

Bacteriología Clínica de *Haemophilus Influenzae*

DR. CARLOS A. JAVIER-ZEPEDA*

Haemophilus influenzae es un pequeño bacilo gram negativo inmóvil, que no forma esporas, con requerimientos nutricionales exigentes, crece aeróbica o anaeróbicamente. El crecimiento aeróbico requiere la presencia de hemina (factor X) y nicotinamida adenina dinucleótida (factor V). El bacilo fue descubierto por Pfeiffer en 1892 durante una epidemia de influenza en Europa y erróneamente se le consideró la causa de esta enfermedad.

Desde 1931 se conocen seis serotipos capsulares, a, b, c, d, e, f. La cápsula representa el mayor factor de virulencia de esta bacteria y la mayor parte de las infecciones invasivas serias son causadas por el serotipo capsular b. Existen también cepas no capsuladas que pueden producir infecciones en humanos. Actualmente existe una vacuna para prevenir infecciones causadas por el serotipo b, su uso en países como los Estados Unidos ha disminuido la incidencia de enfermedad por esta bacteria.

Haemophilus influenzae es un habitante normal de la vía respiratoria superior y ocasionalmente se encuentra colonizando el tracto gastrointestinal y genital. A partir de su nicho en la nasofaringe invade estructuras anatómicas vecinas, el torrente vascular y la vía respiratoria inferior, produciendo las formas invasivas de infección representadas por los cuadros clínicos de otitis media, meningitis, nasofaringitis, epiglotitis, conjuntivitis, septicemia, pericarditis, endocarditis, peritonitis, artritis, neumonía y otras.

En los últimos 10 años se ha venido prestando atención a las infecciones causadas por las cepas no capsuladas de *Haemophilus influenzae*, las manifestaciones clínicas más notables son otitis media en niños, infecciones respiratorias en adultos y bronquitis crónica en niños de países en desarrollo. Las cepas no capsuladas son genéticamente diferentes a *Haemophilus influenzae* tipo b, sus antígenos superficiales son diferentes, causan diferentes tipos de infección y afectan a diferentes poblaciones. Las cepas de *H. influenzae* tipo b son genotipos restringidos lo que sugiere un origen clonal de estas cepas, en cambio las cepas no capsuladas son genéticamente diversas.

H. influenzae es exclusivamente un patógeno humano. La tasa de colonización de la nasofaringe en niños oscila entre 3 y 5% dependiendo de la población, el uso de vacunas contra el serotipo b disminuye la tasa de colonización nasofaríngea y por lo tanto las posibilidades de transmisión. *H. influenzae* se disemina por medio de la vía aérea o por contacto directo con las secreciones del paciente. Los niños pequeños son más susceptibles a ser infectados sobretodo cuando en el ambiente familiar existe otra persona portadora. Ciertas poblaciones tienen una mayor frecuencia de enfermedad invasiva lo cual puede estar relacionado con el efecto de diferentes alotipos de inmunoglobulinas sobre la susceptibilidad a la infección por bacterias encapsuladas, sin embargo la explicación precisa de este fenómeno aun no se ha definido y podría estar relacionado más bien con la exposición en una edad temprana a la bacteria o a diferencias genéticas en relación con su capacidad de desarrollar una respuesta inmunológica específica.

El método más confiable para establecer el diagnóstico de una infección por *Haemophilus influenzae* es la recuperación de la bacteria en cultivo. Existen varios métodos directos y rápidos que permiten un diagnóstico presuntivo bastante efectivo por ejemplo inmunoelectroforesis, aglutinación de látex, coaglutinación y ELISA los cuales detectan el antígeno capsular, sobretodo orientados a la búsqueda del tipo b. Sin embargo debe recordarse que existen otros serotipos y cepas no capsuladas que también pueden producir infección. Este tipo de exámenes directos tienen un valor adicional porque permiten detectar algunas infecciones cuando el paciente ya ha recibido antimicrobianos los que inhiben su crecimiento en cultivo.

Para el cultivo de *Haemophilus influenzae* se necesitan medios que reúnan las características nutricionales que exige esta bacte-

* Patología Clínica. Tegucigalpa, Honduras

ría. Se han propuesto varios medios de cultivo pero para fines prácticos el Agar chocolate es adecuado sobre todo cuando es suplementado con compuestos vitamínicos. Las colonias de esta bacteria tienden a ser pequeñas y traslucidas en las primeras 24 horas, los medios deben incubarse a 35- 37°C hasta por tres días cuando no ha habido crecimiento aparente en los primeros dos días, preferentemente en una atmósfera con 5-10% CO₂. *Haemophilus influenzae* no crece en medio de Agar sangre corriente a menos que sea suplementado con factor V.

