state-wide neonatal screening program. N Engl J Med 1985;313: 16-9.
8. Wastell HJ, Bartlett K, Dale G, Shein A. Biotinidase deficiency: a survey of 10 cases. Arch Dis Child 1988;63: 1244-9.
9. Lott IT, Lottenberg S, Nyhan WL, Buchsbaum MJ. Cerebral metabolic changes after treatment in biotinidase deficiency. J Inher Metab Dis 1993;16:399-407.
10. Collins JE, Nicholson NS, Dalton N, Leonard JV. Biotinidase deficiency: early neurological presentation. Dev Med Child Neurol 1994;36:263-70.
11. Heard GS, McVoy JR, Wolf B. A screening method for biotinidase deficiency in newborns. Clin Chem 1984;30: 125-7.
12. Minns RA, Kirk J. Biotinidase deficiency in Scotland. Dev Med Child Neurol 1994; 36:748-9.
13. Castiñeiras DE, Couce ML, Alonso-Fernández JR. Two cases of biotinidase deficiency within a 9 day period after 8 years of neonatal screening involving the analysis of 175,000 newborn children. En: Levy HL, Hermos RJ, Grady GF, editors. Proceedings, Third Meeting of the International Society for Neonatal Screening, 1996, Oct. 20-23. Boston: New England Regional Newborn Screening Program; 1996. p.190-1.
14. Pistaccio LG, Castillo PI, Di Carlo CM, Adam MM, Lanz MH, Gómez FR, et al. Primera experiencia de pesquisa masiva de deficiencia de biotinidasa en Argentina. En: Cornejo V, Raimann E, Colombo M, editores. Resúmenes, II Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal, 1999, oct. 24-27. Santiago de Chile: Caupolicán Servicios Gráficos; 1999. p.83.
15. Héron B, Gautier A, Dulac O, Ponsot G. Déficit en biotinidase. Une encéphalopathie progressive curable par la biotine. Arch Fr Pediatr 1993;50:875-8.
16. Möslinger D, Scheibeneiter S, Mühl A, Suormala T, Baumgartner R, Tiefenthaler M, et al. 12 years newborn screening for biotinidase deficiency in Austria.

- Abstracts, 4th Meeting of the International Society for Neonatal Screening 1999, June 13-16. Oslo: Stockholm Convention Bureau; 1999. p.109.
17. **Pomponio RJ, Yamaguchi A, Arashima S, Hymes J, Wolf B.** Mutation in a putative glycosylation site (N489T) of biotinidase in the only known Japanese child with biotinidase deficiency. *Mol Gen Metabol* 1998; 64:152-4.
 18. **Tokatli A, Coskun T, Özalp I.** Biotinidase deficiency with neurological features resembling multiple sclerosis. *J Inher Metab Dis* 1997;20:707-8.
 19. **Eyskens F.** Neonatal screening for biotinidase deficiency: a success story. Abstracts, 4th Meeting of the International Society for Neonatal Screening 1999, June 13-16. Oslo: Stockholm Convention Bureau; 1999. p.110.
 20. **Guthenberg C, Holme E, Hagenfeldt L.** Screening for biotinidase deficiency in Sweden. En: Levy HL, Hermos RJ, Grady GF, editors. Proceedings, Third Meeting of the International Society for Neonatal Screening, 1996, Oct. 20-23. Boston: New England Regional Newborn Screening Program; 1996. p.192.
 21. **Neto EC, Schulte J, Lewis E, Brites A, Giugliani R.** Screening for biotinidase deficiency in South Brazil. Abstracts, 4th Meeting of the International Society for Neonatal Screening 1999, June 13-16. Oslo: Stockholm Convention Bureau; 1999.p.108.
 22. **Heard GS, Wolf B, Jefferson LG, Weissbecker KA, Nance WE, McVoy JRS, et al.** Neonatal screening for biotinidase deficiency: results of a 1-year pilot study. *J Pediatr* 1986;108:40-6.
 23. **Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL.** Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* 1983; 131:273-81.
 24. **Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B.** Biotinidase in serum and tissues. *Methods Enzymol* 1997;279:422-34.
 25. **Burton BK, Roach ES, Wolf B, Weissbecker KA.** Sudden death associated with biotinidase deficiency. *Pediatrics* 1987;79:482-3.
 26. **Lawler MG, Frederick DL, Rodríguez-Anza S, Wolf B, Levy HL.** Newborn screening for biotinidase deficiency: pilot study and follow-up of identified cases. *Screening* 1992;1:37-47.
 27. **Sourmala T, Wick H, Baumgartner ER.** Low biotinidase activity in plasma of some pre-term infants: possible source of false-positive screening results. *Eur J Pediatr* 1988;147:478-90.
 28. **Wolf B, Heard GS.** Disorders of biotin metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw- Hill, Inc; 1989. p.2083-103.
 29. **Wastell H, Dale G, Bartlett K.** A sensitive fluorimetric rate assay for biotinidase using a new derivative of biotin, biotinyl-6-aminoquinoline. *Ann Biochem* 1984;140:69-73.
 30. **Ebrahim H, Dakshinamurti K.** A fluorometric assay for biotinidase. *Ann Biochem* 1986;154:282-6.

REVISIÓN DE TEMA

Infecciones por *Haemophilus influenzae* en la población pediátrica

Camilo Enrique Gutiérrez

División Centro Control de Enfermedades, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Haemophilus influenzae es un microorganismo causante de una variada gama de patologías en diferentes segmentos de la población, especialmente en la población pediátrica, en la cual representa una carga importante en morbilidad, mortalidad y gastos en salud a nivel mundial. Las infecciones por este agente cubren un gran espectro que va desde colonización asintomática del tracto respiratorio superior, infecciones superficiales y localizadas hasta afecciones sistémicas graves como sepsis, meningitis o epiglotitis. Se hace una revisión actualizada de la infección por *H. influenzae*, con especial énfasis en los aspectos microbiológicos, de su patogenia, la epidemiología, los procedimientos de diagnóstico y de tratamiento, y se incluyen algunos comentarios sobre las enfermedades específicas causadas por este agente patógeno, mencionando, también, las estrategias de prevención y el impacto de la vacunación contra este agente.

Palabras clave: *H. influenzae*, infección, enfermedad invasora, factores de riesgo, vacunas.

Haemophilus influenzae infections in children

Haemophilus influenzae is the causative agent for a variety of diseases, especially among children, and exacts an important human toll in terms of morbidity, mortality and health-related expenses. Infections caused by this agent can range from asymptomatic colonization of the upper respiratory tract - including superficial and localized infections - to severe systemic complications such as sepsis, meningitis or epiglottitis. Aspects of this disease reviewed include the following: (1) microbiological aspects, pathogenesis, epidemiology, (2) diagnostic procedures and treatment, (3) specific diseases caused by this agent, and (4) prevention strategies and the impact of vaccination.

Key words: *H. influenzae*, infection, invasive disease, risk factors, vaccines.

Haemophilus influenzae es un microorganismo causante de una variada gama de patologías, especialmente en la población pediátrica, en la cual representa una carga importante en morbilidad, mortalidad y gastos en salud a nivel mundial. Las infecciones por este agente cubren un gran espectro que va desde colonización asintomática del tracto respiratorio superior e infecciones superficiales y localizadas, hasta afecciones sistémicas graves como meningitis o epiglotitis (1). Su alta incidencia en algunos sectores de la población y su capacidad para

producir enfermedades graves, sumado a la posibilidad actual de tratamiento y prevención eficaz por medio de la vacunación, hacen de este agente uno de creciente importancia dentro de la práctica actual en las áreas de medicina, bacteriología y salud pública, entre otras.

El propósito de este artículo es presentar, después de una revisión actualizada de la literatura mundial, los principales aspectos microbiológicos, epidemiológicos y fisiopatológicos de la enfermedad por *H. influenzae*, y el estado del arte en los métodos de diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad por este agente, haciendo énfasis en su incidencia epidemiológica sobre la población colombiana. De igual manera, se resalta la importancia de la vacunación y su

Correspondencia:

camilogut@hotmail.com

Recibido: 23/03/01; aceptado: 06/07/01

impacto a nivel mundial y, especialmente, en Colombia.

El microorganismo fue observado por primera vez en 1882 por Robert Koch en un exudado conjuntival y lo denominó *Haemophilus aegypticus* o bacilo de Koch-Weeks. Posteriormente, fue aislado por Richard Pfeiffer en 1892 en el esputo y en el tejido pulmonar de pacientes infectados durante la pandemia de influenza ocurrida dos años antes, por lo que fue inicialmente denominado *bacillus Pfeiffer* (2). Sólo hasta la pandemia de influenza de 1918-1919 se reconoció la bacteria como parte de la flora normal del tracto respiratorio superior y no como el agente causal de la influenza, como se pensaba hasta entonces. En 1920, Winslow y sus asociados cambiaron el nombre del microorganismo a *Haemophilus influenzae*, debido a sus características especiales de cultivo, específicamente su requerimiento de factores X y V (ambos presentes en eritrocitos y liberados por lisis de esas células), lo que llevó al nombre de *Haemophilus*, que significa "amante de la sangre", e *influenzae* por su tradicional relación con la influenza (3). En 1931, Margaret Pittman definió las características de las cepas capsuladas y no capsuladas de *H. influenzae* y distinguió entre las capsuladas seis serotipos antigénicamente diferentes que denominó con letras de la "a" a la "f" (4). Además, explicó algunas características específicas del serotipo b, lo cual llevó a las primeras terapias con antisuero equino y, posteriormente, de conejo para tratar infecciones por *H. influenzae* tipo b (5,6). Hasta 1933, cuando se descubrió el agente de la influenza, se le consideró como agente causal de esta enfermedad. Desde entonces, se acepta que *H. influenzae* es un invasor secundario en esta enfermedad.

En las últimas décadas se han desarrollado otros sistemas más finos de caracterización taxonómica para los aislamientos de *H. influenzae*, entre los cuales se destaca la tipificación basada en los perfiles de movilidad electroforética de un gran número de enzimas metabólicas, la subtipificación de acuerdo con el perfil electroforético de las proteínas de membrana externa y aquéllos basados en la heterogenicidad de los lipooligosacáridos (7). La investigación en biología

molecular se ha centrado en la identificación de las proteínas de la membrana externa, P1 a P6, las cuales se estudian como variables antigénicas que podrían considerarse blanco para la elaboración de vacunas (8,9). De igual manera, se realiza la caracterización de adhesinas, proteasas y otras proteínas constitutivas (10), y la caracterización de aislamientos específicos a través de procedimientos como la electroforesis en campo pulsado (11), para determinar patrones de invasividad y respuesta antigénica del hospedero (12), y el aislamiento de *locus* genéticos a través de medios como el multiplex PCR modificado con polimerasa *AmpliTaq Gold* (13,14), que permite el análisis y modificación por disrupción génica de los productos transcripcionales, la identificación de mecanismos de resistencia antibacteriana y el desarrollo de nuevas herramientas contra este agente patógeno (15,16).

El manejo reciente de *H. influenzae* se ha centrado en la prevención, básicamente con el desarrollo de nuevas vacunas.

