



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ESTANDARIZACIÓN DE UNA PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE
Haemophilus influenzae EN MUESTRAS NASOFARÍNGEAS DE NIÑOS

MENORES DE 5 AÑOS

Línea de investigación:
Biología celular y molecular

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autora

López Briceño, Marcela Sofía

Asesora

Riveros Ramirez, Maribel Denise

ORCID: 0000-0002-5347-3261

Jurado

Sáez Flores, Gloria María

Murrugarra Brimgas, Victoria Ysabel

Pariona Llanos, Ricardo

Lima - Perú

2024



ESTANDARIZACIÓN DE UNA PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE *Haemophilus influenzae* EN MUESTRAS NASOFARÍNGEAS DE NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	1 %
2	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	1 %
3	dcmq.com.mx Fuente de Internet	1 %
4	doaj.org Fuente de Internet	1 %
5	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	1 %
6	revistabiomedica.org Fuente de Internet	<1 %
7	Irene Hortelano Martín. "Determinación del riesgo para el consumidor de la presencia de <i>H. pylori</i> y otros <i>Helicobacter</i> spp. patógenos en aguas de consumo mediante técnicas moleculares y metagenómica", Universitat Politècnica de Valencia, 2021 Publicación	<1 %



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ESTANDARIZACIÓN DE UNA PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE
Haemophilus influenzae EN MUESTRAS NASOFARÍNGEAS DE NIÑOS MENORES DE 5
AÑOS

Línea de investigación:

Biología Celular y Molecular

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autora:

López Briceño, Marcela Sofía

Asesora:

Riveros Ramirez, Maribel Denise

ORCID: 0000-0002-5347-3261

Jurado:

Sáez Flores, Gloria María

Murrugarra Brimgas, Victoria Ysabel

Pariona Llanos, Ricardo

Lima, Perú.

2024

Dedicatoria

A mi familia, en especial a mi madrina Francisca quien fue el sustento de mi día y motivación para culminar mis estudios. Gracias a ella pude realizar este trabajo con mucho esfuerzo.

A mi abuelita Melania y mi papito Manuel quienes están muy orgullosos de mis logros y desde el cielo siempre me acompañan.

Agradecimientos

A todo el equipo del Laboratorio de Infectología Pediátrica y la Dra. Theresa Ochoa, por permitirme realizar este trabajo en dicho laboratorio. Del mismo modo, un agradecimiento especial a mis asesores Brayan Gonzales y Maribel Riveros por sus enseñanzas y detalles que me impartieron a lo largo de la elaboración de esta tesis.

INDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	10
1.2 ANTECEDENTES.....	12
1.3 OBJETIVOS.....	15
1.3.1 <i>Objetivo general</i>	15
1.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	15
1.4 JUSTIFICACIÓN	16
II. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1 BASES TEÓRICAS DE LA INVESTIGACIÓN.....	18
2.1.1 <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	18
2.1.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	19
2.1.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	19
III. MÉTODO.....	21
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	21
3.2 ÁMBITO TEMPORAL Y ESPACIAL	21
3.3 VARIABLES.....	21
3.4 POBLACIÓN Y MUESTRA	21
3.5 INSTRUMENTOS	22
3.6 PROCEDIMIENTOS	22
3.6.1 <i>Cálculo de las unidades formadoras de colonias</i>	23

3.6.2 Inoculación de la cepa bacteriana y extracción de ADN.....	23
3.6.3 Evaluación de las condiciones de PCR.....	24
3.6.3.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	25
3.6.4 Límite de detección de la PCR convencional.....	25
3.6.5 Evaluación de la sensibilidad diagnóstica de la PCR en muestras nasofaríngeas y otros patógenos nasofaríngeos.....	25
3.7 ANÁLISIS DE DATOS.....	25
3.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	26
IV. RESULTADOS.....	27
4.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y UFC DE <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> ATCC® 10211.....	27
4.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA PCR CONVENCIONAL.....	28
4.3 LIMITE DE DETECCIÓN DE LA PCR.....	30
4.4 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA PCR.....	31
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	33
VI. CONCLUSIONES.....	37
VII. RECOMENDACIONES.....	38
VIII. REFERENCIAS.....	39
IX. ANEXOS.....	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Primers</i> para la amplificación del gen <i>hpd</i> de <i>H. influenzae</i>	24
Tabla 2. Conteo de las UFC correspondiente a cada dilución de <i>H. influenzae</i>	28
Tabla 3. Supermix de la PCR estandarizada.....	29
Tabla 4. Condiciones de la PCR convencional para la detección de <i>H. influenzae</i>	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de crecimiento de <i>H. influenzae</i>	27
Figura 2. Determinación de la temperatura de hibridación.....	29
Figura 3. Evaluación del límite de detección de la PCR.....	31
Figura 4. Evaluación de la sensibilidad diagnóstica.....	32

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo estandarizar una PCR convencional para la detección de *Haemophilus influenzae* en muestras nasofaríngeas de niños menores de cinco años, así como determinar el límite de detección de la PCR y su sensibilidad empleando muestras positivas a *H. influenzae* por microbiología y utilizando otros patógenos nasofaríngeos como *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *N. meningitidis*. Las condiciones adecuadas de este PCR fueron desarrolladas utilizando el kit PCR Promega® a concentraciones óptimas de 1,5 mM en MgCl₂ y 0.2 mM para dNTP. Se utilizó los primers dirigidos al gen *hpd* con una concentración de 7,5 mM y un rango de concentración de ADN de 0.183-183 ng por reacción. La temperatura óptima de hibridación fue de 60°C con 40 ciclos. El límite de detección fue 3.29 x10⁴ UFC/mL equivalente a 0,183 ng de ADN. Asimismo, se evaluó diez muestras con diagnóstico previo de *H. influenzae* por microbiología amplificando en el gen *hpd* que indica la positividad para esta bacteria además este PCR solo amplificó en *H. influenzae* al evaluar su sensibilidad diagnóstica con otros patógenos nasofaríngeos. Estos resultados abordan el desarrollo de una PCR convencional con la finalidad de ser una prueba de rápido diagnóstico y bajo costo para detectar *H. influenzae* en muestras nasofaríngeas de niños colonizados como prevención en el desarrollo de enfermedad invasiva y con ello futuros estudios de vigilancia epidemiológica sobre esta bacteria.

Palabras clave: *Haemophilus influenzae*, PCR convencional, límite de detección, sensibilidad diagnóstica.

ABSTRACT

The objective of this study was to standardize a conventional PCR for the detection of *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal samples from children under five years old, as well as to determine the detection limit of the PCR and its sensitivity using samples positive for *H. influenzae* by microbiology and using other nasopharyngeal pathogens such as *S. pneumoniae*, *S. aureus* and *N. meningitidis*. The appropriate conditions for this PCR were developed using the Promega® PCR kit at optimal concentrations of 1.5 mM in MgCl₂ and 0.2 mM for dNTPs. Primers targeting the *hpd* gene were used with a concentration of 7.5 mM and DNA concentration range of 0.183- 183 ng per reaction. The optimal hybridization temperature was 60°C with 40 cycles. The detection limit was 3.29 x10⁴ CFU/mL equivalent to 0.183 ng of DNA. In addition, ten samples with a previous diagnosis of *H. influenzae* by microbiology were evaluated, amplifying the *hpd* gene that indicates positivity for these bacteria. Additionally, this PCR only amplified in *H. influenzae* when evaluating its diagnostic sensitivity with other nasopharyngeal pathogens. These results address the development of a conventional PCR with the purpose of being a rapid and low-cost diagnostic test to detect *H. influenzae* in nasopharyngeal samples from colonized children as a prevention in the development of invasive disease and thus future epidemiological surveillance studies on these bacteria.

Keywords: Haemophilus influenzae, conventional PCR, detection limit, diagnostic sensitivity.

I. INTRODUCCIÓN

H. influenzae continúa formando parte de la lista de patógenos prioritarios publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a la creciente farmacorresistencia y las complicaciones clínicas que ocasiona (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2024). Entre las principales infecciones invasivas se ha registrado otitis media aguda, sinusitis y meningitis ocurriendo principalmente en niños no inmunizados o recién nacidos que aún no han recibido la vacuna Hib contra *H. influenzae* (Khatta y Anjum, 2023).

Los niños sanos pueden ser colonizados por *H. influenzae* a través de la nasofaringe y garganta con una frecuencia registrada del 20% en el primer año y el 50% en menores de cinco años sin causar sintomatología (Shooraj et al., 2019). Sin embargo, es sabido que la colonización es la principal vía de contagio y desarrollo de enfermedad invasiva por lo que se requiere de metodologías de rápido diagnóstico.

En la actualidad aún se utiliza pruebas microbiológicas de alto costo como el uso de factores de crecimiento el cual requiere un cultivo de 24 horas que puede resultar en falsos positivos (Dealler et al., 1991). Por lo tanto, es necesario recurrir a pruebas moleculares que nos permitan una correcta identificación y rápido diagnóstico asimismo con la finalidad de tener una correcta descripción a nivel epidemiológico del estado de colonización de *H. influenzae* en Perú.

1.1 Descripción y formulación del problema

Haemophilus influenzae es un cocobacilo gramnegativo causante de neumonía y meningitis en niños y adultos, y la sexta causa de muerte en los países de medianos y bajos ingresos (Azzari et al., 2008; Heinz, 2018). La incidencia de *H. influenzae* invasivo es mayor en niños menores de cinco años con 0,15 casos / 100.000 niños comparado en adultos con 0,06 casos / 100.000 adultos (Oliver et al., 2021). Por otro lado, la colonización nasofaríngea en niños que no presentan alguna sintomatología se da con una frecuencia del 20% al 50% desde

el primer año de vida hasta los cinco años (Mukundan et al., 2007). La infección por *H. influenzae* suele ser por las vías respiratorias, colonizando la nasofaringe, adhiriéndose a las células epiteliales del huésped (Spahich et al., 2012). Se diferencia en seis serotipos, siendo el más virulento el serotipo b (Hib) cuyo principal factor de virulencia es la capsula de polisacárido compuesta por pilirribosil ribitol fosfato (PRP) (Slack et al., 2021).