El procedimiento estándar para la identificación de una bacteria que muestra las características coloniales y microscópicas de *Haemophilus* es la demostración de su necesidad de factores X y V. Esto se lleva a cabo de distintas formas en el laboratorio. Otras especies de *Haemophilus* pueden requerir sólo factor X o factor V. *H. influenzae* como ya se mencionó necesita de ambos. Es posible y a veces necesario efectuar ciertas pruebas bioquímicas para diferenciar *H. influenzae* de otras especies de *Haemophilus* y existen algunos estuches comerciales que permiten hacer estas pruebas con facilidad por ejemplo el sistema API-NH, cuyo desempeño es aceptable. También es posible identificar la bacteria mediante sondas de DNA.

Hasta hace unos 25 años las infecciones por *Haemophilus influenzae* respondían uniformemente al tratamiento con ampicilina. De entonces para acá se ha demostrado creciente resistencia a los betalactámicos y no es infrecuente la resistencia al cloranfenicol, a trimetoprim-sulfametoxasol, tetraciclina y rifampicina. El mecanismo de resistencia a los betalactámicos es la producción de beta-lactamasa inducida por un plásmido, más recientemente se ha descrito la alteración estructural de las proteínas fijadoras de penicilina como otro mecanismo de resistencia. El mecanismo de resistencia al cloranfenicol es la producción de acetiltransferasa de cloranfenicol, una enzima que inactiva este antibiótico. Los mecanismos de resistencia a los betalactámicos y a cloranfenicol pueden coexistir en la misma cepa. Actualmente se recomienda que la terapia inicial para los casos serios por infección de *Haemophilus influenzae* debe llevarse a cabo con cefalosporinas de segunda o tercera generación como cefuroxima, cefotaxima o ceftriaxona, si esto no es posible se puede utilizar un régimen combinado de ampicilina más cloranfenicol. La terapia debe reevaluarse una vez que se obtiene los datos de la sensibilidad de esa bacteria. Otros agentes que han sido utilizados para el tratamiento de infecciones por cepas resistentes a la ampicilina son las sulfonamidas, eritromicina, claritromicina, cefaclor y trimetoprim- sulfametoxazol, sin embargo siempre deben ser evaluados mediante antibiograma.

Debido a que *Haemophilus influenzae* no crece en los medios rutinarios para efectuar antibiograma, se necesita preparar un medio especial que además de la base de Mueller-Hinton contiene 15ug/mL de beta-NAD, 15ug/mL de hematina bobina, 5mg/mL de extracto de levadura y un pH de 7.2 a 7.4. De acuerdo con el Comité Nacional de Estándares en Laboratorio Clínico (NCCLS-USA) el Agar chocolate no debe usarse para efectuar antibiograma de *Haemophilus*.

Las muestras clínicas para la investigación de *Haemophilus influenzae* deben, en lo posible, estar libres de contaminación con otros microorganismos por la posibilidad de que el crecimiento rápido de otro tipo de bacteria pueda ocultar la presencia de *Haemophilus*. Esto a veces no es posible pero deben tomarse todas las precauciones necesarias.

Sangre: la mayor parte de las bacteremias por *Haemophilus influenzae* tipo b son de alta magnitud (más de 100 unidades formadoras de colonias por mL) por lo que no es necesario cultivar grandes cantidades de sangre. Bastan 1-3 ml. Sólo un 10% de los pacientes presentan bacteremias de baja magnitud en cuyo caso sería necesario cultivar un volumen mayor. En niños mayores de 7 años y en adultos se deben cultivar 10 ml de sangre.

LCR: se requieren por lo menos 2 mL de LCR para lograr un cultivo adecuado, de igual manera se debe pensar cuando se trata de líquido sinovial, pericárdico o pleural.

Oculares: los pacientes con conjuntivitis por *H. influenzae* generalmente presentan una secreción purulenta abundante y no es problema obtener un hisopado para cultivo.

Secreciones Respiratorias: la mayor dificultad con estas muestras es la presencia de otros organismos de la microbiota normal de la vía respiratoria superior. No es recomendable obtener muestras de nasofaringe ya que la presencia de *Haemophilus influenzae* en este sitio puede indicar simple colonización normal y no debe inferirse que su presencia tiene relación con casos de otitis, sinusitis u otras enfermedades. Sin embargo, puede haber verdadera nasofaringitis ocasionada por esta bacteria y si el cuadro clínico lo sugiere se puede dar importancia al cultivo. La obtención de secreciones en pacientes con epiglotitis sólo debe intentarse cuando se cuenta con todos los medios para atender un posible laringoespasma. El esputo debe manejarse en forma rutinaria.

Óticos: la importancia de los cultivos de la secreción del oído medio es elevada cuando la muestra ha sido obtenida por timpanocentesis. La obtención de muestras por hisopado del oído externo tiene menor valor porque frecuentemente se encuentra contaminación con otros organismos.