Microbiología

H. influenzae es un cocobacilo Gram negativo pequeño (1 x 0,3 mm), no móvil, no esporulado, que aparece filamentosos o pleomórfico en especímenes clínicos, lo cual puede dificultar en ocasiones su diagnóstico y que crece mejor en atmósfera microaerofílica. Sus colonias son usualmente granulares, transparentes o ligeramente opacas, circulares, con forma de domo y presentan un olor característico (17). Su cultivo se realiza en medios enriquecidos con eritrocitos lisados por calor (agar chocolate) o por degradación peptídica (medio de Fildes); para su desarrollo, requiere de una temperatura de 35 °C y una atmósfera de 5 a 10% de CO₂ (18). Para su crecimiento *in vitro*, necesita los factores X y V. El factor X o hemina es estable al calor, contiene protoporfirinas necesarias para el funcionamiento de citocromos en la cadena de transporte de electrones, catalasas y peroxidases. Este factor es útil para distinguir entre las especies de *Haemophilus*, ya que *H. parainfluenzae* no requiere del factor X para su crecimiento *in vitro*. El factor V es una coenzima termolábil relacionada con los nucleótidos de adenina NAD y NADP. Sus

requerimientos se pueden determinar por estos factores, utilizando discos o tiras comerciales en medios carentes de ellos, como tripticasa soya o Mueller-Hinton, y observando el patrón de crecimiento. De igual manera, se ha observado satelitismo alrededor de colonias de *Staphylococcus aureus* debido a su producción de factor V, lo que permite identificar en forma presuntiva a *H. influenzae*. Sin embargo, no es una prueba definitiva, pues la estimulación del crecimiento también se presenta por especies de *Pasteurella*, *Corynebacterium*, *Actinobacillus* y algunos *Haemophilus* no NAD dependientes. Como pruebas adicionales de diferenciación para *Haemophilus* dependientes de NAD o hemina, se evalúa su patrón de hemólisis en agar sangre de caballo o de conejo al 3%, la producción de catalasa y oxidasa, los patrones de fermentación de carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa, xilosa y manosa), la producción de ortonitrofenil galactosidasa (ONPG), la producción de sulfuros de hidrógeno y el incremento de su crecimiento en atmósfera de CO₂.

Sin embargo, la prueba de oro para la determinación del requerimiento del factor X es la prueba de la síntesis de porfirinas. Se basa en la evaluación de la presencia de porfobilinógeno sintetasa y la consecuente transformación del ácido delta-aminolevulínico (d-ALA) en porfobilinógeno, lo cual se detecta por cambios de color en el medio, utilizando los reactivos de

Kovac o de Erlich modificado, o por la producción de fluorescencia bajo luz ultravioleta (19).

Para la biotipificación, se utiliza un esquema elaborado por Kilian, basado en la utilización del indol, la urea y la ornitina, por medio de la actividad de enzimas específicas como la ureasa y la ornitina descarboxilasa. Adicionalmente, estas pruebas tienen utilidad epidemiológica, dado que el biotipo de un aislamiento individual, usualmente está relacionado con su fuente (20). Estas pruebas se utilizan para subdividir las especies en ocho biotipos diferentes (I-VIII).

Para la serotipificación (serotipos a-f), se utilizan métodos de aglutinación en placa; se realiza la reacción de Quellung, coaglutinación, inmunofluorescencia o contraímmunoelectroforesis. Las pruebas de aglutinación en látex y coaglutinación se basan en la detección del polisacárido capsular y son de mayor utilidad en muestras de líquido cefalorraquídeo y, con menor sensibilidad, en suero y orina (18).

Para evaluar la sensibilidad antimicrobiana, se estudia la producción de β -lactamasa a través de mediciones de acidimetría, yodometría o por cefalosporinas cromogénicas (cefinaasa). La detección de la enzima cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT), la sensibilidad a otros antimicrobianos por la técnica de difusión de disco en agar HTM (Kirby-Bauer) y, finalmente, la determinación de las concentraciones inhibitorias

Cuadro 1. Identificación de *Haemophilus influenzae* por el laboratorio.

Crecimiento e identificación de *Haemophilus* sp.

Siembras en agar chocolate
Coloración de Gram-tinción de naranja de acridina
Prueba de porfirinas
Utilización de factores V y X

Biotipificación de *Haemophilus influenzae*

Producción de indol
Hidrólisis de la urea
Descarboxilación de la ornitina

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Producción de β -lactamasa
Detección de la cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT)
Técnica de difusión de disco en agar HTM (Kirby-Bauer)
Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM)

Diferenciación de *Haemophilus* dependientes de NAD o hemina

Hemólisis en agar sangre de caballo o conejo al 3%
Pruebas de catalasa y oxidasa
Fermentación de carbohidratos
Prueba de ONPG
Producción de H₂S
Dependencia de CO₂ (estimulación del crecimiento)

Serotipificación de *Haemophilus influenzae*

Agglutinación
Reacción de Quellung
Coaglutinación
Inmunofluorescencia
Contraímmunoelectroforesis

mínimas (CIM) por microdilución en caldo o en agar o por la prueba de epsilon (E-test), confirman la categoría de la resistencia (19) (cuadro 1).

Varias estructuras de la superficie del microorganismo son fundamentales en los procesos de patogenicidad. La cápsula de polisacáridos que recubre a *H. influenzae* tipo b consta de repeticiones de polímeros de ribosilribitolfosfato (PRP) (21). Este hecho es de gran importancia, debido a que casi el 95% de las infecciones invasoras (meningitis, bacteremia) son causadas por el tipo b (22-24). Los otros serotipos capsulares están compuestos principalmente por hexosas y sólo ocasionalmente causan enfermedad invasora. Las cepas no capsuladas causan, de manera frecuente, infecciones del tracto respiratorio y estructuras adyacentes, pero casi nunca llevan a infecciones sistémicas. Las endotoxinas (lipooligosacárido) y algunas proteínas como adhesinas, IgA proteasas, hemolina y otras que forman filamentos (fimbrias o pili), constituyen factores importantes en la adhesión, patogenicidad y viabilidad del microorganismo (25,26). De igual manera, las proteínas de membrana externa (OMP) cumplen funciones que aún no han sido bien determinadas del todo, pero que son fundamentales en estos procesos (27).

Patogenia

Con base en el biotipo y en el serotipo, se han determinado diferentes manifestaciones clínicas y patológicas de la infección por *H. influenzae*. El biotipo I se aísla con mayor frecuencia en los pacientes con meningitis, siendo *H. influenzae* tipo b parte de este biotipo. Se ha encontrado usualmente mayor resistencia bacteriana en los biotipos I y II. En las vías urinarias se aíslan generalmente los biotipos II, III y IV. El biotipo IV es más común en infecciones neonatales y maternas (28).

Las infecciones asintomáticas y de las mucosas son las más comunes, ocasionadas, en su mayoría, por cepas no capsuladas que se encuentran en las vías respiratorias superiores en 50 a 80% de los portadores jóvenes y niños en edad preescolar. Sus principales manifestaciones se producen por extensión desde el tracto respiratorio, facilitadas por alteraciones en el hospedero debido

a la presencia de reflujo en la trompa de Eustaquio, cuerpos extraños, alteraciones del epitelio en fumadores, antecedentes de infecciones virales o alteraciones inmunológicas puntuales, como las exacerbaciones de bronquitis crónica, otitis media, sinusitis y conjuntivitis, en tanto que la bacteremia es rara. Otros serotipos como el a, c y f se encuentran hasta en un 2% de los portadores y muy raramente se asocian con patologías (28).

Las infecciones invasoras se caracterizan por la diseminación hematogena del microorganismo y son ocasionadas, por lo general, por cepas capsuladas, principalmente tipo b, que se encuentran en 3 a 5% de los portadores y generalmente causan meningitis (hasta en 50% de los casos de enfermedad invasora) (10,11,29), epiglotitis, neumonía, empiema, artritis séptica, celulitis, osteomielitis, pericarditis y bacteremia. De manera menos usual, causan glositis, tendosinovitis, peritonitis, endocarditis y ventriculitis. Es fundamental resaltar que esta clasificación no es excluyente y que se han reconocido cepas de serotipo b causantes de otitis media o sinusitis (30). Algunas cepas no capsuladas son causa poco común de sepsis neonatal (31) y hasta de un 50 % de los casos de meningitis por *H. influenzae* en edades mayores, especialmente en inmunosuprimidos o personas con defectos anatómicos, trauma encefálico o antecedentes de procedimientos neuroquirúrgicos. Algunas cepas no tipificables son causa común de infecciones invasoras del tracto respiratorio inferior en niños con malas condiciones socioeconómicas (32) y también de bacteremia en adultos (33).

Epidemiología

Los humanos son los únicos reservorios de *H. influenzae*. La bacteria se encuentra comúnmente en la faringe y, en menor grado, coloniza las mucosas de la conjuntiva y del tracto genital. La transmisión de persona a persona se produce por vía aérea o por contacto directo con secreciones respiratorias contaminadas; existe alguna evidencia de la transmisión por fómites (34). Algunos estudios han encontrado que hasta 80% de la población es portadora de *H. influenzae*, especialmente niños sanos que asisten a guarderías, la mayoría de

ellos asintomáticos y portadores de cepas no capsuladas, las que, generalmente, cumplen varios ciclos de transmisión antes de generar la enfermedad en un hospedero susceptible, por lo que es difícil determinar con exactitud los periodos de incubación y el patrón de enfermedad durante epidemias (35). La enfermedad invasora por *H. influenzae* tipo b ocurre de manera endémica y entre 85 y 95% de los casos se presentan en niños menores de 5 años (36-38).

Los estudios de vigilancia epidemiológica llevados a cabo por el CDC de Atlanta, a través del *National Haemophilus influenzae (Hi) Surveillance Program*, estimaron la incidencia de la enfermedad invasora por *H. influenzae* tipo b en los Estados Unidos en menores de 4 años en 1,8/100.000 en 1994 y 1,6/100.000 en 1995, es decir, aproximadamente 8.000 casos por año (39). Al comparar las incidencias anteriores a la introducción de la vacunación en 1985, que arrojaban datos entre 12.000 y 25.000 casos anuales, se evidencia una reducción muy importante (40,41). En 1996 y 1997, se informaron únicamente 144 casos confirmados de enfermedad invasora por *H. influenzae* tipo b (42). En diversos estudios se ha observado un patrón de enfermedad estacional con un pico entre septiembre y diciembre y otro en marzo y mayo. La razón de estos picos se desconoce, pero se plantea la relación con los nacimientos y el ingreso al colegio de hermanos mayores, quienes introducen el microorganismo en el hogar (43).

En Colombia, las infecciones invasoras del tracto respiratorio inferior y la meningitis constituyen las principales causas de muerte y de hospitalización en menores de 5 años y se estima que *H. influenzae* puede ser responsable de 39% de esas muertes y hasta de 30% de los casos incidentes (44). Se ha calculado aproximadamente un número de 8.692 casos anuales de enfermedad del tracto respiratorio inferior o meningitis en menores de 5 años, de los cuales mueren 4.121 (45).