La identificación de *H. influenzae* empleando técnicas microbiológicas se basan en medios de cultivos con requerimientos especiales para su crecimiento. La prueba *gold standard* emplea factores de crecimiento como protoporfirina (factor X) y nicotinamida adenina dinucleótido (factor V) el cual requiere un cultivo de 24 horas, retardando así su identificación (Dealler et al., 1991). Esta metodología, así como el uso de antibióticos previa a la toma de muestra y la baja concentración de bacterias; disminuye la sensibilidad de la técnica generando falsos negativos (Parra et al., 2007).

Dentro de este contexto, en una localidad altoandina de Perú, se realizó un estudio epidemiológico aislando 10 (2,8%) cepas de *H. influenzae* a partir de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y secreciones del tracto respiratorio provenientes de 354 pacientes de diferentes grupos etarios con diagnóstico de enfermedad respiratoria aguda (IRAs). Solo tres aislamientos de *H. influenzae* provenían de pacientes menores de cinco años (uno de secreciones del tracto respiratorio y dos de LCR) donde se empleó los métodos convencionales de cultivo las cuales tardaron entre 24 a 72 horas para su identificación (Pantigozo et al., 2006). Asimismo, se han realizado pruebas moleculares como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real para estudios epidemiológicos en *H. influenzae*, sin embargo, esta técnica tiende a elevar los costos debido a los reactivos y equipos empleados (Chien et al., 2013).

Entre los reportes epidemiológicos, el Sistema Regional de Vacunas (SIREVA) en el año 2015, reportó 5,3 mil casos de neumonía y 200 casos de meningitis por *H. influenzae* en el continente americano disminuyendo considerablemente en un 90% en pacientes con enfermedad letal luego de la introducción de la vacuna Hib en el año 1990 contra *H. influenzae*. En Perú se ha reportado 201 casos de *H. influenzae* en pacientes con neumonía menores de cinco años entre los años 2017 y 2018 (Organización Panamericana de la Salud [OPS], s.f.), sin embargo, los estudios son muy escasos sobre la portación nasofaríngea siendo una de las principales vías de transmisión para el desarrollo de enfermedad invasiva además de emplear técnicas microbiológicas costosas para su identificación.

Frente a estos inconvenientes, aún se siguen empleando métodos microbiológicos que no permite una correcta identificación y posterior vigilancia de *H. influenzae*, (Clementi y Murphy, 2011). Por lo tanto, se recomienda la implementación de la técnica de diagnóstico molecular de PCR convencional debido a que puede acortar el tiempo diagnóstico. Con ello, se requiere establecer las condiciones de temperatura, $MgCl_2$, *primers* y concentración de ADN que permitirá identificar la presencia de este microorganismo a partir de muestras nasofaríngeas. Por consiguiente, el presente estudio de tesis planteó la siguiente pregunta; ¿Cuáles son las condiciones de la PCR convencional para la detección de *Haemophilus influenzae* en muestras nasofaríngeas de niños menores de cinco años?

1.2 Antecedentes

H. influenzae suele colonizar la nasofaringe en adultos mayores y de niños menores de cinco años, a pesar de la introducción de la vacuna Hib aún se reportan casos (Wen et al., 2020). Suele volverse invasiva por ingreso intravascular causando neumonía y meningitis (Tabatabaei et al., 2021). Antes de la creación de la vacuna conjugada Hib

contra *Haemophilus influenzae* tipo b en la década de 1990, existían casos muy frecuentes de meningitis (Tsang y Ulanova, 2017). En Perú, la introducción de la vacuna Hib se dio en el año 1998 disminuyendo las afecciones clínicas severas de enfermedad invasiva en niños menores de cinco años (Resolución Ministerial N°719/2018, 1 de agosto de 2018). Esto ha generado un nuevo enfoque epidemiológico en el estado de portación nasofaríngea como primera vía de contagio. Debido a esto, la vigilancia continua es necesaria, sin embargo, la evaluación de esta conlleva en poder aplicar técnicas de fácil acceso y pronto resultado como las pruebas moleculares.

Un estudio realizado en Irán entre 2014 a 2015 evaluó la frecuencia de *H. influenzae*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* a partir de LCR. *H. influenzae* solo se aisló por cultivo microbiológico en tres de 196 muestras. En contraste, al emplear técnicas moleculares como la PCR con *primers* dirigidos al gen *bex*, se pudo detectar *H. influenzae* en ocho muestras (Amin et al., 2016). Por otro lado, en Reino Unido en el año 2014, se realizó una comparación entre pruebas microbiológicas y moleculares para detectar patógenos respiratorios en 262 muestras nasofaríngeas provenientes de adultos con neumonía. Se identificó a *H. influenzae* en 130 (40,2%) muestras por PCR en Tiempo Real amplificando el gen *hck*, y 51 (15,8%) aislamientos por cultivo. Asimismo, se pudo detectar por PCR en Tiempo Real a *S. pneumoniae* en 115 (35,5%) muestras y 20 (6,2%) por cultivo, así como a *Staphylococcus aureus* en 33 (10,2%) muestras por PCR en Tiempo Real y 16 (5,0%) por cultivo (Gadsby et al., 2016).

La correcta identificación de *H. influenzae* empleando pruebas moleculares debe realizarse con la selección los *primers* adecuados los cuales van a delimitar la secuencia que se desee amplificar. Considerando esto, un estudio en Colombia evaluó estandarizar una PCR convencional como formato múltiple para la detección de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* aplicado a pacientes con diagnóstico de meningitis,

donde la PCR estaba enfocada para muestras de LCR obteniendo una concentración mínima detectable de 12,5 fg para *H. influenzae* correspondiente a una densidad bacteriana de 5,6 Unidades Formadoras de colonias (UFC). En este mismo estudio se menciona el uso del *primer omp2* el cual detecta una proteína externa OMP de *H. influenzae* y no presentó reacción cruzada para la identificación de *S. pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* en el PCR múltiple (Parra et al., 2007). Asimismo, en Mongolia, se evaluó mediante una PCR en Tiempo Real, el uso del *primer omp2* versus los *primers* que amplifican el gen *hpd* (el cual codifica la proteína D altamente conservada en la membrana externa de *H. influenzae*). Concluyeron que los *primers* que amplifican el gen *hpd* pueden detectar con mayor sensibilidad (93%) y especificidad (87%) la presencia de *H. influenzae* en muestras de LCR (Wang et al., 2011). Mientras que en Nigeria se evaluó la detección de *H. influenzae*, *S. pneumococo* y *N. meningitidis* por PCR en Tiempo Real a partir de muestras clínicas con sospecha de meningitis. Se detectó que *H. influenzae* estaba presente en dos de 88 muestras utilizando los *primers* que amplifican el gen *hpd* agregando la sonda *Hex* (Peletiri et al., 2021).

En Cajamarca, Perú se evaluó la comparación entre cultivo microbiológico y PCR en Tiempo Real utilizando *primers* con diferente secuencia dirigidos al gen *hpd* para *H. influenzae*, y la sonda *Hex*. Este estudio evaluó muestras nasofaríngeas de niños menores de tres años identificando *H. influenzae* en 131 (37,3%) por PCR y 83 (23,6%) por cultivo microbiológico de un total de 351 muestras lo cual sugirió que el método molecular tuvo una mayor especificidad (más de 17% a 29%) frente a la técnica de cultivo microbiológico (Chien et al., 2013). A pesar de que los *primers* utilizados en estos estudios presentan diferentes secuencias, estos siguen teniendo como sitio diana al gen *hpd*, debido a que es una región altamente conservada en *H. influenzae*.

En Perú, se han realizado estudios de colonización respecto a otras bacterias como *S. pneumoniae* sin embargo los estudios sobre *H. influenzae* en niños son escasos. Uno de los últimos estudios se dio en el año 2003 donde se identificó *H. influenzae* en 0,8% en pacientes con neumonía y 28,8% con meningoencefalitis a partir de aislamientos microbiológicos; sin embargo, estos resultados provenían de pacientes con sintomatología previa y no en niños sanos (Alarco et al., 2008). Esto dificulta la actualización del estado de colonización a nivel local, regional o nacional sobre *H. influenzae* con el fin de prevenir su diseminación y contagio. En relación con la problemática expuesta, el presente trabajo de tesis planteó estandarizar una PCR convencional para la detección de *Haemophilus influenzae* en muestras nasofaríngeas de niños menores de cinco años.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

-Estandarizar una PCR convencional para la detección de *Haemophilus influenzae* en muestras nasofaríngeas de niños menores de cinco años.

1.3.2 Objetivos específicos

-Determinar las condiciones de PCR óptimas de temperatura, $MgCl_2$, *primers* y concentración de ADN para la detección de *H. influenzae* en muestras nasofaríngeas de niños menores de cinco años.

-Determinar el límite de detección de la PCR convencional en muestras nasofaríngeas de niños menores de cinco años.

-Evaluar la sensibilidad de la PCR convencional en muestras nasofaríngeas de niños menores de cinco años con cultivo positivo para *H. influenzae* y otros patógenos nasofaríngeos.

1.4 Justificación

La detección de *H. influenzae* por métodos microbiológicos requieren de tiempo y debido a su baja sensibilidad usualmente se reportan falsos negativos. Asimismo, detectar esta bacteria en niños suele ser aún más complicado. La condición de los niños menores de cinco años conlleva a una alta tasa de colonización y es un paso importante en el desarrollo de infecciones patógenas (Martens et al., 2022). Esto se debe a las condiciones favorables en la nasofaringe, como la mucosa nasal débil y abundantes vasos sanguíneos que proporcionan las condiciones óptimas para la colonización de *H. influenzae* (Ma et al., 2023). Por lo tanto, utilizar técnicas moleculares son una alternativa, debido a que son más sensibles, específicas y rápidas para un diagnóstico temprano (Abdeldaim y Herrmann, 2013).