Desde 1994, el Grupo de Microbiología del Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud, en colaboración con 17 Laboratorios de Salud Pública de diferentes departamentos, estableció el programa de vigilancia de meningitis bacteriana aguda con el

fin de mejorar la calidad del diagnóstico y conocer la frecuencia de aislamiento de los principales agentes etiológicos, sus serotipos y el patrón de susceptibilidad. En 1995, se lograron recolectar 130 aislamientos de 11 ciudades o departamentos, de los cuales los de *H. influenzae* representaban el 45%, seguidos de *Neisseria meningitidis* (27%). En menores de 5 años fue el más frecuente (60%), seguido de *Streptococcus pneumoniae* (20%) y *Neisseria meningitidis* (17%) (46,47).

Del total de aislamientos de LCR obtenidos en 1996 (n=248), provenientes de 13 de los 17 Laboratorios de Salud Pública, 110 (44,4%) fueron *H. influenzae* serotipo b, de los cuales, 88,2% fueron recuperados en niños menores de 5 años. Los Laboratorios de Salud Pública Departamentales informaron haber procesado 4.548 muestras de LCR, de las cuales 329 (7,2%) tuvieron un aislamiento y, de éstos, 100 (30,4%) correspondían a *H. influenzae* (48).

En 1997, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud (SIVIGILA), denominado entonces Sistema Alerta Acción, informó 334 casos de meningitis por *H. influenzae*. Se estimó la tasa de incidencia para ese año en 32,6/100.000 niños menores de 5 años (49). De igual manera, en 1998 se informaron 306 casos, principalmente en las regiones de la Costa Atlántica (51 casos) y la región Centro Oriente (100 casos). Antioquia, Bogotá, Valle y Cesar fueron las regiones de mayor notificación con 72 (23,5%), 59 (19,2%), 39 (21,7%) y 21 casos (6,8%), respectivamente (50). En 1999, el SIVIGILA informó 159 casos, provenientes de: Antioquia, 33 casos (20,7%); Santander, 30 casos (18,8%); Bogotá, 17 casos (10,6%) y Cartagena, 12 casos (7,5%) (51). Finalmente, en el 2000 se informaron 119 casos de meningitis por este agente; fueron Antioquia, Cundinamarca, Sucre y Bogotá las regiones de mayor notificación con 29 (24,3%), 18 (15,1%), 10 (8,4%) y 9 casos (7,5%), respectivamente (52). Hasta el 13 de enero de 2001 (segunda semana epidemiológica), únicamente Meta y Boyacá han informado dos casos de meningitis por *H. influenzae* (53).

En el Primer Congreso Mundial de Infectología Pediátrica realizado en México en 1996, se

evaluaron los informes locales de etiología de meningitis en menores de 5 años y se encontró que en Cartagena la tasa de incidencia fue de 41/100.000 entre 1991 y 1993; en Bogotá, de 48/100.000 entre 1988 y 1996, y según los datos del Ministerio de Salud, la tasa en Colombia fue de 46/100.000 en 1995 (54).

Desde agosto de 1999, el Instituto Nacional de Salud, con la participación del Ministerio de Salud, la OPS y las Secretarías de Salud y hospitales de cuatro ciudades del país, está desarrollando un estudio multicéntrico de casos y controles para evaluar la efectividad de la vacuna anti-*H. influenzae* serotipo b en neumonías bacterianas. Hasta el 11 de junio de 2000, se habían identificado 237 casos y 432 controles, en los que el análisis preliminar indica que los factores de riesgo asociados con la ocurrencia de neumonía bacteriana son la presencia de una enfermedad de base y el antecedente de hospitalización previa por enfermedad respiratoria, el hacinamiento en la vivienda, la asistencia a hogares comunitarios, el vivir en inquilinatos o tugurios y peso al nacer menor de 2.500 g (55).

La relevancia de este microorganismo en la salud pública de nuestro país y del mundo es evidente y subraya la necesidad de generar programas de vigilancia epidemiológica para la evaluación de las enfermedades producidas por este agente y el impacto de las medidas de prevención y control que se implementen.

Inmunidad

La enfermedad por *H. influenzae* requiere de ciertas condiciones para su generación. El hospedero debe pasar por una serie de etapas. Inicialmente, debe estar expuesto al microorganismo y presentar la colonización de las membranas mucosas del tracto respiratorio superior. Como se mencionó anteriormente, hay un porcentaje importante de portadores asintomáticos. Se ha planteado que el tamaño del inóculo y una infección viral concomitante pueden ser factores que predisponen a esta enfermedad invasora (56). Apparently, los microorganismos ingresan al torrente sanguíneo al destruir las uniones estrechas entre las células de la mucosa respiratoria. La dinámica entre la proliferación

bacteriana, los anticuerpos, el complemento y el sistema retículoendotelial determinan la severidad de la bacteremia (57,58). A medida que progresa la infección y aumenta la bacteremia, se presentan siembras metastásicas en las membranas serosas (meninges, pleura, pericardio), pulmón o líquido sinovial (59).

Se ha estudiado cuidadosamente la susceptibilidad de adquirir el microorganismo y se ha descrito que la sangre de niños entre 3 meses y 3 años de edad carece de actividad bactericida contra el serotipo b, mientras que la mayoría de los neonatos, niños mayores y adultos la presentan (60). Alexander y colaboradores propusieron que el polisacárido capsular de polímeros de ribitol (PRP) tiene actividad antifagocítica intrínseca y que su fagocitosis debía ser promovida por la opsonización con anticuerpos específicos. Establecieron, entonces, que el mecanismo de anticuerpos contra PRP es un determinante mayor en la generación de la inmunidad protectora (61,62). Estos anticuerpos séricos activan la propiedad bactericida del complemento, la opsonización *in vitro* y median la inmunidad protectora contra la infección invasora en humanos (63).

En el momento de la infección, los niveles de anticuerpos contra PRP son muy bajos o están ausentes. En la convalecencia permanecen bajos, especialmente en los menores de 15 meses. Esto se debe a la demora natural en la generación de la respuesta inmune ante polisacáridos y otros antígenos no dependientes de células T (64). La concentración sérica mínima de anticuerpos contra PRP asociado con la protección contra *H. influenzae* tipo b, se ha calculado en un rango entre 0,04 y 1,00 mg/ml (65). Sin embargo, estos valores deben ser analizados críticamente, ya que existen variaciones importantes en los diferentes tipos de anticuerpos contra PRP y la afinidad por ellos.

Desde el punto de vista genético, se ha encontrado relación entre los fenotipos del grupo sanguíneo y el antígeno leucocitario humano (HLA) en pacientes susceptibles a la enfermedad invasora. Se ha determinado un fenotipo de baja respuesta, asociado con la ausencia del halotipo G2m(n). Es interesante anotar que éste se presenta en las

poblaciones negra e hispana, las cuales presentan tasas de ataque mayores que la población blanca (66).

El papel de los factores de inmunidad local en las mucosas es poco comprendido. Se plantea, de manera especulativa, la posibilidad de anticuerpos secretores que podrían alterar la adhesión del microorganismo a las células. Por el contrario, la evidencia parece mostrar que los anticuerpos IgA pueden aumentar la susceptibilidad al bloquear la actividad de otros anticuerpos (67).

Factores de riesgo

El riesgo de desarrollar enfermedad por *H. influenzae* está determinado por factores tanto del microorganismo como del hospedero y del medio ambiente. Los factores del microorganismo son la infectividad, la capacidad de adhesión a las células del tracto respiratorio y la virulencia, como ya se mencionó.

Entre los factores del hospedero, podemos encontrar que usualmente el riesgo es mayor en las edades de 6 a 12 meses. La enfermedad invasora es poco común en menores de 6 meses debido, presumiblemente, a la reducida exposición, a los factores protectores maternos transplacentarios o a la lactancia. Cada tipo de enfermedad invasora tiene patrones de edad determinada; la edad en la que más comúnmente se presenta la meningitis es entre los 6 y los 9 meses y declina marcadamente después de los dos años (68,69). Las celulitis son más comunes durante el primer año de vida, mientras que las epiglottitis lo son después del segundo año de vida (70).

Aunque la mayoría de los estudios indica una similitud entre los diferentes sexos, algunos estudios indican una posible incidencia de 1,2 a 1,5 veces mayor en niños que en niñas (71).

La población negra se ve afectada por enfermedad invasora y meningitis causada por *H. influenzae* tipo b entre 2 y 4 veces más que la blanca (72,73). Estas diferencias se plantean en torno a factores genéticos, como se mencionaba anteriormente. Los niños con enfermedades subyacentes como anemia de células falciformes, inmunodeficiencias primarias o adquiridas del complemento,

neoplasias o esplenectomía, tienen mayor riesgo de presentar enfermedad invasora (74-76). Aún está en duda, aunque existe alguna evidencia experimental, que las infecciones previas o concomitantes con agentes virales puedan aumentar la susceptibilidad a la infección por *H. influenzae*, debido a las alteraciones que ocasionan en el epitelio respiratorio, las cuales pueden favorecer los mecanismos de adhesión y penetración de la bacteria (62).

Se ha planteado como factor protector la lactancia materna en niños menores de 6 meses, presumiblemente por el paso de factores nutricionales maternos; en las madres lactantes se han identificado anticuerpos contra la cápsula polisacáridica de *H. influenzae* tipo b, que persisten entre uno y seis meses después del inicio de la lactancia. Inclusive en madres inmunizadas durante el embarazo, se encuentran títulos de anticuerpos hasta 20 veces mayores contra la cápsula del microorganismo (77,78).

Con respecto al medio ambiente, se consideran factores de riesgo el hecho de asistir a guarderías y factores sociodemográficos como el bajo estrato socioeconómico, el bajo nivel de educación de los padres, la sobrepoblación en la vivienda, los fumadores en la familia y el tener hermanos mayores en centros educativos (79-81).

Diagnóstico

Al igual que la mayoría de las entidades patógenas, la historia clínica y el examen físico son pilares de un diagnóstico adecuado. El criterio primario, sin embargo, es el aislamiento y la confirmación microbiológica del microorganismo. Los hemocultivos, los cultivos de LCR y de otros fluidos normalmente estériles (sinovia, líquido pleural, pericárdico) son mandatorios en circunstancias adecuadas, incluso a pesar de haberse iniciado el manejo antimicrobiano. La tinción de Gram es una coloración rápida y económica y puede ser útil en algunos especímenes, especialmente de líquido cefalorraquídeo, según un estudio realizado por Estrada *et al.* (82), el cual arrojó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,4%. Está descrito que la coloración de Gram detecta alrededor del 85% de *H. influenzae* en LCR y la sensibilidad depende específicamente de la

centrifugación previa y del número de microorganismos existentes, esto es, si se realiza en laboratorios de referencia especializados y por personal altamente capacitado y con experiencia. Por ello, no debe considerarse tan sensible ni tan específica, en general. La tinción fluorescente con naranja de acridina y la inmunofluorescencia, aunque sean utilizadas de manera poco frecuente, son de utilidad en algunos casos, especialmente con muestras escasas y con mínima concentración bacteriana (83). La reacción de Quellung es otro método utilizado para su identificación; consiste en la demostración mediante microscopía de la cápsula, secundaria a la interacción con anticuerpos específicos contra antígenos capsulares. Como se mencionó anteriormente, los requerimientos para el cultivo de *H. influenzae* son exigentes y las muestras deben ser procesadas inmediatamente en los medios suplementados con los factores V y X.

Otras técnicas disponibles y de gran utilidad incluyen la detección de antígenos capsulares por técnicas de aglutinación de látex, coaglutinación e inmunoelectroforesis de contracorriente (CIE), en ese orden de sensibilidad. En diversos estudios, la aglutinación de látex ha demostrado sensibilidades muy elevadas (casi del 100%), independientemente del fluido corporal estudiado, mientras que la coaglutinación presenta una sensibilidad de 86% en muestras de LCR, pero disminuye hasta 27% en otras como orina y suero. De la misma manera, la CIE presenta una sensibilidad de 91% en LCR, pero disminuye a 40% en orina y suero (84-86). Sin embargo, se pueden presentar falsos positivos en casos de reacciones cruzadas con otros organismos, especialmente *Streptococcus pneumoniae*, con el factor reumatoideo o en sujetos inmunizados recientemente con vacunas conjugadas contra *H. influenzae* tipo b. También se presentan falsos negativos por exceso de antígenos de PRP (efecto prozona) y deficiencias en el proceso de centrifugación de las muestras (87).

Enfermedades específicas

En datos obtenidos por Peltola (88), de 3.931 pacientes incluidos en 21 estudios desarrollados en diferentes regiones del mundo entre las décadas de 1970 y 1990, se encontró que más

del 90% de las enfermedades invasoras por *H. influenzae* tipo b se manifestaban como seis entidades clásicas: meningitis (52%), neumonía (12%), epiglotitis (10%), septicemia (8%), celulitis (5%) y enfermedades osteoarticulares (4%), siendo la artritis séptica más común que la osteomielitis. Otras manifestaciones clínicas comprendían el 3% del número total y las enfermedades multifocales, el 6% restante.

Meningitis: es la complicación más severa de la infección invasora por *H. influenzae*, siendo el serotipo b invariablemente el responsable. Usualmente hay un cuadro prodrómico de infección de vías respiratorias superiores que dura unos pocos días e, incluso, es común encontrar casos de otitis media, seguido por un período de franco deterioro. En algunos casos, la evolución de la enfermedad es fulminante y ocasiona la muerte en pocas horas, usualmente en menores de un año. Al igual que la mayoría de las meningitis, los síntomas neurológicos y la fiebre son las principales manifestaciones clínicas, aunque los pacientes menores suelen presentar menos síntomas específicos y usualmente la rigidez nuchal está ausente. Otras manifestaciones más severas como las convulsiones o el coma se presentan con la evolución de la enfermedad. Por lo general, la sintomatología es indistinguible de otras meningitis de etiología bacteriana. La infección en neonatos es rara, pero puede ser similar a la ocasionada por *Streptococcus* del grupo B.

La complicación más común es la efusión subdural, debido a la poca edad de los pacientes (menores de 5 años, usualmente). En niños menores, la falta de respuesta al tratamiento antimicrobiano, signos de hipertensión endocraneana (fontanela abombada, papiledema), los signos neurológicos focales (indicativos del compromiso de pares craneanos) y los cambios en el estado mental deben aumentar la sospecha clínica. A pesar del diagnóstico y tratamiento adecuados, alrededor del 5% de los pacientes fallece (36). Las secuelas neurológicas se presentan hasta en un 30% de los sobrevivientes e incluyen retardo mental, pérdida de la audición (bilateral hasta un 18%), alteraciones del crecimiento y aprendizaje, trastornos motores y síndromes convulsivos (89-91).

Neumonía: la frecuencia de neumonías primarias por *H. influenzae* tipo b en niños en los países desarrollados se desconoce y es difícil de estimar, pero se considera menor a 2% de todas las neumonías en niños (92). En los países subdesarrollados, sin embargo, hasta una tercera parte de las infecciones respiratorias bajas son causadas por cepas de *H. influenzae* no tipificable y son una importante causa de morbimortalidad (93,94). Sin embargo, su frecuencia parece haber disminuido comparada con la de décadas pasadas, probablemente debido al uso más racional y de mejores antimicrobianos. La sintomatología de las neumonías causadas por *H. influenzae* tipo b es similar a la causada por otras etiologías, aunque su inicio es más insidioso y se caracteriza por aparecer, hasta en un 43%, junto con otro foco de infección, ya sea del tracto respiratorio superior -otitis, epiglotitis- o incluso meningitis. La complicación más importante, aunque rara, es la pericarditis, caracterizada por disnea severa, taquicardia y evidencia de colapso cardiovascular. De igual manera, se pueden presentar bacteremia y empiema. Usualmente, por radiología se observan, en orden de frecuencia, patrones segmentarios, lobares, bronconeumónicos e intersticiales. La efusión pleural se presenta en más de la mitad de los pacientes, cuyo cultivo es positivo hasta en un 75%. Las neumonías causadas por cepas no tipificables son también difícilmente distinguibles de las causadas por otros agentes patógenos, especialmente en pacientes con enfermedades pulmonares subyacentes tales como bronquitis crónica, infecciones virales previas, fibrosis quística e hipogammaglobulinemia (95).

Epiglotitis: es una enfermedad letal con un inicio característicamente fulminante. Los pacientes, usualmente niños entre dos y tres años de edad, presentan un cuadro de infección respiratoria superior, disnea y fiebre, que rápidamente progresa a disfagia y acumulación de secreciones orales. El niño adopta una posición característica, sentado y con hiperextensión del cuello (96). El deterioro se presenta en ausencia de manejo adecuado y lleva a la muerte en pocas horas.

Otros cuadros pueden presentarse de forma subaguda, con un cuadro prodrómico de horas a

días antes del inicio de los síntomas agudos. El examen laríngeo debe realizarse en un lugar adecuado donde se pueda hacer una intubación de urgencia debido al riesgo inminente de espasmo laríngeo.

Celulitis: se observa predominantemente en niños pequeños y en menores de dos años. Se presenta usualmente en la cara (especialmente en región periorbital o geniana) o el cuello. Se manifiesta con edema, eritema, dolor que progresa en pocas horas acompañado, en la mayoría de los casos, de un foco subyacente de infección o de bacteremia, por lo que es importante instaurar un manejo antimicrobiano rápidamente (95).

Artritis séptica: *H. influenzae* es la causa más común de artritis séptica en menores de dos años. Típicamente, involucra articulaciones mayores sin generar osteomielitis. Se presenta con dolor, edema y disminución de la movilidad. Los hemocultivos y cultivos de sinovia son usualmente positivos. También puede presentarse de manera más sutil, con cuadros febriles prolongados e irritabilidad, especialmente asociados con meningitis (hasta en un 30%), caso en el cual es común encontrar cultivos negativos de líquido sinovial con antígenos positivos (58).

Tratamiento

Debido a las características de la infección invasora por *H. influenzae*, es importante iniciar un manejo antimicrobiano adecuado que penetre la barrera hematoencefálica, asegure concentraciones elevadas en LCR y tenga una duración prolongada para esterilizar los focos primarios y posibles focos secundarios.

La resistencia a cloranfenicol, ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y cefalosporinas de segunda generación, se ha convertido en un problema en muchas áreas del mundo. La resistencia se da, básicamente, por producción de β -lactamasa tipo TEM-1, mediada por plásmidos (97), aunque otros mecanismos se presentan en el 0,1% de cepas resistentes (98).

Tradicionalmente, se utilizó la ampicilina a dosis de 200-300 mg/kg/día, IV cada 6 horas, pero debido a que hasta 50% de las cepas de *H. influenzae* tipo b aisladas en Estados Unidos son resistentes,

su uso debe ir acompañado de otro agente cuando se utiliza como terapia empírica contra la enfermedad invasora hasta comprobar la producción o no de β -lactamasa. La duración del tratamiento depende del sitio de la infección y de la respuesta clínica al mismo, pero usualmente no es menor de 10 días. El cloranfenicol tuvo excelentes resultados en las infecciones severas y fue tradicionalmente la droga de elección junto a la ampicilina; su dosificación es de 75 a 100 mg/kg/día IV cada 6 horas y continúa siendo un antimicrobiano de segunda elección. Su resistencia se ha presentado en regiones aisladas del globo y ha llegado en algunos casos hasta 50% (58). No hay que olvidar los efectos secundarios sobre la médula ósea, especialmente en neonatos o pacientes con alteraciones hepáticas, los cuales son reversibles y dependen de la dosis.

En Colombia, según un estudio con datos desde 1994 en el que se analizaron 88 aislamientos de *H. influenzae* causante de meningitis aguda, se encontró que 9,1% era resistente a trimetoprim-sulfametoxazol, 3,4% a cloranfenicol y 2,3% eran betalactamasa positivos (99). En otro estudio realizado por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, se evaluaron 264 aislamientos de LCR y hemocultivos, recibidos entre 1994 y 1997. Se estableció que 10% de los aislamientos de LCR y 28% de los de hemocultivo presentaban sensibilidad disminuida a la ampicilina, con resistencia franca en 6 y 18%, respectivamente. Se determinó que el 6,5% de los aislamientos de LCR y el 22% de los de hemocultivos eran productores de β -lactamasa. Con respecto al cloranfenicol, 5,8% de aislamientos en LCR y 15% de hemocultivos presentaban sensibilidad disminuida, mientras que 5,3 y 15,1%, respectivamente, presentaron franca resistencia. En relación con el TMP-SMX, 12% de los aislamientos de LCR y 87% de los hemocultivos presentaron sensibilidad disminuida. Solo 1% de los aislamientos presentó sensibilidad intermedia a la cefuroxima y todos fueron sensibles a la ceftriaxona. En términos generales, los aislamientos de neumonía presentaron mayor resistencia que los de meningitis (100).

Actualmente, la recomendación es el uso de cefalosporinas de tercera generación como terapia

inicial en el manejo de la enfermedad invasora, especialmente meningitis, hasta que la susceptibilidad del microorganismo se determine. Se utilizan cefalosporinas que penetren adecuadamente en el LCR, como cefotaxima 200 mg/kg/día cada 6 horas o ceftriaxona 75-100 mg/kg una o dos veces al día (101). Sin embargo, aunque *in vitro* sean más efectivas, *in vivo* tardan más en esterilizar el LCR y no mejoran las tasas de fatalidad (102,103). La cefuroxima no se utiliza en el tratamiento de meningitis por *H. influenzae* tipo b, ya que tarda hasta el doble de tiempo que los otros agentes en esterilizar el LCR (104). Independientemente del manejo, el tratamiento debe prolongarse hasta que el paciente esté afebril y sin signos clínicos o de laboratorio durante 3 a 5 días. La duración usual de la terapia es de 7 a 10 días. Los pacientes con endoftalmítis, endocarditis, pericarditis u osteomielitis requieren hasta de 3 a 6 semanas de manejo antimicrobiano (58).