Por lo expuesto, el presente estudio planteó tres aspectos importantes; desde el enfoque en salud, realizar la estandarización de una PCR convencional aportaría a la oportuna identificación de este microorganismo, aportando a la mejora de la vigilancia epidemiológica de patógenos respiratorios que colonizan principalmente a niños menores de cinco años los cuales son el principal grupo etario afectado por enfermedades respiratorias y considerando que, el primer paso para desarrollar enfermedad invasiva es la previa colonización por este patógeno (Bogaert et al., 2004).

Desde el aspecto económico, se podrían evitar gastos innecesarios en la compra de materiales que no ayudan a una correcta identificación utilizando métodos microbiológicos. Si bien es cierto existen las pruebas moleculares como la PCR en Tiempo Real, sin embargo, se encarece la identificación por el elevado precio de sus reactivos y equipos; así como utilizar tres regiones conservadas para la especificidad de la prueba; *primers (forward y reverse)* y sonda, siendo la sonda uno de los reactivos de mayor costo (Mondragon et al., 2022). En contraste, la técnica de PCR convencional que se utilizará en este estudio empleará reactivos de fácil acceso y bajo costo, además su especificidad solo dependerá del uso de un par de

primers (forward y reverse). Desde el aspecto tecnológico, es recomendable la implementación de la técnica de PCR convencional en los centros de salud debido a que ha demostrado tener una mejor sensibilidad y especificidad en comparación con el *gold standard* (microbiología) para el diagnóstico de este patógeno (Chien et al., 2013). Esto generaría la fomentación del uso de técnicas que proporcionen resultados en corto tiempo implementado especialmente para la vigilancia epidemiológica, realizando así una correcta descripción del escenario epidemiológico del estado de colonización de *H. influenzae* a nivel regional y nacional en niños menores de cinco años.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas de la investigación

2.1.1 *Haemophilus influenzae*

H. influenzae es un cocobacilo gramnegativo, facultativamente anaeróbico que se presenta en dos tipos basados en su polisacárido: capsulado y no capsulado (NTHi) (Kenjale et al, 2009). *H. influenzae* suele ingresar por las vías respiratorias y coloniza la nasofaringe adhiriéndose a las células epiteliales del huésped (Spahich et al., 2012). Colonizan mayormente la nasofaringe de niños y adultos, siendo también causantes de enfermedades invasivas y del tracto respiratorio (Kenjale et al, 2009).

Este microorganismo también se le conoce por poseer variantes tipificables y no tipificables (NTHi). *H. influenzae* tipificable; que presentan capsula, se subdivide en serotipos de a, b, c, d, e y f; siendo el serotipo b (Hib) el más virulento, seguido del serotipo a (Hia) (Langereis y de Jonge, 2020). Las cepas no capsuladas causan otitis media, sinusitis y conjuntivitis (infecciones no invasivas), mientras que las cepas encapsuladas son una causa importante de bacteriemias (Turk, 1984). Los casos graves son causados por el serotipo b (Hib) y se estima que más del 95% de casos son invasivos, principalmente causando meningitis bacteriana en niños antes de la introducción de la vacuna contra Hib en 1980 (Pinto et al., 2019).

Actualmente hay una disminución del serotipo b en casos graves a comparación de los reportes en los años 90, sin embargo, otros serotipos son los causantes de un número creciente de infecciones, de la misma manera con NTHi debido a que no se han desarrollado vacunas contra estas variantes (Guellil et al., 2022). En personas que no presentan enfermedad, *H. influenzae* se considera parte del microbioma comensal en las vías respiratorias superiores donde puede propagarse y causar enfermedad a través de su diseminación por gotas (Watts y Holt, 2019).

2.1.2 Cinética de crecimiento bacteriano

La cinética de crecimiento bacteriano es el aumento de la masa celular que implica su multiplicación. Esta se puede observar a escala individual, lo cual hace referencia a todos los procesos del ciclo celular; y a escala poblacional incluye una cinética de crecimiento (Caycedo et al., 2021).

La evaluación de la cinética del crecimiento bacteriano se realiza empleando un medio de cultivo líquido donde se evalúa cuatro fases. La primera fase es de adaptación a las condiciones ambientales y nutricionales. Luego, la fase exponencial donde el consumo de nutrientes del medio favorece la multiplicación acelerada de los microorganismos. En la siguiente fase, estacionaria, se estabiliza el crecimiento bacteriano debido a la disminución de nutrientes en el medio y se genera la liberación de los productos de desecho. Finalmente, la fase de muerte, donde se da la reducción del número de bacterias viables (Kim et al., 2018).

2.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), es un método enzimático *in vitro* que amplifica una secuencia específica del ADN. Al ser una herramienta específica y sensible puede detectar la presencia de las biomoléculas en una muestra, aun cuando las cantidades se encuentran en picogramos (Erlich et al., 1991).

Los elementos importantes de la reacción son el ADN, la enzima, los cebadores o *primers*, los dNTPs y el ion magnesio. Durante las reacciones, las cadenas del ADN se separan y funcionan como un molde para la acción de la enzima y esta pueda sintetizar en nuevas cadenas. Esta enzima mantiene su funcionalidad a altas temperaturas por lo que se le considera termoestable (Cariello et al., 1991). Los *primers* son dos secuencias; *forward* y *reverse*, que delimitan la secuencia específica que se requiere amplificar. Por otro lado, los dNTPs, son las bases nitrogenadas y con acción de la enzima se pueda sintetizar las cadenas de ADN. El magnesio; al ser un cofactor enzimático, influye en la especificidad de la reacción (Tamay de

Dios et al., 2013).

Todos estos elementos interactúan en las etapas que componen esta técnica: desnaturalización, hibridación y extensión. En la desnaturalización, las cadenas de ADN son separadas a una temperatura de 95°C por un tiempo dependiendo de la secuencia del templado; luego, sigue etapa de hibridación donde los *primers* se alinean al extremo de 3' y para que la temperatura *melting* (T_m) sea óptima debe oscilar entre 50°C a 60°C. Y por último la extensión donde la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado- *primers*, la temperatura óptima es de 72°C y teniendo como resultados a los amplicones o productos de PCR (Pedrosa, 1999). Los termocicladores generan las condiciones de temperatura y tiempo para cada ciclo. Al final de la reacción, los productos de PCR son analizados en geles de agarosa (Tamay de Dios et al., 2013). Esta técnica molecular permite obtener una gran sensibilidad diagnóstica al poder detectar cantidades bajas de ADN y al amplificar la secuencia de este por medio de los *primers* diseñados (Méndez y Pérez, 2004).

III. MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

El presente estudio de tesis fue un estudio secundario de tipo básica, alcance descriptivo con un enfoque cualitativo y diseño no experimental de corte transversal donde se determinó las diferentes condiciones de la PCR convencional como la temperatura de hibridación, MgCl₂ y *primers*, además de la concentración del ADN respecto al límite de detección utilizando una muestra nasofaríngea con cultivo negativo para *H. influenzae*.

3.2 Ámbito temporal y espacial

El presente estudio de tesis inició en el año 2023. Se realizó en el Laboratorio de Infectología Pediátrica (LIP) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, ubicado en el distrito de San Martín de Porres del departamento de Lima, Perú.

3.3 Variables

Las variables independientes son las condiciones de la PCR convencional (curva de temperatura, MgCl₂, *primers* y concentración de ADN), la variable dependiente es la amplificación por PCR del gen *hpd* el cual identifica la presencia de *H. influenzae*.

3.4 Población y muestra

La población de estudio estuvo conformado por las muestras nasofaríngeas de 1000 niños menores de cinco años colectadas en un estudio previo y el tamaño de muestra estuvo conformado por once muestras nasofaríngeas para la evaluación de esta PCR. . Se utilizó para el límite de detección, una muestra nasofaríngea con cultivo negativo a *H. influenzae* y para la evaluación de la PCR diez muestras nasofaríngeas con cultivo positivo a *H. influenzae*. Estas muestras fueron otorgadas por el estudio principal "Distribución de serotipos, biotipo y sensibilidad antibiótica de *Haemophilus influenzae* en niños portadores nasofaríngeos de cinco hospitales en Lima, Perú entre los años 2016-2019", las cuales fueron cedidas con consentimiento informado por otro estudio titulado "Distribución de serotipos y sensibilidad

antibiótica de neumococo en niños portadores nasofaríngeos luego de la introducción de la vacuna 13-valente en Lima, Perú”, el cual enroló y colectó hisopados nasofaríngeos de 1000 niños menores de cinco años que fueron atendidos en su consulta de pediatría, control del niño sano y/o consultorio de vacunación de cinco hospitales nacionales en Lima, Perú durante 2018-2019.

Este estudio previamente nombrado enroló a niños considerados como “niño sano” según la siguiente definición: niño que acude a su control de crecimiento o inmunización y que cuyo familiar refiere que al momento del enrolamiento no padece de ninguna enfermedad importante (meningitis, neumonía o bacteriemia). Se tuvo como criterios de exclusión: a) sospecha de enfermedad aguda seria (neumonía probable, sepsis, bacteriemia, meningitis, encefalitis) y b) uso de antibióticos al momento del enrolamiento (24 horas) (Gonzales et al., 2023)

El estudio principal cedió las muestras nasofaríngeas de los niños cuyos apoderados dieron su consentimiento para su uso en estudios futuros. Esta tesis utilizó solo las muestras colectadas cuyos apoderados hayan brindado el consentimiento previamente mencionado (Anexo A).

3.5 Instrumentos

Se elaboró una ficha de evaluación de recolección de datos donde se colocaron las diferentes variables estudiadas para su evaluación. Para más detalle revisar el Anexo D.

3.6 Procedimientos

La cinética de crecimiento utilizó la cepa *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211 tipo b como control positivo para evaluar el límite de detección de ADN y posterior estandarización. Este aislamiento estándar se reactivó en agar chocolate (TSA + 0.5% de sangre desfibrinada de cordero calentada en baño maría a 70°C) la cual permaneció en incubación a 37°C por 24 horas dentro de una jarra de anaerobiosis manteniendo un ambiente de CO₂ al 5%. Posteriormente,

se tomó una asada de la cepa reactivada del cultivo y se realizó un cultivo *overnight* en caldo Infusión cerebro corazón (BHI) con suplemento Vitox Oxoid® empleando las mismas condiciones de incubación previamente mencionadas (Tikhomirova, 2016).