Varios estudios han mostrado que, en algunas meningitis, especialmente aquellas causadas por organismos encapsulados, el uso adjunto de dexametasona a dosis de 0,6 mg/kg cada 6 horas durante 4 días, desde antes de la primera dosis de antimicrobiano, modera la cascada de la inflamación y disminuye el riesgo de la pérdida de la audición (105).

El manejo antimicrobiano es sólo uno de los pilares del tratamiento y deben establecerse medidas adecuadas de soporte tanto hidro-electrolítico como ventilatorio y nutricional para estos pacientes, incluidas las precauciones de aislamiento respiratorio, incluso 24 horas después de haber iniciado el manejo antimicrobiano.

El uso de rifampicina a 20 mg/kg/día durante 4 días (dosis máxima, 600 mg) en niños y contactos, se utiliza como profilaxis ya que erradica hasta en 95% *H. influenzae* tipo b en los portadores, el cual no logra ser erradicado por el tratamiento sistémico. Algunos datos parecen demostrar que esta profilaxis reduce la incidencia de la enfermedad invasora secundaria. El CDC de Atlanta para todos los contactos intradomiciliarios recomienda la profilaxis, excepto las mujeres embarazadas, sin importar la edad, si han estado en contacto con un niño menor de 4 años que no esté inmunizado o que se encuentre parcialmente inmunizado, así

como para todos los miembros domiciliarios de un niño menor de 12 meses, incluso si las primeras dosis de la vacuna se han aplicado, y para todos los miembros domiciliarios de un niño inmunocomprometido sin importar su estado vacunal contra *H. influenzae*. Los niños de guardería o preescolar, sin importar la edad, si se han presentado dos o más casos de enfermedad invasora en los 60 días anteriores también deben recibir profilaxis. El caso índice también debe recibir quimioprofilaxis si fue tratado con antimicrobianos diferentes a ceftriaxona o cefotaxime, la cual usualmente se administra antes de su salida del hospital (106) (cuadro 2).

Vacunas contra *Haemophilus Influenzae* tipo b

Las primeras vacunas disponibles para la prevención de *H. influenzae* tipo b fueron desarrolladas a partir de la purificación de polisacáridos PRP y autorizadas en Estados Unidos en abril de 1985 (b-CAPSA®, Hib-VAX®, Hib-IMUNE®); éstas ya no se encuentran en el mercado (107). La respuesta inmunogénica ante estas vacunas era directamente proporcional a la edad, siendo los niños menores seroconvertidores erráticos y, frecuentemente, con bajos niveles séricos (108). No se establecieron efectos

secundarios mayores con este tipo de vacunas, excepto algunos informes aislados de casos de enfermedad por *H. influenzae* tipo b una semana después de la vacunación (109). Posteriormente, se han desarrollado múltiples vacunas basadas en conjugados proteicos de PRP, los cuales utilizan los principios de presentación antigénica mediada por haptenos definida por Ladsteiner en 1924 (110), es decir, una proteína inmunogénica transportadora que es reconocida por células T y macrófagos, la cual estimula la inmunidad dependiente de estas células. La proteína es covalentemente conjugada a los polisacáridos de PRP, que, de por sí, confieren respuesta inmunológica (111). Las diferentes marcas comerciales emplean el mismo hapteno (PRP), pero difieren en el tamaño de los polisacáridos, el transportador proteico y el tipo de conjugación, así como en su respuesta inmunogénica (112).

En 1987, se lanzó al mercado una nueva vacuna, esta vez conjugada con toxoide diftérico (vacuna PRP-D, ProHIBiT®) (113). Posteriormente, se desarrollaron vacunas conjugadas de oligosacáridos de *H. influenzae* tipo b (HbOC), en diciembre de 1988 y 1989 (HibTITER®), constituidas por pequeños segmentos de oligosacáridos unidos a

Cuadro 2. Indicaciones para la profilaxis con rifampicina a los contactos y casos índices de enfermedad por *Haemophilus influenzae* tipo b *

Quimioprofilaxis no recomendada

Ocupantes domiciliarios sin niños menores de 4 años, diferentes al caso índice.

Ocupantes domiciliarios cuando todos los contactos menores de 4-8 meses de edad han completado su esquema de vacunación contra *H. influenzae*.

Niños en guarderías y preescolar contactos de un caso índice, especialmente aquéllos mayores de 2 años de edad.

Mujeres en estado de embarazo

Quimioprofilaxis recomendada

Todos los contactos intradomiciliarios, excepto mujeres embarazadas, sin importar la edad, si han estado en contacto, con, por lo menos, un niño menor de 4 años que no esté inmunizado o que se encuentre parcialmente inmunizado.

Todos los miembros domiciliarios con un niño menor de 12 meses, incluso si las primeras dosis de la vacuna se han aplicado.

Todos los miembros domiciliarios de un niño inmunocomprometido sin importar su estado vacunal contra *H. influenzae*. Niños de guardería o preescolar, sin importar la edad, si se han presentado 2 o más casos de enfermedad invasora en los 60 días anteriores.

El caso índice también debe recibir quimioprofilaxis si fue tratado con antimicrobianos diferentes a ceftriaxona o cefotaxime, usualmente administrada antes de su salida del hospital.

* Modificado de: *Haemophilus influenzae infections*. En: Committee of Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics. Red Book 2000. 25th edition. Chicago, IL: American Academy of Pediatrics; 2000.

una proteína transportadora CRM₁₉₇ (114). Esta se asoció con la vacuna DTP y salió al mercado en marzo de 1993 (TETRAMUNE®), ya que se evidenció una mayor respuesta antigénica en pacientes vacunados anteriormente con DTP. También se desarrollaron vacunas conjugadas fabricadas a partir de la unión del PRP con proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, (PRP-OMP), y se utilizó timerozal, un derivado de etilmercurio, como preservativo y estabilizador. Su respuesta inmunológica era más favorable, siendo menos edad-dependiente, y con una sola dosis se generaban anticuerpos elevados (PedvaxHib®) (115). Para esta época, se lanzó al mercado la PRP-T, una de las primeras vacunas desarrolladas en el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (ActHIB®, OmniHIB®), la cual se basaba en la conjugación de los polímeros de polisacáridos con un transportador de toxoide tetánico.

Desde 1996, se han asociado otras vacunas dentro de la misma presentación, creando así vacunas

trivalentes (TriHIBit®, Comvax®) y pentavalentes (Pentact-Hib®, POLIACEL®), con el objeto de disminuir el número de inyecciones necesarias para vacunar a los menores, manteniendo e incluso, incrementando su inmunogenicidad (cuadro 3).

Debido a la declinación de los niveles de anticuerpos que sobreviene con el tiempo, se recomienda una dosis de refuerzo entre los 12 y 15 meses de edad. Aún no es claro si una sola dosis de refuerzo es suficiente para generar inmunidad de por vida.

No hay contraindicaciones específicas con relación a las vacunas conjugadas contra *H. influenzae* tipo b. Las contraindicaciones generales aplicadas a todas las vacunas son las mismas; pueden ser administradas a individuos inmuno-comprometidos, aunque la inmunogenicidad en estos grupos puede ser menor (116).

El 14 de julio de 2000, en las reuniones entre la *American Academy of Family Physicians*, la

Cuadro 3. Diferentes vacunas desarrolladas contra *Haemophilus influenzae*, tipo b. +

Nombre vacuna	Nombre comercial ®	Casa farmacéutica	Fecha	Componentes
PRP	b-CAPSA 1* Hib-VAX * Hib-IMUNE*	Praxis Connaught Lederle	1985	Polisacáridos de PRP purificados
PRP-D	Pro-HIBit	Connaught	1987-1989	Polisacáridos de PRP conjugados con toxoide diftérico
HbOC	HibTITER	Lederle/Praxis	1988-1990	Oligosacáridos de <i>H. influenzae</i> + transportador CRM ₁₉₇
HbOC-DTP	TETRAMUNE	Lederle/Praxis	1993	Hb OC asociada a DTP
PRP-OMP	PedvaxHIB	Merck & Co.	1989-1990	PRP + proteínas de membrana externa de <i>Neisseria meningitidis</i> , serogrupo B.
PRP-T	ActHIB OmniHIB	Pasteur Merieux Smith Kline B.	1993	Conjugado de proteínas de PRP conjugadas con toxoide tetánico
DTaP-PRP-T	TriHIBit	Connaught Merieux	1996	PRP-T conjugada con vacuna acelular de <i>Pertussis</i> y toxoide tetánico
PRP-OMP-HepB	Comvax	Merck & Co.	1996	PRP-OMP conjugada con vacuna de hepatitis B recombinante
DTP-IPV-PRP-T	Pentact – Hib	Aventis	1996	Difteria + <i>Pertussis</i> , células completas + poliovirus inactivado + liofilizado de PRP-T
DTaP-IPV-PRP-T	POLIACEL	Aventis	1997	Difteria + <i>Pertussis</i> acelular + poliovirus inactivado + liofilizado de PRP-T

* No disponibles actualmente

+ Modificado de: Ward J, Zangwill K. *Haemophilus influenzae* vaccines. En: Plotkin SA, Orenstein WA, editores. Vaccines. Third Edition. Philadelphia: WB Saunders Company; 1999. p.196.

American Academy of Pediatrics, el *Advisory Committee on Immunization Practices* y el *U.S. Public Health Service* y en respuesta a la preocupación por la exposición a mercurio, se determinó la eliminación del uso de timerozal como componente de las vacunas. Desde principios de julio de 2000, solamente vacunas contra *H. influenzae* tipo b libres de timerozal se producen en los Estados Unidos, aunque aún se continúan distribuyendo viales previamente fabricados(117).

El *Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP) recomienda con relación al esquema de inmunización infantil para el período 2000-2001, la vacunación con PRP-T, HbOC o HbOC-DTP contra *H. influenzae* tipo b, con dosis a los 2, 4 y 6 meses y con un refuerzo entre los 12 y 15 meses; para la vacuna PRP-OMP, dosis a los 2 y 4 meses, con refuerzo entre los 12 y 15 meses.

El futuro en este campo se centra en el desarrollo de nuevas vacunas polivalentes que contengan alternativas antigénicas promotoras de protección adicional contra infecciones por *H. influenzae* tipo b y, más importante aún, que generen inmunidad contra cepas no tipificables y, de igual manera, faciliten los esquemas de vacunación y disminuyan las molestias del paciente pediátrico.

Impacto

La introducción de la vacuna conjugada contra *H. influenzae* tipo b en países industrializados ha llevado a la desaparición casi total de las infecciones invasoras por este microorganismo (118). Según estudios del CDC de Atlanta, la incidencia de enfermedad invasora en menores de 4 años en Estados Unidos ha disminuido 98% desde el licenciamiento inicial de la vacuna en 1989 (119). A pesar de que el cubrimiento nacional en 1995 era alrededor del 90% en los niños de 19 a 35 meses, con tres o más dosis, y que algunas áreas metropolitanas tenían un cubrimiento un poco menor, la incidencia de la enfermedad en 1994 y 1995 fue 98% menor que en la era prevacunación (120). En los lugares de vigilancia activa, la incidencia ajustada para la raza disminuyó 99% entre 1989 y 1995. La incidencia global de enfermedad invasora en menores de 5 meses pasó de 148/100.000 hab en 1988 a 2,2 /100.000 en 1995, inclusive sin haber recibido el esquema

completo debido a su corta edad (121). Estos resultados excedieron las expectativas al evaluar una sola serie primaria de vacunación lo que probablemente, se debe a la capacidad de la vacuna de reducir los portadores faríngeos, estableciendo, además, una inmunidad de rebaño que protege a los no vacunados, asociación también registrada en los países europeos (122).

En Latinoamérica, Chile y Uruguay fueron los primeros y, de hecho, los primeros países no industrializados (junto con Qatar en Asia) en utilizar la vacuna conjugada contra *H. influenzae* tipo b (123). Sin embargo, en años recientes, se ha incluido la vacuna en los Programas Ampliados de Inmunizaciones (PAI) de Argentina, Costa Rica, Brasil, El Salvador, México, Colombia, Venezuela y Perú (124).

Chile fue el primer país en Latinoamérica en demostrar los beneficios de la vacuna contra *H. influenzae* tipo b. Se observó una disminución de 90% en la incidencia de la enfermedad invasora entre 1995 y 1998 (125). Sin embargo, Uruguay fue el primer país en consolidar un programa de vacunación a nivel nacional con una disminución en la incidencia de más de 58% entre 1992-93 y 1995-96 (126-128).

En Costa Rica se utilizó la vacuna inicialmente en el sector privado y, posteriormente, se estableció como medida de rutina en la infancia, lo cual llevó, entre 1992 y 1994, a una disminución del 57% en las admisiones hospitalarias por enfermedad invasora al único hospital de tercer nivel de la región (129,130).

Adicionalmente, en estudios realizados en América Latina, se han corroborado los informes anteriores de efectividad del uso de dosis fraccionadas (un medio y un tercio de la dosis total) de la vacuna conjugada con toxoide tetánico (PRP-T), que pueden estimular concentraciones de anticuerpos adecuadas (>0,15 mg/ml) en 91 a 100% de los niños inmunizados, una frecuencia similar al 93% de la seroconversión a niveles protectores adquirida con las dosis completas (108). Este factor se atribuye, entre otros, a los mecanismos de memoria inmunológica que permiten una rápida respuesta anamnésica ante la reexposición (131). De igual manera, se ha demostrado que hay un

alto porcentaje de seroconversión con una sola dosis de la vacuna PRP-OMP, la cual puede ser una alternativa válida en poblaciones con altas frecuencias de enfermedad invasora en menores de seis meses y cuyos factores logísticos y socioeconómicos puedan dificultar el uso de otras vacunas o de esquemas completos (114).

En Colombia, entre 1994 y 1999, el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud confirmó que el 43,3% de las meningitis bacterianas agudas eran causadas por *H. influenzae* y, basado en el cálculo de los casos esperados en menores de un año entre junio de 1998 y mayo de 1999, se evidenció una disminución del 40% en el número de casos de meningitis bacteriana aguda en menores de un año causada por este agente, teniendo en cuenta que desde mayo de 1998 se inició la vacunación contra *H. influenzae* tipo b en este grupo de edad en el país (132).

Sin embargo, son múltiples los problemas a nivel nacional que han impedido coberturas vacunales mayores. Según el Grupo de Prevención y Control de Enfermedades del Programa Ampliado de Inmunizaciones 2000-2001, la cobertura del PAI ha ido en descenso desde 1997, lo cual se atribuye, en parte, a los procesos de descentralización que brindan autonomía a los alcaldes para manejar los fondos del programa de salud pública a través de las secretarías de salud municipales o distritales, y al hecho de que los sistemas de información se encuentran aún en proceso de adecuación, así como a la situación de orden público y los desplazamientos en diferentes regiones del país, lo cual ha generado inconsistencias en los denominadores de población. Para el 2000, la cobertura vacunal contra *H. influenzae* tipo b a nivel nacional fue sólo de 58,9% (Ministerio de Salud, Grupo de Prevención y Control de Enfermedades, Programa Ampliado de Inmunizaciones 2000-2001. Coberturas de Vacunación, 2000). A nivel departamental y regional, sin embargo, se observan variaciones importantes en las coberturas debido a factores específicos y no del todo bien determinados. Es el caso de departamentos como Cundinamarca, que obtuvo una cobertura de 92%; Bogotá, 72,5%; Caquetá, 71,7%; Casanare, 71,4%;

Huila, 72,3%; Nariño, 79,6%, y Tolima, 76,1%, comparados con otros como Amazonas, con coberturas sólo de 17,7%; Caldas, 21,5%; Cauca, 27,9%; Guainía, 20,0%, y Guaviare, 25,5% (133). Estas diferencias tan marcadas en las coberturas de vacunación están relacionadas, en parte, con los factores anotados anteriormente y también, de manera directa, con las deficiencias en los procesos de transporte de muestras, de conservación de la cadena de frío y la carencia de programas regulares de vacunación en algunos sectores apartados del país, donde los únicos mecanismos de vacunación son las campañas ocasionales.

Conclusiones

No existe ninguna otra enfermedad no epidémica e inmunoprevenible en el mundo que se encuentre tan bien caracterizada y que afecte a grupos de población tan bien definidos, pero que a la vez sea ignorada por tanta gente y registre zonas donde no hay cubrimiento alguno, ya que menos del 2% de las enfermedades por *H. influenzae* son prevenidas a nivel mundial, debido a que alrededor del 80% de los 215 países y territorios que informan a la OMS no utilizan vacunas contra este agente dentro de sus programas ampliados de inmunización (81,134).

El uso de las vacunas conjugadas contra *H. influenzae* ha marcado un hito en la prevención de una de las enfermedades prevalentes más importantes en el mundo y se ha constituido como una de las medidas más efectivas jamás realizadas en la prevención de enfermedades inmunoprevenibles en general.

Debe evaluarse la posibilidad, según las características demográficas y considerando costo, facilidades de administración y de almacenamiento y de acuerdo con las características propias de la enfermedad, de elegir vacunas que promuevan un alto porcentaje de generación de anticuerpos a concentraciones protectoras adecuadas con la primera o primeras dos dosis, aunque, idealmente, debe promoverse la administración del esquema completo de vacunación, tal como está establecido en las recomendaciones internacionales.

El alto costo ha sido un obstáculo importante, pero existen mecanismos que evitan sacrificar las

coberturas, entre los que cabe mencionar la disminución en el número de dosis aplicadas, el uso de dosis fraccionadas de vacunas conjugadas que ofrezcan porcentajes de seroconversión elevados, la implementación de vacunas polivalentes que reduzcan los costos de aplicación e incrementen la inmunogenicidad y, más importante aún, racionalicen la adquisición de vacunas con base en el análisis de los recursos físicos y económicos disponibles.

En realidad, la verdadera intervención en la reducción de costos no ha sido evaluada, pues los costos de adquisición y aplicación de la vacuna son sólo un pequeño porcentaje de aquéllos generados directa e indirectamente por la enfermedad y su prevención secundaria y terciaria. En Colombia, Restrepo y colaboradores (135) realizaron en 1998 un análisis de los costos mínimos generados por la atención de un paciente con meningitis aguda, incluidas las actividades de trabajo de campo para prevenir la diseminación de la enfermedad, y concluyeron que estaba alrededor de US \$ 1.800, mientras que la atención de la hipoacusia profunda -una de sus secuelas- se estimó en US \$16.000 .

Debe fortalecerse y promulgarse el uso y la diseminación de esta vacuna, especialmente en los países subdesarrollados donde las cifras de incidencia de enfermedad invasora continúan siendo altas, a pesar de las dificultades que ello pueda conllevar. Igualmente, es importante continuar y expandir los programas de vigilancia epidemiológica que permitan verificar el impacto de la vacunación y de otras intervenciones sanitarias y las tendencias de este impacto a mediano y largo plazo.

En nuestro país, a pesar de las pobres coberturas en algunos sectores, se ha evidenciado, sin embargo, un impacto importante sobre la enfermedad invasora por *H. influenzae* tipo b.

En vista de la reducción en las coberturas vacunales se hace necesario programar jornadas de vacunación a nivel nacional, fortalecer el Plan de Intensificación del Programa Regional de Vacunación, adecuar los sistemas de información del Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAISOFT 2.0) y establecer los mecanismos para

agilizar la adquisición de vacunas y su adecuada distribución, incluido el fortalecimiento logístico, de apoyo educativo, soporte técnico y de los requerimientos físicos para mantener la cadena de frío y asegurar la adecuada disponibilidad y distribución de los biológicos. De igual manera, es indispensable fortalecer los programas de vigilancia por laboratorio de la etiología de meningitis bacteriana y enfermedad invasora, y asesorar en forma directa a los departamentos de mayor riesgo para IRA y meningitis en el uso racional de los recursos disponibles para salud pública de acuerdo con su situación epidemiológica (Ministerio de Salud-Instituto Nacional de Salud. Proceso de empalme. Convenio interadministrativo para desarrollar la Resolución 00228 de 2001. Programa IRA-Meningitis Bacteriana Aguda, abril 2001).

Agradecimientos

Por sus comentarios y sugerencias, el autor agradece a Clara Inés Agudelo, Elizabeth Castañeda, Enrique Gutiérrez y Miguel Antonio Guzmán.

Referencias

1. **Ward J, Zangwill K.** *Haemophilus influenzae vaccines*. En: Plotkin SA, Orenstein WA, editores. *Vaccines*. Third Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999. p. 183.
2. **Pfeiffer R.** Vorläufige mit Heilungen über die Erreger der Influenzae. *Dtsch Med Wochenschr* 1892;18:28-34.
3. **Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE.** The families and genera of the bacteria: final report of the Committee of the Society of American Bacteriologist on characterization and classification of bacterial types. *J Bacteriol* 1920;5:191-229.
4. **Pittman M.** Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J Exp Med* 1931;53: 471-95.
5. **Alexander HE, Heidelberger M, Leidy G.** The protective or curative element in type b *Haemophilus influenzae* rabbit serum. *Yale J Biol Med* 1944;16:425-40.
6. **Alexander HE.** Experimental basis for treatment of *Haemophilus influenzae* infections. *Am J Dis Child* 1943; 66:160-71.
7. **Sánchez Planas L, Vinas M.** Non-typable *Haemophilus influenzae* from a single hospital: epidemiological markers. *Microbios* 1998;93:55-68.
8. **Bolduc GR, Bouchet V, Jiang RZ, Geisselsoder J.** Variability of outer membrane protein P1 and its