Al completar la incubación se procedió a medir la densidad óptica (OD) de la suspensión bacteriana y posteriormente obtener un valor entre 0,04 – 0,06. Luego se dispuso 3 mL de la suspensión bacteriana en 12 tubos los cuales se incubaron empleando las mismas condiciones descritas anteriormente, y se tomó las medidas de las absorbancias (625 nm) cada hora en el espectrofotómetro siendo la hora cero la absorbancia de la dilución inicial.

3.6.1 Cálculo de las unidades formadoras de colonias

La cepa de referencia será reactivada en agar chocolate para luego tomar una azada del crecimiento bacteriano y posteriormente incubada en *overnight* en caldo BHI con Vitox Oxoid® en las mismas condiciones de la cinética de crecimiento. Luego se empleó 16 mL de la suspensión bacteriana *overnight* y se depositó en un tubo cónico de 50 mL para centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se realizó dos lavados con 16 mL de PBS, centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, luego se resuspendió en 5 mL de PBS. Se colectó 1 mL de la nueva suspensión y se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, se tomó 100 µL de esta dilución y se colocó en un tubo de microcentrífuga que contenga 900 µL de PBS, así sucesivamente hasta lograr la dilución 10^{-9} (Tikhomirova, 2016).

Una vez concluida las diluciones sucesivas, se tomó 100 µL de cada dilución y se inocularon las placas de agar chocolate para luego sembrar con un asa de drigalski. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas dentro de una jarra de anaerobiosis manteniendo un ambiente de CO₂ al 5%. Finalmente se realizó el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) correspondiente a cada dilución.

3.6.2 Inoculación de la cepa bacteriana y extracción de ADN

Se realizó la reactivación de la cepa de referencia y posterior suspensión bacteriana en

caldo BHI con Vitox Oxoid ® para cumplir la cinética de crecimiento.

Posteriormente se procedió a inocular 20 µL de la suspensión bacteriana en 180 µL de una muestra nasofaríngea negativa para *H. influenzae* por cultivo, la cual se encontraba criopreservada en el medio STGG el cual contiene leche descremada, TSA, glucosa y glicerol. Luego se procedió a extraer el ADN empleando el kit High Pure PCR Template Preparation Kit ROCHE®. Se colectó 200 µL de la suspensión bacteriana y luego se agregó 100 µL de buffer TE (pH 8.0) que contiene una concentración de lisozima a 10 mg/mL e incubó en el Thermomixer® por 15 minutos a 37 C° (Chien et al., 2013). Finalmente se realizó la extracción del ADN empleando el protocolo mencionado en el kit. Se cuantificó el ADN utilizando el Nanodrop®.

3.6.3 Evaluación de las condiciones de PCR

Las condiciones de PCR fueron evaluadas utilizando los *primers* F729 y R819 que amplifican el gen *hpd* (Tabla 1). Para evaluar la concentración de ADN se utilizó la muestra nasofaríngea con cultivo negativo para *H. influenzae* previamente extraído con el protocolo mencionado anteriormente. Asimismo, se utilizó como control positivo la cepa de *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211. También se evaluó la temperatura en 52°C, 54°C, 56°C, 58°C y 60°C, concentración de magnesio y concentración de *primers*.

Tabla 1

Primers para la amplificación del gen hpd de H. influenzae.

Gen	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	Referencia
F729	5' AGA TTG GAA AGA AAC ACA AGA AAA AGA3'	113	Peletiri et al. (2021)
<i>hpd</i>	R819 5' CAC CAT CGGCAT ATT TAA CCA CT 3'		

3.6.3.1 Electroforesis en gel de agarosa. Los amplicones o productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa de diferentes concentraciones utilizando buffer TBE 0,5 X (tris 89 mM, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA pH 8,3) y bromuro de etidio (0,6 mg/mL) utilizando la cámara de electroforesis Biorad® horizontal a diferentes voltajes en distintos tiempos de corrida electroforéticas para determinar las condiciones apropiadas para la correcta visualización de los productos de PCR. El revelado del gel se realizó utilizando el Fotodocumentador Biorad®.

3.6.4 Límite de detección de la PCR convencional

Para evaluar el límite de detección de la PCR se tomó diferentes concentraciones del ADN de la muestra nasofaríngea inoculada con la suspensión bacteriana de *H. influenzae*, los cuales corresponderán a una concentración equivalente a las diluciones de UFC previamente analizadas. Se utilizará como control positivo la cepa de *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211.

3.6.5 Evaluación de la sensibilidad diagnóstica de la PCR en muestras nasofaríngeas y otros patógenos nasofaríngeos

Se empleó muestras nasofaríngeas positivas por cultivo para *H. influenzae* elegidas azar. Asimismo, se emplearán cepas estándar de *S. pneumoniae* D39, *S. aureus* (ATCC® 43300) y *N. meningitidis* (ATCC® 13077) como controles negativos y una muestra control positiva de *H. influenzae* (ATCC® 10211). Finalmente se visualizó los productos de la PCR en el gel de agarosa al 2%.

3.7 Análisis de datos

Se realizó el análisis analítico y observacional utilizando gráficos y tablas a partir de los resultados obtenidos. Para calcular los parámetros de la estandarización y la evaluación de los resultados se utilizó los programas de Excel v.16 y STATA SE v.18, respectivamente, a partir de las variables mencionadas.

3.8 Consideraciones éticas

El presente estudio de tesis es un estudio secundario del proyecto de investigación titulado "Distribución de serotipos, biotipo y sensibilidad antibiótica de *Haemophilus influenzae* en niños portadores nasofaríngeos de cinco hospitales en Lima, Perú entre los años 2016-2019" el cual contó con código de registro del Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) y aprobación del comité de ética 2075677 de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Anexo B). El autor principal cedió las muestras para la realización del presente estudio de tesis.

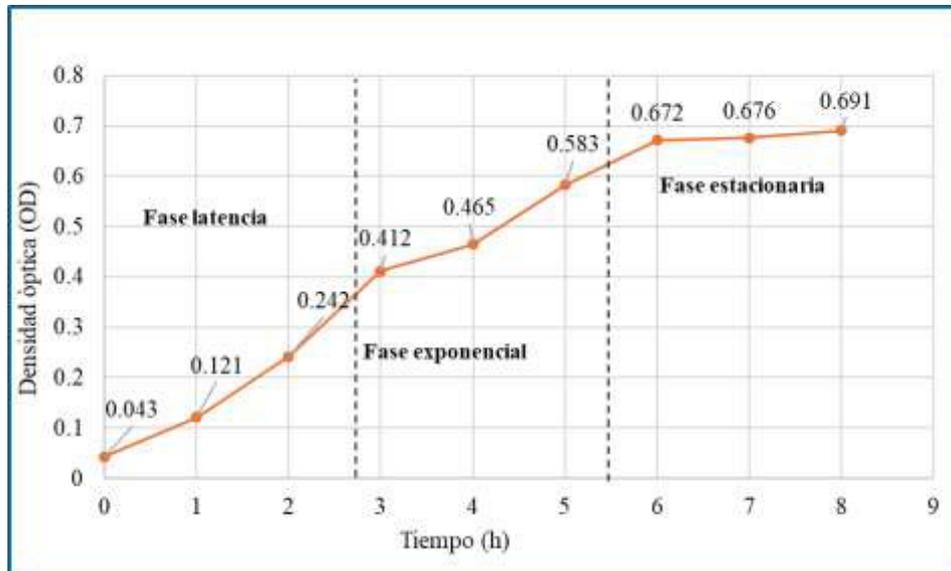
IV. RESULTADOS

4.1 Cinética de crecimiento y UFC de *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211

La fase latencia de la cepa de referencia *Haemophilus influenzae* está comprendida en las tres primeras horas. La fase exponencial o logarítmica inició en la hora cuatro. La fase estacionaria inicio entre la hora seis y siete prolongándose hasta el final del ensayo (Figura 1).

Figura 1

Cinética de crecimiento de H. influenzae



Nota. Las medidas fueron resultado del promedio de tres ensayos diferentes con las mismas condiciones y cepa de referencia. Fuente propia.

Las diluciones comprendidas entre 10^{-1} y 10^{-4} dieron como resultado un número de colonias incontables. Las diluciones entre 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} dieron como resultados 329, 62 y 6 UFC respectivamente. Las diluciones 10^{-8} y 10^{-9} no presentaron crecimiento bacteriano (Tabla 2).

Tabla 2

Conteo de las UFC correspondiente a cada dilución de H. influenzae

Dilución	Nº colonias en 100 uL	UFC/mL
10 ⁻¹	Incontables	-
10 ⁻²	Incontables	-
10 ⁻³	Incontables	-
10 ⁻⁴	Incontables	-
10 ⁻⁵	329 UFC	3,29 x 10 ⁸
10 ⁻⁶	62 UFC	6,20 x 10 ⁸
10 ⁻⁷	6 UFC	0,6 x 10 ⁸
10 ⁻⁸	0	0
10 ⁻⁹	0	0

Nota. Fuente propia.