- evaluation as a vaccine candidate against experimental otitis media due to nontypable *Haemophilus influenzae*: an unambiguous, multifaceted approach. *Infect Immun* 2000;68:4505-17.
9. **Karalus RJ, Murphy TF.** Purification and characterization of an outer membrane protein P6, a vaccine antigen of nontypable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26:159-66.
 10. **Hendrixson DR, St Geme JW 3rd.** The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol Cell* 1998;2:841-50.
 11. **Yano H, Suetake M, Kuga A, Irinoda K, Okamoto R.** Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. *J Clin Microbiol* 2000;38:625-9.
 12. **Bernstein JM, Bronson PM, Wilson ME.** Immunoglobulin G subclass response to major outer membrane proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* in children with acute otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;116:363-71.
 13. **Hendolin PH, Paulin L, Ylikoski J.** Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens. *J Clin Microbiol* 2000;38:125-32.
 14. **Morton DJ, Whitby PW, Jin H, Ren Z, Stull TL.** Effect of multiple mutations in the hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin binding proteins, HgpA, HgpB, and HgpC of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Imm* 1999;67:2729-39.
 15. **Sánchez L, Lenzaroz S, Puig M, Loren JG, Nikaido H.** Molecular basis of antimicrobial resistance in nontypable *Haemophilus influenzae*. *Microbiología* 1997;13:309-14.
 16. **Sánchez L, Pan W, Vinas M, Nikaido H.** The acrAB homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J Bacteriol* 1997;179:6855-7.
 17. **Ward, J, Zangwill, K.** *Haemophilus influenzae* vaccines. En: Plotkin SA., Orenstein WA, editors. *Vaccines*. Third Edition. W.B. Philadelphia: Saunders Company; 1999. p. 185.
 18. **Moxon ER.** *Haemophilus influenzae*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. Fourth edition. New York: Churchill Livingstone Inc.; 1995. p.2039.
 19. **Organización Panamericana de la Salud, Programa Especial para Vacunas e Inmunización (SVI), Sistema Regional de Vacunas (SIREVA), Instituto Nacional de Salud.** Taller sobre la identificación bioquímica y serológica de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. Manual de *Haemophilus influenzae*. Bogotá, DC:OPS; 1998. p.1-58.
 20. **Kilian M.** A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. *J Gen Microbiol* 1976;93:9-62.
 21. **Crisel RM, Bajer RS, Dorman DE.** Capsular polymer of *Haemophilus influenzae* type b. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. *J Biol Chem* 1975;250:4926-30.
 22. **Todd JK, Bruhn FW.** Severe *Haemophilus influenzae* infections: spectrum of disease. *Am J Dis Child* 1975;129:607-11.
 23. **Dajani AS, Asmar BI, Thirumoorthi MC.** Systemic *Haemophilus influenzae* disease: an overview. *J Pediatr* 1979;94:335-64.
 24. **Halla IJ, Dobson SRM, Crook DWM.** Population-based study of non-typeable *Haemophilus influenzae* invasive disease in children and neonates. *Lancet* 1993;341:851-4.
 25. **Van Ham SM, van Alphen L, Mooi FR.** Fimbria-mediated adherence and hemagglutination of *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1992;165:S97-S99.
 26. **Torres N, Posada R.** *Haemophilus influenzae*. En: Correa JA, Gómez JF, Posada R, editores *Fundamentos de pediatría. Enfermedades infecciosas y respiratorias*. Tomo II. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 1994. p. 687-8.
 27. **Van Schilfgaarde M, van Ulsen P, Eijk P, Brand M.** Characterization of adherence of nontypable *Haemophilus influenzae* to human epithelial cells. *Infect Immun* 2000;68:4658-65.
 28. **Mendelman PM, Smith AL.** *Haemophilus influenzae*. En: Feigin H, editor. *Textbook of pediatric infectious diseases*. Third Edition. Philadelphia: Saunders Company; 1992. p. 1118.
 29. **Granoff DM, Basden M.** *Haemophilus influenzae* infections in Fresno County, California: a prospective study of the effects of age, race and contact with a case on incidence of disease. *J Infect Dis* 1980;140:40-6.
 30. **Harding AI, Anderson P, Howie VM.** *Haemophilus influenzae* isolated from otitis media. En: Sell SH, Karzon DT, editors. *Haemophilus influenzae*. Nashville, TN: Vanderbilt University Press; 1973. p. 21-7.
 31. **Wallace RJ, Baker CJ, Quinones FJ.** Non-typeable *Haemophilus influenzae* (biotype 4) as a neonatal, maternal and genital pathogen. *Rev Infect Dis* 1983;5:123-36.
 32. **Shannan F, Gratten M, Germer S.** Aetiology of pneumonia in children in Goroka hospital, Papua, New Guinea. *Lancet* 1984;2:537-41.
 33. **Spagnuolo RJ, Ellner JJ, Lerner PI.** *Haemophilus influenzae* meningitis: the spectrum of disease in adults. *Medicine* 1982;61:74-85.
 34. **Murphy TV, Clements JF, Petroni M.** Survival of *Haemophilus influenzae* type b in respiratory secretions. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:148-51.

35. Moxon ER. The carrier state: *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother 1986;18(Suppl A):17-24.
36. Makela PH, Takala AK, Peltola H, Eskola J. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. J Infect Dis 1992;165:S2-S6.
37. Shapiro ED, Ward JI. The epidemiology and prevention of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. Epidemiol Rev 1991;13:113-42.
38. Moxon ER, Deich RA, Connelly CJ. Cloning of chromosomal DNA from *Haemophilus influenzae*: its use for studying the expression of type b capsule and virulence. J Clin Invest 1984;73:298-306.
39. Bisgard KM, Kao A, Leake J, Strebel PM, Perkins BA, Wharton M. *Haemophilus influenzae* invasive disease in the United States, 1994-1995: near disappearance of a vaccine-preventable childhood disease. Emerg Infect Dis 1998;4:1-14.
40. Cochi SI, Broome CV. Vaccine prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. Past, present and future. Pediatr Infect Dis J 1986;5:12-9.
41. Cochi SL, Broome CV, Hightower AW. Immunization of U.S. children with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine: a cost effective model of strategy assessment. JAMA 1985;253:521-9.
42. Centers for Disease Control and Prevention. *Haemophilus influenzae* type b. Disponible en: URL: <http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/hib.pdf>.
43. Broome CV, Schelch WF III. Recent developments in the epidemiology of bacterial meningitis. En: Sande MA, Smith A, Root RD, editors. *Bacterial meningitis*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1985, p.1-10.
44. Ministerio de Salud. Oficina de Epidemiología. Informe ejecutivo semanal. Semana epidemiológica 11;1998.
45. INS. Cobertura universal con la vacuna conjugada de *Haemophilus influenzae* tipo b en Colombia. Inf Quinc Epidemiol Nac 1998;3:105-6.
46. De la Hoz F, Velandia MP. Epidemiología de la infección por meningitis meningocócica en Colombia: implicaciones para las políticas de vacunación. Inf Quinc Epidemiol Nac 2000;5:307-14.
47. Muñoz N, de Vargas CI. Informe del programa de red de meningitis bacteriana aguda. Inf Quinc Casos Brotes de Enfermedades. IQCB 1996;1:1-4.
48. Agudelo CL, Muñoz N, Sanabria OM, Galindo B, García MJ. Informe de evaluación del programa de meningitis bacteriana aguda de microbiología, Laboratorio Nacional de Referencia, 1996. Inf Quinc Epidemiol Nac 1997;2:309-11.
49. Ministerio de Salud, Dirección General de Promoción y Prevención, Oficina de Epidemiología. Sistema Alerta Acción. Acumulado 1997. Inf Quinc Epidemiol Nac 1998;3:13.
50. Ministerio de Salud, Dirección General de Promoción y Prevención, Oficina de Epidemiología. Sistema Alerta Acción. Acumulado 1998. Inf Quinc Epidemiol Nac 1999;4:15.
51. Ministerio de Salud, Dirección General de Promoción y Prevención, Oficina de Epidemiología. Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA). Acumulado 1999; Inf Quinc Epidemiol Nac 2000;5:31.
52. Ministerio de Salud, Dirección General de Promoción y Prevención, Oficina de Epidemiología. Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA). Acumulado 2000; Inf Quinc Epidemiol Nac 2001;6:15.
53. Ministerio de Salud, Dirección General de Promoción y Prevención, Oficina de Epidemiología. Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA). Inf Quinc Epidemiol Nac. 2001;6:29.
54. 1^{er} Congreso Mundial de Infectología Pediátrica. Meningitis en Colombia. Etiología. Reportes locales en población menor a 5 años. México; 1996.
55. Higuera AB, Pastor D, de la Hoz F, Luna M, Gómez O. Efectividad de la vacuna anti-*Haemophilus influenzae* en neumonías bacterianas. Segundo informe preliminar: 11 de Junio de 2000. Inf Quinc Epidemiol Nac 2000;5:163-72.
56. Takala AK, Mounrman O, Kleemola M. Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. Pediatr Infect Dis J 1993;12:189-95.
57. Moxon ER. Molecular basis of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. J infect Dis 1992;165:S77-S81.
58. Rubin LG, Moxon ER. Pathogenesis of bloodstream invasion with *Haemophilus influenzae* type b. Infect Immun 1979;24:102-5.
59. Smith AL, Daum RS, Scheifele DW. Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* meningitis. En: Sell SH, Wright PF, editors. *Haemophilus influenzae*, New York: Elsevier Science Publishing; 1982 p.89-109.
60. Fothergill LD, Wright J. Influenzal meningitis: the relation of age incidence to the bactericidal power of blood against causal organism. J Immunol 1933;24:273-84.
61. Alexander HE, Ellis C, Leidy G. Treatment of type-specific *Haemophilus influenzae* infections in infancy and childhood. J Pediatr 1942;20:673-98.
62. Robbins JB, Schneerson R, Argaman M. *Haemophilus influenzae* type b: disease and immunity in humans. Ann Intern Med 1973;78:259-69.
63. Johnston RB, Anderson P, Newman S. Oponization and phagocytosis of *Haemophilus influenzae* type b. En: Sell SH, Karzon DT, editors. *Haemophilus influenzae*. Nashville, TN: Vanderbilt University Press; 1973. p.99-112.