4.2 Determinación de las condiciones de la PCR convencional

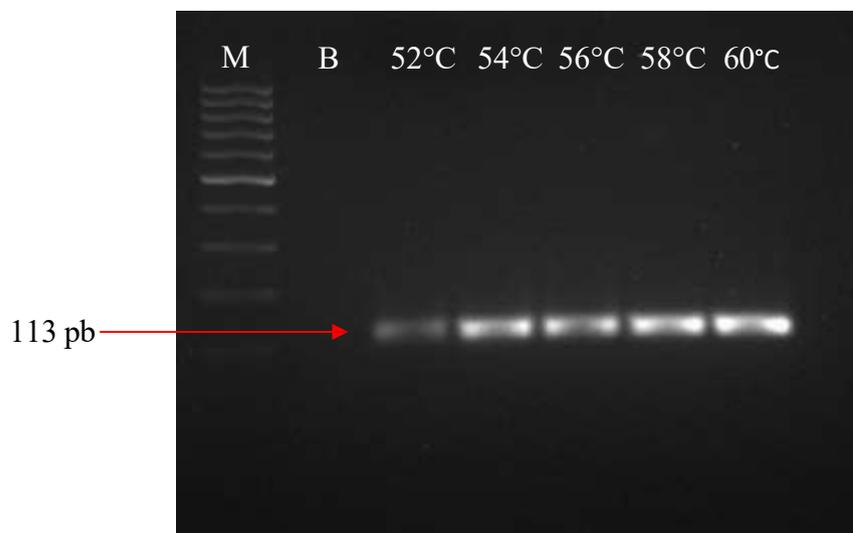
La concentración de *primers* adecuada fue de 7,5 µM y se utilizó las condiciones universales proporcionadas por el kit de PCR GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase Promega® para la concentración de MgCl₂ y dNTPs. La concentración de ADN utilizada fue de 10 ng por reacción proveniente de la cepa de referencia. Se utilizó un volumen de ADN de 5 µl y un volumen final de 22 µL por reacción (Tabla 3).

Las condiciones de desnaturalización, hibridación y extensión fueron modificadas a partir de la referencia proporcionada del kit PCR Promega® (Tabla 4). La temperatura de hibridación adecuada fue de 60°C y a 40 ciclos observando una banda intensa en dicho producto utilizando un gel de agarosa al 2% con 70 voltios a 60 minutos (Figura 2).

Tabla 3*Supermix de la PCR estandarizada*

	Concentración Inicial	Concentración Final	μL
H ₂ O			11,95
Primer F	7,5 μM	0,3 μM	0,88
Primer R	7,5 μM	0,3 μM	0,88
Buffer	5X	1X	4,4
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,44
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,32
Taq Polimerasa	5U/ μL	0,03 U/rxn	0,132
ADN (ng/ μL)	-	-	5
Volumen final (μL)			22

Nota. Adaptado de las condiciones dadas por el kit PCR Promega®. Fuente propia.

Figura 2*Determinación de la temperatura de hibridación*

Nota. Gel electroforesis del resultado de PCR convencional. M; marcador de peso molecular de 100 pb, B; blanco. Fuente propia.

Tabla 4

Condiciones de la PCR convencional para la detección de H. influenzae

Condiciones del equipo		Condiciones de electroforesis	
1X	94°C por 2 min	Agarosa al 2%	1,2 g
40X	94°C por 30 sec	0,5X buffer TBE	60 mL
	60°C por 90 sec	0,6 µg/µL de bromuro de etidio	6 µL
	72°C por 30 sec	Cargar 8 µL de muestra y 7 µL de 100 pb marcador	
1X	72°C por 5 min		
∞	4°C	Corrida a 70V por 1h	

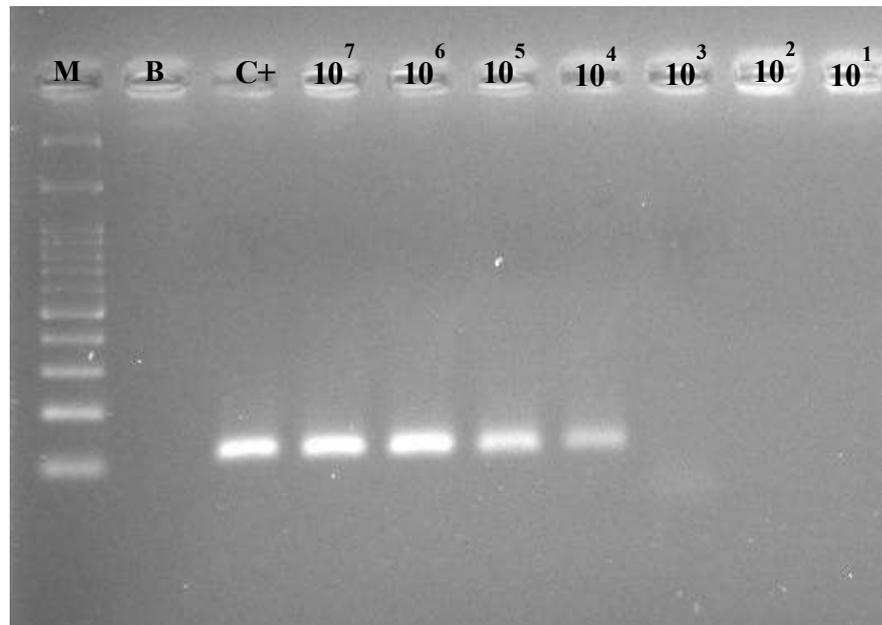
Nota. Adaptado de las condiciones dadas por el del kit PCR Promega® para conveniencia del estudio. Las condiciones de la electroforesis post-reacción están sujetas a cambios en función a la cantidad de muestras que se analizará. Fuente propia.

4.3 Limite de detección de la PCR

En las diluciones seriadas para la determinación de las UFC se obtuvo como límite de detección referencial $6,20 \times 10^8$ UFC/mL (Anexo C). La muestra nasofaríngea negativa para *H. influenzae* inoculada con la cepa de referencia obtuvo una concentración de ADN de 36 ng por reacción mientras que en un volumen de 5 µL es equivalente a 183 ng. Se realizó diluciones seriadas en factor 1/10 de $3,29 \times 10^7$ - 10^0 UFC/mL obteniéndose amplificación hasta una carga bacteriana de 10^4 siendo equivalente a una concentración de 0,183 ng por reacción (Figura 3). Por lo tanto, el límite de detección para muestras nasofaríngeas es de $3,29 \times 10^4$ UFC/mL.

Figura 3

Evaluación del límite de detección de la PCR



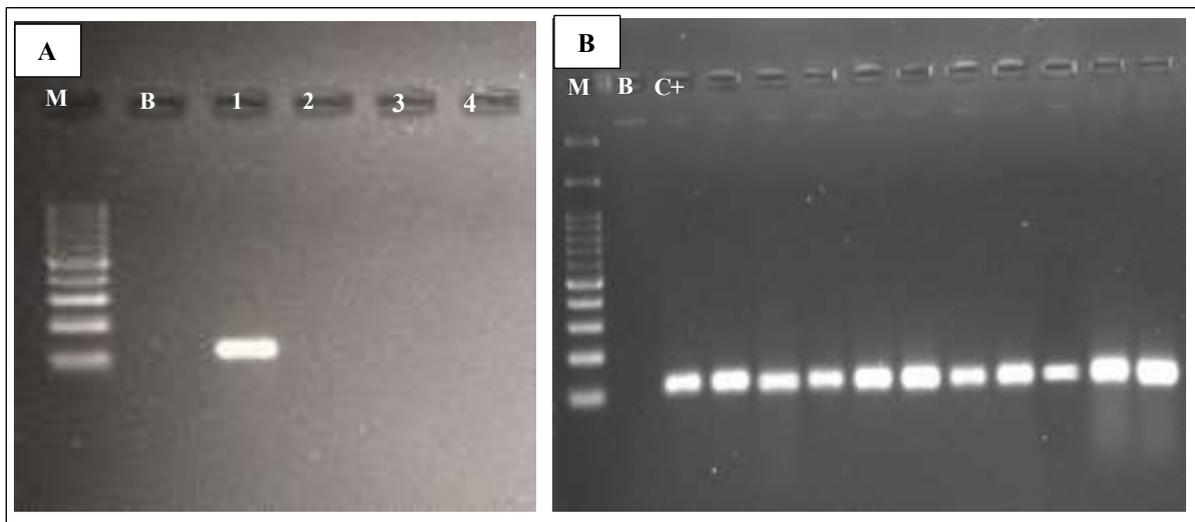
Nota. Amplicones de cada dilución de ADN a partir de la muestra nasofaríngea inoculada con *H. influenzae* ATCC® 10211. M; marcador de peso molecular de 100 pb, B; blanco, C+; *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211. Fuente propia.

4.4 Evaluación de la sensibilidad diagnóstica de la PCR

La PCR para la evaluación diagnóstica mediante el gel electroforético muestra que la amplificación para *H. influenzae* sin mostrar banda en los productos de controles negativos (Figura 4A). De la misma manera, esta PCR identificó *H. influenzae* en diez muestras que fueron positivas por microbiología (Figura 4B).

Figura 4

Evaluación de la sensibilidad diagnóstica



Nota. M; marcador de peso molecular de 100 pb, B; blanco. A: Gel electroforesis de *H. influenzae* como control positivo y otros patógenos como controles negativos. 1; *H. influenzae* ATCC® 10211, 2; *S. aureus* ATCC® 43300, 3; *S. pneumoniae* D39, 4; *N. Meningitidis* ATCC® 13077. B: Muestras positivas a *H. influenzae* evaluadas previamente por microbiología, C+; *H. influenzae* ATCC® 10211. Fuente propia.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio, se estandarizó una PCR convencional para la detección de *H. influenzae* en muestras nasofaríngeas de niños menores de cinco años considerados como población de riesgo. La temperatura de hibridación óptima de la PCR fue 60°C con 40 ciclos, las concentraciones ideales fueron 1,5 mM en MgCl₂, 0,2 mM para dNTP, 7,5 mM en *primers* y el rango de concentración óptimo de ADN fue de 0,183-183 ng por reacción. El límite de detección fue 3,29 x10⁴ UFC/mL correspondiente a una concentración de ADN de 0,183 ng. De un total de diez muestras positivas identificadas por microbiología, la PCR detectó *H. influenzae* en todas las muestras. La evaluación con controles negativos detecto solo *H. influenzae* sin amplificar en *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *N. meningitidis*. Nuestros resultados sugieren que el emplear técnicas moleculares son una alternativa eficaz como método diagnóstico rápido de esta bacteria a partir de muestras donde la densidad bacteriana es baja. Entre las condiciones de este PCR, los resultados fueron dados gracias al kit Promega® que incluye las concentraciones iniciales de dNTP y MgCl₂ obteniendo una concentración final óptima de 0,2 mM y 1,5 mM, respectivamente. La concentración óptima de *primers* fue 7,5 mM, sin embargo, un estudio en Estados Unidos evaluó el desarrollo de un PCR en tiempo real para la detección de patógenos causantes de meningitis en muestras de LCR, entre ellos utilizando el *primer* dirigido al gen *hpd* para la detección de *H. influenzae* a una concentración de 300 nM. Asimismo, empleó un kit PCR *master mix* Kentalq® que contiene MgCl₂ a una concentración de 17,5 mM y dNTP a 1 mM obteniendo una sensibilidad del 95% y especificidad del 99,7% en el diagnóstico (Voung et al., 2016).

Por otro lado, la temperatura de hibridación óptima en nuestro estudio fue de 60°C a 40 ciclos, sin embargo, entre otros estudios de PCR en tiempo real obtuvieron una amplificación óptima a 30 ciclos para muestras nasofaríngeas empleando una temperatura de hibridación de 50°C (Tian et al., 2012). Asimismo, un estudio en China donde evaluaron muestras

nasofaríngeas obtuvo resultados óptimos con 35 ciclos y a una temperatura de 54°C empleando un PCR multiplex para identificar *H. influenzae* (Fan et al., 2018). Dentro de este contexto, las variaciones en el protocolo de nuestro PCR frente a otras técnicas moleculares dependerían del kit utilizado, técnica de PCR empleado si es en tiempo real o convencional, así como la secuencia del *primer* del cual es necesario evaluar para determinar la temperatura de hibridación.

La concentración óptima de ADN se encontró en un rango de 0,183 – 183 ng por reacción para determinar el límite de detección de la prueba molecular. En Nigeria se estandarizó un PCR multiplex para la detección de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* aplicado a muestras de líquido cefalorraquídeo considerando una concentración óptima de ADN entre 0,03 – 50,5 ng/ μL por reacción (Peletiri et al., 2021). Esto sugiere que la variación de concentración es debido al tipo de muestra. Nuestro estudio evaluó la concentración de ADN a partir de una muestra nasofaríngea de un niño sano el cual tiene menor densidad bacteriana comparado con un paciente con enfermedad lo que conllevaría a una baja sensibilidad de identificación si se utiliza como método el cultivo microbiológico al contrario del PCR como método de detección de bacterias viables y no viables en la muestra.

El límite de detección obtenido fue de $3,29 \times 10^4$ UFC/mL para una densidad bacteriana mínima detectable equivalente a una concentración de ADN de 0,183 ng. En Australia, se realizó el análisis de densidad bacteriana en muestras nasofaríngeas de niños sanos. Entre las bacterias evaluadas se encontraba *H. influenzae* con una densidad bacteriana detectable por PCR en tiempo real de $6,5 \times 10^2$ a $1,8 \times 10^8$ células por mL lo que conllevó al límite de detección óptimo de la PCR (Binks et al., 2011). De igual manera en Perú se analizó la densidad bacteriana entre asociaciones de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *S. aureus* en muestras nasofaríngeas de niños sanos siendo para *H. influenzae* una densidad bacteriana mínima detectable de 10^4 UFC/mL por PCR cuantitativo (Chien et al., 2013).

Si bien en nuestro estudio no se ha analizado la asociación de la densidad bacteriana de *H. influenzae* con otros patógenos, se infiere que existe alguna interacción bacteriana y otros factores del huésped que influyen en la colonización (Jacoby et al., 2007). Un estudio de datos longitudinales y análisis del estado de colonización en niños sanos de Australia encontró una asociación positiva entre *S. pneumoniae* y *H. influenzae*; sin embargo, estudios in vitro sugieren la inhibición de crecimiento de *H. influenzae* causado por el peróxido de hidrogeno producido por *S. pneumoniae* (Pericone et al., 2000). Otro estudio epidemiológico en niños con infección respiratoria aguda mostró la asociación positiva entre *H. influenzae* en presencia de *M. catarrhalis*, otro colonizaste de la nasofaringe (Pettigrew et al., 2008). En este contexto, el mecanismo que ocurre en la nasofaringe es complejo y existen factores externos propios del huésped que pueden afectar o no la densidad bacteriana de *H. influenzae* y como consecuencia su colonización.

Por otro lado, esta PCR utilizó el *primer* dirigido al gen *hpd* el cual codifica la proteína D y se encuentra altamente conservado en la superficie de la membrana de *H. influenzae* además es altamente específico y sensible para la detección de *H. influenzae* encapsulados y no encapsulados (Wang et al., 2011). En este estudio se observó que al utilizar los controles negativos de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *S. aureus*; considerados como patógenos colonizantes de la nasofaringe, no amplificó para ninguno de ellos. Asimismo, la evaluación diagnóstica identificó *H. influenzae* en diez muestras positivas las cuales fueron evaluadas previamente por la técnica microbiológica *gold estándar*. De hecho *H. influenzae* presenta cierta similitud en la morfología de colonias y características bioquímicas con otras especies como lo es *H. haemolyticus* siendo un microorganismo comensal de la nasofaringe el cual puede resultar en falsos positivos (Murphi et al., 2007).

Un estudio en Estados Unidos elaboró tres ensayos de PCR en tiempo real con el gen *hpd* con diferentes secuencias comparando con otros genes dirigidos a *H. influenzae* obteniendo

una especificidad del 91% y sensibilidad del 88% a comparación de los otros genes con 80%; por lo tanto, los primers dirigidos al gen *hpd* obtuvieron una mayor sensibilidad (Blinks et al., 2012). Dentro de este marco, al utilizar el ensayo PCR con *primers* dirigidos al gen *hpd*, es altamente específico para la identificación de *H. influenzae* proporcionando una herramienta adecuada para la diferenciación de este frente a otros microorganismos (Theodore et al., 2012).

Entre las limitaciones del estudio, este PCR convencional obtuvo un límite de detección bajo esperando una amplificación a diluciones mínimas en comparación de otras técnicas moleculares cuantitativas. Por otro lado, esta técnica convencional continúa siendo costo beneficio ya que pudo detectar *H. influenzae* en muestras nasofaríngeas con un tiempo de criopreservación mayor a dos años donde la densidad bacteriana es mínima. Otro factor determinante fue la metodología de UFC donde se observó una amplificación del PCR a una dilución no esperada. Se puede inferir que el proceso de dilución y posterior extracción de ADN empleando el kit existe una pérdida de bacterias viables en el medio la cual afectaría la amplificación en el PCR como posterior sobreestimación de colonización bacteriana por lo que se recomienda la metodología en copias por genoma. A pesar de ello, la escasa bibliografía en la metodología de UFC en esta bacteria aporta información sobre su crecimiento bacteriano desde la cepa ATCC en comparación con una muestra nasofaríngea considerando así el límite de detección.

VI. CONCLUSIONES

-Las condiciones de la PCR fueron 1,5 mM en MgCl₂, 0,2 mM para dNTP, 7,5 mM y 0.183 – 183 ng de ADN a una temperatura de hibridación de 60°C con 40 ciclos.

-El límite de detección fue de $3,29 \times 10^4$ UFC/mL con una concentración de ADN de 0.183 ng para muestras nasofaríngeas.

-El gen *hpd* identificó *H. influenzae* en diez muestras nasofaríngeas y sin amplificación en *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *S. aureus*.

VII. RECOMENDACIONES

-Se recomienda realizar una comparación del límite de detección empleando el método de copias por genoma con la técnica de Unidades formadoras de colonias. Esto permitirá observar la pérdida de bacterias viables empleando las UFC por lo que actualmente la bibliografía referencial utiliza el primer método en mención.

-Se recomienda reorganizar el volumen final de *primers* en función de la concentración con la finalidad de optimizar el uso de los reactivos en caso se evalúen grandes cantidades de muestras.

-Se recomienda evaluar el voltaje y tiempo de la electroforesis en función del tamaño del gel que se empleará, con ello la cantidad de muestras que el investigador plantea analizar.

-En más de diez años los últimos estudios epidemiológicos en Perú referentes a colonización de *H. influenzae* en niños sanos no se han actualizado, por lo tanto, se recomienda emplear esta PCR como método.

VIII. REFERENCIAS

- Azzari, C., Moriondo, M., Indolfi, G., Massai, C., Becciolini, L., de Martino, M. y Resti, M. (2008). Los métodos de detección molecular y la serotipificación realizada directamente en muestras clínicas mejoran la sensibilidad diagnóstica y revelan una mayor incidencia de enfermedad invasiva por *Streptococcus pneumoniae* en niños italianos. *Revista de microbiología médica*, 57, 1205–1212. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/000935-0>
- Alarco, R., Cavero, V., Hernández, H., y Tapia, E. (2008). Sensibilidad antibiótica de cepas de *Haemophilus spp* aisladas de pacientes pediátricos en un hospital general entre los años 2003-2006. *Revista Médica Herediana*, 19, 61-67 <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v19n2/v19n2ao3.pdf>
- Abdeldaim, G., y Herrmann, B. (2013). PCR detection of *Haemophilus influenzae* from respiratory specimens. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 943, 115–123. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_7
- Amin, M., Ghaderpanah, M., y Navidifar, T. (2016). Detection of *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in CSF specimens of children suspicious of Meningitis in Ahvaz, Iran. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 32(10), 501–506. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2016.08.009>
- Bogaert, D., De Groot, R., y Hermans, P. W. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet. Infectious diseases*, 4(3), 144–154. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00938-7)
- Binks, M. J., Temple, B., Kirkham, L. A., Wiertsema, S. P., Dunne, E. M., Richmond, P. C., Marsh, R. L., Leach, A. J., y Smith-Vaughan, H. C. (2012). Molecular surveillance of

true nontypeable *Haemophilus influenzae*: an evaluation of PCR screening assays.

PloS one, 7(3), e34083.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034083>

Cariello, N., Swenberg, J., y Skopek, T. (1991). Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis.

Nucleic Acids Res, 19(15), 4193-4198. <https://doi.org/10.1093/nar/19.15.4193>

Chien, Y. W., Vidal, J. E., Grijalva, C. G., Bozio, C., Edwards, K. M., Williams, J. V., Griffin, M. R., Verastegui, H., Hartinger, S. M., Gil, A. I., Lanata, C. F., y Klugman, K. P.