64. Kayhty H, Jousimies-Somer H, Peltola H. Antibody response to capsular polysaccharides of groups A and C *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b during bacteremic disease. *J Infect Dis* 1981; 143:32-41.
65. Kayhty H, Peltola H, Karank V. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis*. 1983;147: 1100.
66. Ambrosino DM, Schiffman G, Gotschlich EC. Correlation between G2m(n) immunoglobulin allotype and human antibody response and susceptibility to polysaccharide encapsulated bacteria. *J Clin Invest* 1975;75:1935-42.
67. Pichinero ME, Insel RA. Relationship between natural occurring human mucosal and serum antibody to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1983;146:243-8.
68. Tarr PI, Peter G. Demographic factors in the epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis in young children. *J Pediatr* 1978;92:884-88.
69. Fraser DW. *Haemophilus influenzae* in the community and in the home. En: Sell SH, Wright PF, editors. *Haemophilus influenzae*. New York: Elsevier Science Publishing; 1982. p.11-22.
70. Janna JN. The epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* infections in children under five years of age in the Northern Territory: a three-year study. *Med J Aust* 1990;152:234-40.
71. Ochi SL, Fleming DW, Hightower AW. Primary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: a population-based assessment of risk factors. *J Pediatr* 1986;108:887-96.
72. Fraser DW, Geil CC, Feldman RA. Bacterial meningitis in Bernadillo County, New Mexico: a comparison with three other American populations. *Am J Epidemiol* 1974; 100:29-34.
73. Tarr Pi, Peter G. Demographic factors in the epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis in young children. *J Pediatr* 1978;92:884-8.
74. Ward JI, Smith AL. *Haemophilus influenzae* bacteremia in children with sickle cell disease. *J Pediatr* 1976;88:261-2.
75. Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:359-95.
76. Barlett AV, Zusman J, Daum RS. Unusual presentations of *Haemophilus influenzae* infections in immunocompromised patients. *J Pediatr* 1983;102:55-8.
77. Lum MK, Ward JI, Bender TR. Protective influence of breastfeeding on the risk of developing invasive *Haemophilus influenzae* type b disease [abstract]. *Pediatr Res* 1982;16:436.
78. Insel RA, Amstey M, Pichinero ME. Postimmunization antibody to the *Haemophilus influenzae* type b capsule in breast milk. *J Infect Dis* 1985;152:407-8.
79. Takala AK, Clements DA. Socioeconomic risk factors for invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *J Infect Dis* 1992;165:S11-S15.
80. Istre GR, Conner JS, Broome CV. Risk factors for primary invasive *Haemophilus influenzae* disease: increased risk from daycare attendance and school age household members. *J Pediatr* 1985;106:190-5.
81. Michelis RH, Shultz WF. The frequency of *Haemophilus influenzae* infections: analysis of racial and environmental factors. En: Sell SH, Karzon DT editors *Haemophilus influenzae*. Nashville, TN: Vanderbilt University Press; 1973. p.243-50.
82. Estrada S, Ospina S, Jaramillo E, Bustamante M, Gallego M, Montealegre N. Resultados bacteriológicos en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con sospecha clínica de meningitis bacteriana: cuatro años de experiencia. *Acta Méd Colomb* 1996;21:110-4.
83. Kleiman MB, Reynolds JK, Watts NH. Superiority of acridine orange stain in partially treated bacterial meningitis. *J Pediatr* 1984;104:401-4.
84. Ward JL, Siber GR, Scheifele DW. Rapid diagnosis of *Haemophilus influenzae* type b infections by latex particle agglutination and counterimmunoelectrophoresis. *J Pediatr* 1978;93:37-42.
85. Marcon MJ, Hamoudoi AC, Cannon HJ. Comparative laboratory evaluation of three antigen detection methods for diagnosis of *Haemophilus influenzae* type b disease. *J Clin Microbiol* 1984;19:333-7.
86. McGraw TP, Bruckner DA. Sensitivity of commercial agglutination and counterimmunoelectrophoresis methods for the detection of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharides. *Am J Clin Pathol* 1983; 80:703-6.
87. Spinola SM, Scheaffer CL, Philbrick KB, Gilligan PH. Antigenuria after *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide immunization: a prospective study. *J Pediatr* 1986;109:835-8.
88. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: a global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microb Rev* 2000;13:302-17.
89. Sell SHW, Merrill RE, Doyn EO, Zinski EP. Long-term sequelae of *Haemophilus influenzae* meningitis. *Pediatrics* 1972;42:206-17.
90. Taylor HG, Mills EL, Ciampi A. The sequelae of meningitis in school-aged children. *N Engl J Med* 1990; 323:1657-63.
91. Ferry PC, Culbetson JL, Cooper JA. Sequelae of *Haemophilus influenzae* meningitis. En: Sell SH, Wright

- PF, editors *Haemophilus influenzae*: epidemiology, immunology and prevention of disease. New York: Elsevier Science Publishing; 1982. p.111-7.
92. Ginsburg CM, Howard JB, Nelson JD. Report of 65 cases of *Haemophilus influenzae* pneumonia. *Pediatrics* 1979;64:283-6.
 93. Shann F. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:247-52.
 94. Turk DC. Clinical importance of *Haemophilus influenzae*-1981. En Shell SH, Wright PF, editors. *Haemophilus influenzae*, epidemiology, immunology and prevention of disease. New York: Elsevier; 1982. p.3-9.
 95. Moxon ER. *Haemophilus influenzae*. En: Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone Inc.; 1995. p.2042.
 96. Berenberg W, Kevy S. Acute epiglottitis in childhood: a serious emergency readily recognized at the bedside. *N Eng J Med* 1958;258:870-4.
 97. Jorgensen JH. Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Infect Dis* 1992;14:1119-23.
 98. Doren GV, Jergensen JH, Thornsberry C. National collaborative study of the prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;32: 108-15.
 99. Jaramillo E, Estrada S, Vélez L. Resultados de la vigilancia de laboratorio en meningitis bacteriana: ocho años de seguimiento. *Acta Méd Colomb* 1998; 23:334-8.
 100. Muñoz N, Linares M, Agudelo CI. Susceptibilidad antimicrobiana de *Haemophilus influenzae* como agente de la meningitis bacteriana aguda y la neumonía. *Biomédica* 1997;17(Supl1):M12,109.
 101. Feigin RD, McCracken GH Jr, Klein JO. Diagnosis and management of meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:785; 814.
 102. Klein JO, Feigin RD, McCracken GH. Report of the task force on diagnosis and management of meningitis. *Pediatrics* 1986;78:501-5.
 103. Jacobs RF, Wright MW, Deskin RL. Delayed sterilization of *Haemophilus influenzae* type b meningitis with twice-daily ceftriaxone. *JAMA* 1988; 259:392-4.
 104. Sirinavin S, Chiemchanya S, Visudhipan P. Cefuroxime treatment of bacterial meningitis in infants and children. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25:273-5.
 105. Prober CJ. The role of steroids in the management of children with bacterial meningitis. *Pediatrics* 1995; 95:29-31.
 106. Committee of Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics. *Haemophilus influenzae* infections. Red Book 2000. 25th edition. Chicago, IL: American Academy of Pediatrics; 2000.
 107. Anderson P, Pichichero ME, Insel RA. Immunization of 2-month old infants with protein-coupled oligosaccharides derived from the capsule of *Haemophilus influenzae* type b. *J Pediatr* 1985;107: 346-51.
 108. Kaythy H, Karanko V, Peltola H, Makela PH. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory. *Pediatrics* 1984;74: 857-65.
 109. Milstien JB, Gross TP, Kuritsky JN. Adverse reactions reported following receipt of *Haemophilus influenzae* type b vaccine: an analysis after 1 year of marketing. *Pediatrics* 1987;80:270-4.
 110. Lansteiner K. The Specificity of serologic reactions. Cambridge: Harvard University Press; 1945. Reprinted by Dover Publications, New York; 1962.
 111. Schneerson R, Barrera O, Sutton A, Robbins JB. Preparation, characterization, and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. *J Exp Med* 1980;152:361-76.
 112. Ward J, Zangwill K. *Haemophilus influenzae* vaccines. En: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. Third Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999. p.195-210.
 113. Anderson P. Antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b diptheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with nontoxic protein CRM₁₉₇. *Infect Immun* 1983;39:233-38.
 114. Tai JY, Vella PP, McLean AA. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987;184:154-61.
 115. Vella PP, Staub JM, Armstrong J. Immunogenicity of a new *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (meningococcal protein conjugate) (PedvaxHIB). *Pediatrics* 1990;85:668-75.
 116. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for use of *Haemophilus influenzae* conjugate vaccines and a combined diptheria, tetanus, pertussis, and *Haemophilus* type b vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). 1993;42 (RR-13):1-15.
 117. Centers for Disease Control and Prevention. Joint statement for thimerosal Use in Vaccines. *MMWR* 2000;49:622-31.
 118. Peltola H, Kilpi T, Anttila M. Rapid disappearance of *Haemophilus influenzae* type b meningitis after routine

- childhood immunization with conjugated vaccines. *Lancet* 1992;340:592-4.
119. **Centers for Disease Control and Prevention.** Progress towards elimination of *Haemophilus influenzae* type b disease among infants and children - United States, 1987-1995. *MMWR* 1996;45:901-6.
120. **Centers for Disease Control and Prevention.** National, state and urban area vaccination coverage levels among children aged 19 -35 months. United States, January-December 1995. *MMWR* 1997;46:176-82.
121. **Cochi SL, Fleming DW, Hightower AW, Limpakarnjanarat K, Facklam RR, Smith JD, et al.** Primary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: a population-based assessment of risk factors. *J Pediatr* 1986;108:887-96.
122. **Barbour ML.** Conjugated vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Emerg Infect Dis* 1996;3:176-82.
123. **Lagos R, Valenzuela MT, Levine OS, Losonsky A, Erazo A, Wasserman SS, Levine MM.** Economisation of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b: a randomized trial of immunogenicity of fractional-dose and two-dose regimes. *Lancet* 1998; 351:1472-6.
124. **Asociación Española de Pediatría, Comité Asesor de Vacunas (1998-2002).** Esquemas del plan ampliado de vacunación en países latinoamericanos. En: Tregnaghni M, Ceballos A, editores. Adaptación latinoamericana del manual de vacunas en pediatría. Madrid, España: Asociación Española de Pediatría; 2001.
125. **Lagos R, Valenzuela MT, Levine OS, Losonsky A, Erazo A, Wasserman SS, Levine MM.** Large scale, postlicensure, selective vaccination of Chilean infants with PRP-T conjugated vaccine: practicality and effectiveness in preventing invasive *Haemophilus influenzae* type b infections. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15:216-22.
126. **Peltola H.** *Haemophilus influenzae* type b disease and vaccination in Latin America and the Caribbean. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:780-87.
127. **Landaverde M, Di Fabio JL, Ruocco G, Leal I, de Quadros C.** Introducción de la vacuna conjugada contra Hib en Chile y Uruguay. *Rev Panam Salud Pública* 1999;5:200-6.
128. **Ruocco G, Curto S, Savro M, Lavrani H, Frocht R.** Vacunación contra *Haemophilus influenzae* tipo b en Uruguay: experiencia e impacto. *Rev Panam Salud Pública* 1999;5:197-99.
129. **Caro-Cassali M, Vargas-Campos A, Mohs-Villalta, Arguedas-Mohs A.** Enfermedad sistémica por *Haemophilus influenzae* tipo b en el Hospital Nacional de Niños, un año después de la introducción de la vacuna conjugada. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 1995;52: 426-30.
130. **Odio CM, Mohs E, Ramírez L, Herrera M, Faingezicht.** *Pediatr Res* 1992;31:98.
131. **Kayty H, Peltola H, Karanko V.** The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1983;147: 1100.
132. **Agudelo CI, Muñoz N, De la Hoz F, Laboratorios de Salud Pública.** Evaluación rápida del impacto de la vacuna contra *Haemophilus influenzae* serotipo b en Colombia. *Pan Am J Public Health* 2000;8:181-4.
133. **Ministerio de Salud, Programa Ampliado de Inmunizaciones.** Coberturas de vacunación por biológico y departamento, 2000. Programa MIPAIOSF-II-02/00.
134. **Steinhoff M.** *Haemophilus influenzae* type b infections are preventable everywhere. *Lancet* 1997; 349:1186-7.
135. **Restrepo B, Olaya A, Upegui G, Aguirre C, Carrizosa J.** Estudio de los costos de la atención y años de vida perdidos por muerte por meningitis por *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*. *Rev Epidemiol Antioquia* 1998;23:57-64.