(2013). Density interactions among *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in the nasopharynx of young Peruvian children.

The Pediatric infectious disease journal, 32(1), 72–77.

<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318270d850>

Clementi, C., y Murphy, T. (2011). Non-typeable *Haemophilus influenzae* invasion and persistence in the human respiratory tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 18(1).

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00001>

Caycedo, L., Ramírez, L., y Suárez, D. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una

mirada desde la química. *Nova*, 19 (36), 49-94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>

Dealler, S., Foweraker, J., Lawson, P., y Fortune, S. (1991). Provisional identification of *Haemophilus influenzae* from sputum cultures within 1h by rapid enzyme tests.

Journal of medical microbiology, 35(1), 49–52. [https://doi.org/10.1099/00222615-35-](https://doi.org/10.1099/00222615-35-1-49)

[1-49](https://doi.org/10.1099/00222615-35-1-49)

Erllich, H., Gelfand, D., y Sninsky, J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction.

Science (New York, N.Y.), 252(5013), 1643–1651.

<https://doi.org/10.1126/science.2047872>

- Fan, X., Liu, X., Ji, L., Cai, D., Jiang, J., Zhu, J., Sun, A., y Yan, J. (2018). Epidemiological analysis and rapid detection by one-step multiplex PCR assay of *Haemophilus influenzae* in children with respiratory tract infections in Zhejiang Province, China. *BMC infectious diseases*, *18*(1), 414. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3295-2>
- Gadsby, N., Russell, C., McHugh, M., Mark, H., Conway, A., Laurenson, I., Hill, A., y Templeton, K (2016). Comprehensive Molecular Testing for Respiratory Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *62*(7), 817– 823. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1214>
- Guellil, M., Keller, M., Dittmar, J., Inskip, S., Cessford, C., Solnik, A., Kivisild, T., Metspalu, M., Robb, J., y Scheib, C. (2022). An invasive *Haemophilus influenzae* serotype b infection in an Anglo-Saxon plague victim. *Genome biology*, *23*(1), 22. <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-021->
- Gonzales, B. E., Mercado, E. H., Castillo-Tokumori, F., Montero, A. E., Luna-Muschi, A., Marcelo-Ragas, M., Campos, F., Chaparro, E., Del Águila, O., Castillo, M. E., Saenz, A., Reyes, I., Hernandez, R., y Ochoa, T. J. (2023). Pneumococcal serotypes and antibiotic resistance in healthy carriage children after introduction of PCV13 in Lima, Peru. *Vaccine*, *41*(28), 4106–4113. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.05.042>
- Heinz, E. (2018). The return of Pfeiffer’s bacillus: Rising incidence of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Microbial genomics*, *4*(9), e000214. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000214>
- Jacoby, P., Watson, K., Bowman, J., Taylor, A., Riley, T. V., Smith, D. W., Lehmann, D., y Kalgoorlie Otitis Media Research Project Team (2007). Modelling the co- occurrence of *Streptococcus pneumoniae* with other bacterial and viral pathogens in the upper respiratory tract. *Vaccine*, *25*(13), 2458–2464.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.020>

Kenjale, R., Meng, G., Fink, D., Juehne, T., Ohashi, T., Erickson, H., Waksman, G., y St Geme, J. W., 3rd. (2009). Structural determinants of autoproteolysis of the *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter. *Infection and immunity*, 77(11), 4704–4713.

<https://doi.org/10.1128/IAI.00598-09>

Khattak, Z. E., y Anjum, F. (2023). *Haemophilus influenzae* Infection. In *StatPearls*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562176/>

Kim, K., Kim, S., y Jeon, J. (2018). Visual Estimation of Bacterial Growth Level in Microfluidic Culture Systems. *Sensors*, 18(2), 447.

<https://doi.org/10.3390/s18020447>

Langereis, J., y de Jonge, M. (2020). Unraveling *Haemophilus influenzae* virulence mechanisms enable discovery of new targets for antimicrobials and vaccines. *Current opinion in infectious diseases*, 33(3), 231–237.

<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000645>

Mukundan, D., Ecevit, Z., Patel, M., Marrs, C., y Gilsdorf, J. (2007). Pharyngeal colonization dynamics of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in healthy adult carriers. *Journal of clinical microbiology*, 45(10), 3207–3217.

<https://doi.org/10.1128/jcm.00492-07>

Murphy, T. F., Brauer, A. L., Sethi, S., Kilian, M., Cai, X., y Lesse, A. J. (2007). *Haemophilus haemolyticus*: a human respiratory tract commensal to be distinguished from *Haemophilus influenzae*. *The Journal of infectious diseases*, 195(1), 81–89.

<https://doi.org/10.1086/509824>

Martens, L., Kaboré, B., Post, A., van der Gaast-de Jongh, C. E., Langereis, J. D., Tinto, H., Jacobs, J., van der Ven, A. J., de Mast, Q., y de Jonge, M. I. (2022). Nasopharyngeal

- colonisation dynamics of bacterial pathogens in patients with fever in rural Burkina Faso: an observational study. *BMC infectious diseases*, 22(1), 15.
<https://doi.org/10.1186/s12879-021-06996-7>
- Mondragon, V., Moreno, N., Sánchez, L., y Gómez, A. (2022). Técnicas microbiológicas y moleculares para la identificación de *Salmonella* sp en la industria avícola: una revisión sistemática de alcance. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 33(6), e21268.
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v33i6.21268>
- Ma, C., Zhang, Y., y Wang, H. (2023). Characteristics of *Haemophilus influenzae* carriage among healthy children in China: A meta-analysis. *Medicine*, 102(44), e35313.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000035313>
- Organización Panamericana de la Salud. (s. f.). *Haemophilus influenzae*.
<https://www.paho.org/es/temas/haemophilus-influenzae>
- Oliver, S., Moro, P., y Blain, A. (18 de agosto de 2021). *Haemophilus influenzae*. *Centers for Disease Control and Prevention*.
<https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hib.html>
- Organización Mundial de la Salud. (17 de mayo del 2024). *La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana*.
<https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-humanhealth#:~:text=Los%20pat%C3%B3genos%20de%20alta%20prioridad,en%20los%20establecimientos%20de%20salud.>
- Pedrosa, A. (1999). Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 3(2). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S1025-02551999000200011&lng=es&tlng=es#:~:text=http%3a%2Fscielo.sld.cu%2Fscielo.php%3Fsc

[ript%3Dsci_arttext%26pid%3DS1025%2D02551999000200011%26lng%3Des%26tln
g%3Des.](#)

Pericone, C. D., Overweg, K., Hermans, P. W., y Weiser, J. N. (2000). Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infection and immunity*, 68(7), 3990–3997. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.3990-3997.2000>

Pantigozo, P., Aguilar, E., Santivañez, S. y Quispe, M. (2006). *Haemophilus influenzae*, serotificación y biotificación de paciente con IRAS del hospital EsSalud- Cusco. *Situa*, 15(1,2), 31-36. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/situa/2006_n1-2/pdf/a06.pdf

Pettigrew, M. M., Gent, J. F., Revai, K., Patel, J. A., y Chonmaitree, T. (2008). Microbial interactions during upper respiratory tract infections. *Emerging infectious diseases*, 14(10), 1584–1591. <https://doi.org/10.3201/eid1410.080119>

Peletiri, I., Ikeh, E., Ayanbimpe, G., y Nna, E. (2021). Molecular detection and characterization of bacteria from CSF samples of patients with suspected cerebrospinal meningitis in parts of northern Nigeria using metagenomic DNA extracts. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 22(3), 365-376. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v22i3.8>

Parra, E., Castañeda, E., y Moreno, J. (2007). Identificación de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* por reacción en cadena de la polimerasa. *Biomédica*, 27 (3), 454-460. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572007000300015&lng=en&tlng=es.](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572007000300015&lng=en&tlng=es)

Pinto, M., González-Díaz, A., Machado, M. P., Duarte, S., Vieira, L., Carriço, J. A., Marti, S.,

- Bajanca-Lavado, M. P., y Gomes, J. P. (2019). Insights into the population structure and pan-genome of *Haemophilus influenzae*. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 67, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.10.025>
- Resolución Ministerial N°719/2018, Norma técnica de salud que establece el esquema nacional de vacunación, NTS N°141-MINSA/2018/DGIESP. (1 de agosto de 2018). Ministerio de Salud. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/948769/rm-719-2018-minsa.pdf>
- Spahich, N. A., Hood, D. W., Moxon, E. R., y St Geme, J. W., 3rd. (2012). Inactivation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide biosynthesis genes interferes with outer membrane localization of the hap autotransporter. *Journal of bacteriology*, 194(7), 1815–1822. <https://doi.org/10.1128/jb.06316-11>
- Shooraj, F., Mirzaei, B., Mousavi, S. F., y Hosseini, F. (2019). Clonal diversity of *Haemophilus influenzae* carriage isolated from under the age of 6 years children. *BMC research notes*, 12(1), 565. <https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-019-4603-7>
- Slack, M. P. E., Cripps, A. W., Grimwood, K., Mackenzie, G. A., y Ulanova, M. (2021). Invasive *Haemophilus influenzae* Infections after 3 Decades of Hib Protein Conjugate Vaccine Use. *Clinical microbiology reviews*, 34(3), e0002821. <https://doi.org/10.1128/CMR.00028-21>
- Turk, D. (1984). The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. *Journal of medical microbiology*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1099/00222615-18-1-1>
- Tian, G., Zhang, L. J., Wang, X. L., Zhang, L., Li, S. F., Gu, C. M., Sun, J. y Cui, B. Y. (2012). Rapid detection of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in

- nasopharyngeal swabs by multiplex PCR. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 25(3), 367–371. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2012.03.016>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo., C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimeras (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- Tikhomirova, A. (2016). *Haemophilus influenzae survival and biofilm formation in a complex physical, chemical, and multi-species environment* [tesis de pregrado para optar el título profesional, The University of Adelaide]. <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/99887/2/02whole.pdf>
- Tsang, R., y Ulanova, M. (2017). The changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease: Emergence and global presence of serotype a strains that may require a new vaccine for control. *Vaccine*, 35(33), 4270–4275. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.001>
- Tabatabaei, S., Mohammadzadeh, S., Zahraei, S., Mahmoudi, S., Ghandchi, G., Hoseini-Alfatemi, S., Karimi, A., y Shamshiri, A. (2021). Effect of *Haemophilus influenzae* Type b Vaccination on Nasopharyngeal Carriage Rate in Children, Tehran, 2019. *BioMed research international*, 2021, 492385 <https://doi.org/10.1155/2021/4923852C>
- Vuong, J., Collard, J. M., Whaley, M. J., Bassira, I., Seidou, I., Diarra, S., Ouédraogo, R. T., Kambiré, D., Taylor, T. H., Jr, Sacchi, C., Mayer, L. W., y Wang, X. (2016). Development of Real-Time PCR Methods for the Detection of Bacterial Meningitis Pathogens without DNA Extraction. *PloS one*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal>.
- Wang, X., Mair, R., Hatcher, C., Theodore, M. J., Edmond, K., Wu, H., y Mayer, L. W. (2011).

Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitis surveillance with a new real-time PCR assay to detect *Haemophilus influenzae*. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(4), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.11.004>

Watts, S., y Holt, K. (2019). Hicap: In Silico Serotyping of the *Haemophilus influenzae* Capsule Locus. *Journal of clinical microbiology*, 57(6), e00190-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00190-19>

Wen, S., Feng, D., Chen, D., Yang, L., y Xu, Z. (2020). Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. *Infection, genetics, and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 80, 104205. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104205> [pone.0147765](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147765)

IX. ANEXOS

Anexo A. Consentimiento informado.

HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: Distribución de serotipos y sensibilidad antibiótica de neumococo en niños portadores nasofaríngeos luego de la introducción de la vacuna 13-valente en Lima, Perú.

Sede Hospitalaria: _____

Investigadores del Proyecto:

Dr. Mosheh M. Alcarraz (Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Hospital Cayetano Heredia (HCH)), Dra. Alessandra Luna (UPCH), Lic. Erik H. Mercad (UPCH), Dr. Eduardo Chaparro (HCH), Dr. Francisco Campos (Hospital San Bartolomé), Dra. Olguita Del Águila (Hospital Nacional E. Rebagliati M.), Dra. María Esther Castillo (Inst. Nacional de Salud del Niño), Dr. Andrés Saenz (Hospital Daniel Alcides Carrión), Dra. Theresa J. Ochoa Woodell (UPCH).

1) ¿De qué se trata el proyecto?

El neumococo es un microbio que puede ubicarse en el interior de la nariz y la garganta de niños sanos; pero, en ocasiones, puede producir enfermedades como meningitis (infección al cerebro), neumonía, infecciones en el oído, entre otras. La transmisión del neumococo se ve facilitada por el elevado número de niños que tienen microbios en la nariz. Hoy tenemos vacunas contra el neumococo, pero no eliminan totalmente la presencia del neumococo en la nariz (estado de portador). El propósito de este estudio es saber si su hijo tiene el neumococo en la nariz a pesar de estar sano. Para esto, le tomaremos una muestra de la nariz con un hisopo y le haremos algunas preguntas sobre la salud de su hijo. También nos interesa conocer si existe resistencia del neumococo contra los antibióticos (si funcionan o no). Esto lo mediremos en el laboratorio. Su niño no recibirá ningún tratamiento. En este proyecto participarán aproximadamente 1000 niños de 5 hospitales de Lima.

2) ¿Quiénes pueden participar en el proyecto?

Podrán participar niños de 2 meses a 2 años de edad que acudan al Programa de Control del Niño Sano o al Programa de Crecimiento y Desarrollo o a Vacunación de este hospital. Pueden participar niños sanos o con una leve infección respiratoria superior (resfío común, tos leve, rinorrea o "moquitos", estornudos, temperatura menor de 38.5°C). Pueden participar niños vacunados o no contra el neumococo.

3) ¿Cómo se realizará la toma y análisis de la muestra?

Se usará un hisopo flexible y muy delgado, especialmente diseñado para este tipo de muestras. Se sostendrá al niño fijando su cabeza con cuidado, se introducirá el hisopo por la fosa nasal y se deslizará suavemente hasta al fondo de la nariz. Luego se retirará y se colocará en un medio especial para el crecimiento del neumococo. Las muestras se analizarán en el Laboratorio de Infectología Pediátrica de la UPCH. Las muestras las guardaremos por 10 años, para poder buscar otros microbios en el futuro.

Favor de leer cuidadosamente lo siguiente, marcar "Sí" o "No" e incluir sus iniciales y la fecha.

Estoy de acuerdo con que la muestra de la nariz de mi hijo se almacene para uso futuro de investigaciones relacionada a otros microbios, aprobados por los Comités de Ética de investigación en seres humanos.

___ **SI** ___ **NO** **Iniciales** _____ **Fecha** _____

Deseo que se me contacte para estudios futuros si son aprobados por los Comités de Ética (de la UPCH y/o del Hospital) para que yo tenga la opción de proveer consentimiento para que un investigador use las muestras de mi hijo.

- () Sí, quiero la opción de proveer consentimiento nuevamente cada vez que un estudio futuro se apruebe
() No, no necesito proveer consentimiento nuevamente cada vez que se apruebe un estudio futuro

Iniciales _____ **Fecha** _____

4) ¿Existe algún riesgo para el niño que participa en el proyecto?

El tomar esta muestra en su niño le puede causar cierta incomodidad y leve dolor (por la presencia del hisopo en la nariz). En muy raras ocasiones se puede observar una mínima coloración de sangre en la punta del hisopo que no tiene ningún peligro. No existen riesgos para la salud del niño con este procedimiento.

5) ¿Existe algún beneficio por participar en el proyecto?

No hay un beneficio directo para usted o su hijo; sin embargo, este proyecto dará aportes científicos a la comunidad. El estudio permitirá saber si su niño es portador sano de neumococo. Si su niño está sano, no requiere tratamiento. Conocer el tipo de neumococo nos ayudará a vigilar el efecto de las vacunas en nuestro país. Además, conocer la resistencia a los antibióticos permitirá dar un adecuado tratamiento en el futuro a los niños que acudan a este hospital por alguna enfermedad en la que se sospeche neumococo.

Consentimiento Informado General. Estudio Portadores. Versión 2.1 Mayo 2018



APROBADO

F. APROBACIÓN: 29.05.18

Anexo B. Aprobación del comité de ética.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Dirección Universitaria de
INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y
TECNOLOGÍA (DIRUCT)

CONSTANCIA 062 - 02 -22

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXENTO**. La aprobación será informada en la sesión más próxima del comité.

Título del Proyecto : "Distribución de serotipos, biotipo y sensibilidad antibiótica de *Haemophilus influenzae* en niños portadores nasofaríngeos de cinco hospitales en Lima Perú entre los años 2016-2019."

Código de inscripción : 207567

Investigador principal : González Jaime Scayon Enrique; Ochoa Woodell Theresa Jean; Pinedo Bardales María Guadalupe.

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. Protocolo de investigación, versión 1.0 recibida en fecha 10 de febrero 2022.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier emienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. La categoría de **EXENTO** es otorgada al proyecto por un periodo de cinco años en tanto la categoría se mantenga y no existan cambios o desviaciones al protocolo original. El investigador está exonerado de presentar un reporte del progreso del estudio por el periodo arriba descrito y sólo alcanzará un informe final al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **13 de febrero del 2027**.

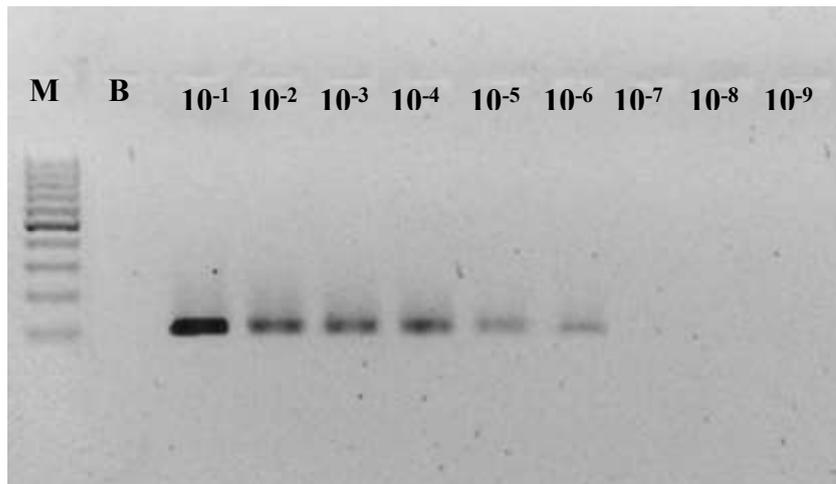
Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 14 de febrero del 2022.


Dr. Luis Antonio Palma Salinas Ugo
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación

Av. Honorio Delgado 430 SMP 15102
Apartado postal 6334
15111 219-0000 Anexo 201:352
diruct@chcneo-upch.pe
www.cayetano.edu.pe

Anexo C. PCR de diluciones sucesivas de las UFC.



Nota. Amplicones de las diluciones en función a las UFC de *H. influenzae* ATCC® 10211. M; marcador de peso molecular de 100 pb, B; blanco. Fuente propia.

Anexo D. Instrumentos del diseño de estudio de acuerdo a las variables.

Diseño de estudio	Tipo de Variable	Variable	Detalle
Descriptivo, no experimental de corte transversal	Independiente	Curva de Temperatura.	Temperaturas utilizadas: 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C.
		MgCl ₂	Concentración de MgCl ₂
		<i>Primers</i>	Concentración de primers
		Concentración de ADN.	UFC e intensidad de la banda.
Observacional	Dependiente	Amplificación de gen <i>hpd</i> .	Visualizado en el gel electroforesis, banda de 113 pb.